

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2004.03.19</b>	(73) Titular(es): <b>INSTITUT PASTEUR</b> <b>28, RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS</b> <b>CÉDEX 15</b>	<b>FR</b>
(30) Prioridade(s):		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2005.09.21</b>	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.07.18</b> <b>209/2012</b>	<b>CATHERINE ROUGEOT</b> <b>JEAN-FANÇOIS HUAULME</b> <b>MARIE-NOËLLE UNGEHEUER</b> <b>ANNE WISNER</b> <b>EVELYNE DUFOUR</b>	<b>FR</b> <b>FR</b> <b>FR</b> <b>FR</b> <b>FR</b>
	(74) Mandatário: <b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b> <b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS DERIVADOS DA PROTEÍNA BPLP HUMANA, POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAM PARA OS REFERIDOS PÉPTIDOS E ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA OS REFERIDOS PÉPTIDOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PÉPTIDO QUE É UM PRODUTO DE MATURAÇÃO DA PROTEÍNA LACRIMAL BÁSICA RICA EM PROLINA (BPLP) OU UM PÉPTIDO DERIVADO OU UM MIMÉTICO DO REFERIDO PRODUTO DE MATURAÇÃO, EM QUE O PÉPTIDO OU DERIVADO DO PÉPTIDO OU MIMÉTICO APRESENTA UMA PROPRIEDADE INIBIDORA CONTRA UMA METALO-ECTOPEPTIDASE, ESPECIALMENTE NEP E/OU APN. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAM OS REFERIDOS PÉPTIDOS E A ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA OS REFERIDOS PÉPTIDOS. PARA ALÉM DISSO, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UTILIZAÇÕES DE DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA DA PROTEÍNA BPLP HUMANA E A PÉPTIDOS INIBIDORES DELA DERIVADOS, POLIPÉPTIDOS QUE CODIFICAM A PROTEÍNA BPLP HUMANA OU PÉPTIDOS DERIVADOS DESTA, ASSIM COMO ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA A PROTEÍNA BPLP OU PÉPTIDOS DAÍ DERIVADOS.

**RESUMO**

**"PÉPTIDOS DERIVADOS DA PROTEÍNA BPLP HUMANA,  
POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAM PARA OS REFERIDOS PÉPTIDOS E  
ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA OS REFERIDOS PÉPTIDOS"**

A presente invenção refere-se a um péptido que é um produto de maturação da Proteína Lacrimal Básica rica em Prolina (BPLP) ou um péptido derivado ou um mimético do referido produto de maturação, em que o péptido ou derivado do péptido ou mimético apresenta uma propriedade inibidora contra uma metalo-ectopeptidase, especialmente NEP e/ou APN. A presente invenção também se refere a polinucleótidos que codificam os referidos péptidos e a anticorpos dirigidos contra os referidos péptidos. Para além disso, a presente invenção refere-se a utilizações de diagnóstico e terapêutica da proteína BPLP humana e a péptidos inibidores dela derivados, polipéptidos que codificam a proteína BPLP humana ou péptidos derivados desta, assim como anticorpos dirigidos contra a proteína BPLP ou péptidos daí derivados.

**DESCRIÇÃO****"PÉPTIDOS DERIVADOS DA PROTEÍNA BPLP HUMANA,  
POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAM PARA OS REFERIDOS PÉPTIDOS E  
ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA OS REFERIDOS PÉPTIDOS"**

A presente invenção refere-se a péptidos derivados da proteína BPLP humana, como novos inibidores de metaloectopeptidases. A presente invenção também de refere a polinucleótidos que codificam para os referidos péptidos e a anticorpos dirigidos contra os referidos péptidos. Para além disso, a presente invenção refere-se a utilizações de diagnóstico e terapêutica da proteína BPLP humana, péptidos daí derivados e seus miméticos, polipéptidos que codificam a proteína BPLP humana ou péptidos daí derivados assim como anticorpos dirigidos contra a proteína BPLP ou péptidos daí derivados.

Numa abordagem genómica, foi identificado um gene regulado por androgénio, que é expresso predominantemente na glândula submandibular (SMG) e na próstata de ratos adultos (Rosinski-Chupin *et al.*, 1988 e Patente Europeia 0 394 424). O gene codifica uma proteína precursora, a proteína submandibular rat<sub>1</sub> (SMR1) que dá origem a três péptidos estruturalmente relacionados que são selectivamente maturados a partir do precursor *in vivo* através da clivagem em sítios multibásicos através de uma enzima que

converte aminoácidos básicos aos pares (Rougeot *et al.*, 1994).

Numa abordagem de pós-genómica e fisiómica, foi estabelecido que as bases moleculares e funcionais proporcionam evidência para a existência em mamíferos de um mensageiro hormonal da comunicação intercelular, *i.e.*, o péptido maduro final criado a partir da pré-pró-hormona SMR<sub>1</sub>: o Pentapéptido de SMR<sub>1</sub>, denominado actualmente Sialorfina (de sequência QHNPR). Assim, a sialorfina é um péptido sinal exócrino e endócrino, cuja expressão está sob regulação androgénica activacional e a secreção é evocada sob resposta mediada adrenérgica ao stress ambiental, em ratos machos (Rougeot *et al.*, 1997).

O facto de, em ratos machos sexualmente maduros, a sialorfina regulada por androgénio ser segregada de forma aguda em resposta ao stress ambiental agudo, conduziu ao postulado de que este mediador de sinalização pode desempenhar um papel em alguma integração fisiológica e comportamental ligada à reprodução. Por isso, os mesmos autores investigaram os efeitos induzidos pela sialorfina no padrão de comportamento sexual masculino, que incluiu a frequência e a latência de montarias, intromissões e ejaculações, assim como interacções socio-sexuais. Os resultados obtidos demonstraram que a sialorfina possui a capacidade para modular, em doses relacionadas com níveis de circulação fisiológica, o padrão de acasalamento dos ratos, *i.e.*, exercendo, de um modo dependente da dose, um

efeito duplo de facilitador/inibidor sobre o desempenho sexual, embora estimulando em todas as doses a aparente excitação ou motivação sexual. Assim, é proposto que a sialorfina regulada por androgénio endógeno ajuda a modular o equilíbrio adaptativo entre os mecanismos de excitação e de inibição que servem uma resposta sexual de ratos machos apropriados, dependendo do contexto.

O Pedido de patente internacional WO 01/00221 descreve a utilização de produtos de maturação de SMR1 para o tratamento de distúrbios interpessoais e comportamentais deficientes, incluindo defeitos sexuais.

Para além disso, estes autores descobriram que os produtos de maturação de SMR1 reconhecem sítios alvo específicos em órgãos que estão profundamente envolvidos na concentração de iões minerais. O Pedido de patente internacional WO 98/37100 descreve a utilização terapêutica dos produtos de maturação de SMR1 para a prevenção ou tratamento de doenças associadas com um desequilíbrio de ião mineral num corpo humano ou animal.

Em resposta aos contextos de stress, a sialorfina é libertada de forma aguda, distribuída rapidamente e por último recuperada pelos seus alvos associados à membrana sistémicos (Rougeot *et al.*, 1997). Os autores demonstraram que a molécula de superfície celular principal à qual a sialorfina se liga *in vivo* é a metaloecto-endopeptidase ancorada à membrana, NEP (Endopeptidase Neutra; Neprilisina

EC 3.4.24.11), ou encefalinase (Rougeot *et al.*, 2003). Além disso, a sialorfina demonstrou ser um antagonista fisiológico da actividade de NEP *ex vivo*; e a interacção directa de NEP e sialorfina avaliada num ensaio *in vitro* utilizando NEP renal purificada solúvel e DGNPA fluorogénica artificial (Dansil-Gly-(pNO<sub>2</sub>)Phe-βAla) como substrato proporciona evidência directa de que a sialorfina inibiu a actividade de NEP (IC 50 da sialorfina: 0,6 μM). A sialorfina, é o primeiro inibidor fisiológico da actividade da NEP-encefalinase identificado até ao presente em roedores (Rougeot *et al.*, 2003 e Pedido de Patente Europeia EP 1 216 707).

A NEP está localizada na superfície de células nos tecidos nervoso e sistémico, onde desempenha uma função importante como uma ectoenzima que catalisa o processamento pós-secretor ou o metabolismo de vários neuropéptidos e péptidos reguladores. Os principais substratos fisiologicamente relevantes para NEP são as encefalinas, substância P e péptido natriurético atrial (ANP). Estes péptidos de sinal de mamífero estão envolvidos no controlo de percepção central e periférica, fenómenos inflamatórios, tónus arterial e homeostasia mineral. A sua importância fisiológica e o papel crítico da ectoenzima NEP na modulação da sua potência funcional fazem com que seja importante investigar e conhecer a sua possível protecção através de inibidores endógenos, de um ponto de vista fisiológico assim como fisiopatológico e terapêutico.

Utilizando modelos diferentes de farmacologia molecular e comportamental, os autores demonstraram que o mediador fisiológico, a sialorfina previne que a NEP espinal e renal degrade os seus dois substratos fisiologicamente relevantes, a Substância P e Met-enkefalina *in vitro*. A sialorfina inibiu a degradação da substância P com uma IC50 de 0,4-1  $\mu\text{M}$  e comportou-se como um inibidor competitivo da NEP ligada à membrana que tem origem a partir dos tecidos nervosos (medula espinal) ou a partir de tecidos sistemicamente (rim, osso, dente, placenta, próstata, GSM, intestino). A sialorfina *in vivo*, intravenosa produziu respostas antinociceptivas potentes em dois modelos de rato comportamentais de dor aguda e tónica induzida por lesão, o teste de dor por picadela (algesia mecânica) e teste formalina (algesia química). A analgesia induzida pela sialorfina necessitou da activação de receptores  $\mu$ - e  $\delta$ -opioides, consistentes com o envolvimento de receptores opioides endógenos na transmissão encefalinérgicas. Na verdade, estes receptores estão envolvidos na transmissão dos sinais opioidérgicos endógenos, tais como as encefalinas que são inactivadas pela NEP e a aminopeptidase APN, e também do opiato exógeno, a morfina que interage principalmente com o receptor  $\mu$ -opióide. Foi concluído que a sialorfina protege as encefalinas endógenas libertadas após estímulos nociceptivos através da inibição de ecto-encefalinases, *in vivo*, e assim potencializa o seu efeito analgésico. Por outro lado, o sistema opióide endógeno, em particular a via mediada por  $\delta$ -opióide, também foi ligada à etiologia de comportamento depressivo; por exemplo

utilizando um modelo de análise de desespero comportamental (teste de natação forçada), os autores demonstraram que a sialorfina apresenta uma actividade antidepressiva significativa em ratos machos. A sialorfina é o primeiro regulado natural sistemicamente activo da actividade de NEP identificada até ao presente em mamíferos. Para além disso, foi proporcionada evidência que é um novo modulador fisiológico de percepção da dor após lesão, e pode ser o progenitor de uma nova classe de moléculas terapêuticas, como novos antinociceptivos putativos e agentes antidepressivos (Rougeot et al., 2003; EP 1 343 519 e EP 1 343 520).

O poderoso efeito analgésico da sialorfina está associado à sua capacidade para proteger inteiramente as encefalinas da inactivação pelas ectoenzimas de degradação da encefalina. *In vivo*, as encefalinas são inactivadas com uma eficiência extraordinária (em poucos segundos) por ambas as ectopeptidases, NEP e APN. Em concordância, os primeiros inibidores sintéticos desenvolvidos, que são apenas específicos para NEP (tais como Tiorfano) ou específicos para APN (tais como Bestatina) exibem um efeito antinociceptivo não significativo ou fraco. Assim, a sialorfina de rato é um duplo inibidor fisiológico das metaloectopeptidases NEP e APN; para além disso, este mensageiro de sinal endócrino da resposta adaptativa ao stress é um inibidor poderoso da percepção da dor em ratos e o seu efeito analgésico é mais potente do que o dos inibidores sintéticos duplos de NEP/APN tais como celatorfano, que foram desenvolvidos noutra local através de métodos de

modelo. Assim, a sialorfina está consideravelmente adaptada em termos de especificidade e biodisponibilidade às características conformacionais e distributivas dos seus alvos e como uma consequência é mais eficaz de um ponto de vista integrativa. Considerando estas observações, de um ponto de vista funcional assim como fisiopatológico e terapêutico, a importância biológica das funções reguladas pela sialorfina de rato torna crucial investigar e identificar a sialorfina de rato endógena funcional em humanos.

A sialorfina é o único regulador fisiológico sistemicamente activo identificado da actividade de encefalinase ligada a membrana em mamíferos. Isto levanta a questão da existência desse inibidor de NEP-ectopeptidase endógena na saliva e sangue humanos. Não foi detectado o péptido QHNPR imunorreactivo (sialorfina) na saliva humana de macho utilizando radioimunoensaio altamente sensível e específico (Rougeot *et al.*, 1994). Contudo, os dados bibliográficos deixam supor a presença de substâncias de baixo peso molecular ( $\leq 3000$  Da), inibindo a actividade de ectopeptidase NEP em humanos, nomeadamente na saliva humana. Embora este(s) componente(s) salivar(es) não tenha(m) sido caracterizados bioquimicamente, foi observada uma diferença relacionada com o género na produção salivar deste(s) inibidor(es) de ectoenzimas humanas de degradação da encefalina (Marini e Roda, 2000). Surpreendentemente, a situação é muito semelhante àquela identificada pelos inventores em ratos machos, em que a glândula submandibular e a saliva representaram os compartimentos de principal síntese e secreção da sialorfina, respectivamente.

O gene que codifica o precursor da sialorfina SMR1 pertence a uma família de multigenes cujos membros foram identificados em humanos. Todavia, o gene humano homólogo *stricto sensu* do gene *SMR1* de rato (*VCSA1* que codifica para SMR1) não foi encontrado em humanos (clonagem de cDNA e análise do genoma humano). Para além disso, a potência inibidora de sialorfina de rato contra NEP humano ancorado à membrana, que é expressa por linhas celulares da próstata humana (LNCaP), existe mas é cerca de 10 vezes inferior àquela que foi obtida contra NEP de roedor (rato, coelho). Esta aparente selectividade na interacção funcional entre sialorfina de rato e ectoenzima NEP é pelo menos surpreendente considerando o facto de a NEP de rato e humana terem uma analogia de sequência de aminoácidos relativamente elevada (cerca de 85%). Por outro lado, a caracterização dos genes humanos da família multigénica à qual pertence o gene que codifica para o precursor da sialorfina de rato (*SMR1*), revelou que existem em humanos, vários genes desta família, entre as quais três foram caracterizados, *i.e.*, os genes *hPB*, *hPBI* e *BPLP* que estão aglomerados na mesma região do cromossoma, q13-21 do Cromossoma 4 (Isemura, 2000) (Isemura e Saitoh, 1997) (Dickinson e Thiesse, 1996).

Os inventores identificaram agora um novo péptido que é considerado como o homólogo humano funcional da sialorfina pentapéptido SMR1.

Os numerosos resultados recolhidos pelos inventores apoiam o facto de este novo péptido, de sequência QRFSR, derivar da proteína BPLP ("Proteína Lacrimal Básica rica em Prolina").

O gene BPLP humano codifica uma sequência de polipéptido de 201 aminoácidos (com o péptido sinal potencial da secreção) previsto a partir do cDNA clonado e caracterizado por Dickinson *et al.* (Dickinson e Thiesse, 1996). O gene BPLP é expresso nas glândulas humanas lacrimais e submandibulares. Na listagem de sequências anexas, a SEQ ID N.º. 1 apresenta a sequência de cDNA que codifica BPLP, e a SEQ ID N.º. 2 apresenta a sequência de aminoácidos de BPLP.

Os inventores definiram os sítios de consenso na região N-terminal melhor conservada (entre o rato, murganho e humano) da proteína BPLP secretada, com base no processamento de maturação da sialorfina de rato a partir do precursor de SMR1.

Por exemplo, estes sítios de consenso foram definidos como os sítios de clivagem do péptido sinal numa região que possui a sequência necessária para a peptidase sinal e em resíduos básicos aos pares com ligações R-R reconhecidas como o processamento sinal para a convertase de aminoácidos básicos aos pares.

Nesses sítios de consenso, os inventores encon-

traram então uma sequência QRFSR, do ponto de vista estrutural, intimamente relacionada com a da sialorfina QHNPR de rato.

Este péptido foi sintetizado e analisado quanto à sua capacidade para inibir a degradação do substrato de NEP fisiológico, *i.e.*, substância P.

Este péptido foi então identificado como o homólogo funcional humano da sialorfina.

A presente invenção revela péptidos derivados da proteína BPLP humana, como novos inibidores de metaloectopeptidase.

Mais particularmente, a presente invenção revela produtos de maturação da proteína BPLP, em particular o péptido QRFSR, assim como derivados de péptido e seus miméticos, úteis para potenciar os efeitos dos mensageiros de péptido neuroendócrino que controlam a transmissão nociceptiva (*e.g.* encefalinas) e/ou as permutas homeostáticas principalmente de Na/Pi/Ca/H<sub>2</sub>O (*e.g.* péptidos natriuréticos).

A invenção é definida pelas reivindicações.

Em particular, a invenção dirigida a um péptido que é um produto de saturação da Proteína Lacrimal Básica rica em Prolina (BPLP) ou um péptido derivado do referido produto de maturação, em que:

- o péptido ou derivado de péptido que apresenta uma propriedade inibidora contra a metalo-ectopeptidase NEP e/ou APN;
- o referido péptido inclui desde 3 até 15 aminoácidos e tendo sido obtido através da clivagem do precursor da proteína BPLP pela furina, convertases de PC ou PACE 4, e o referido derivado de péptido que deriva do referido péptido através de uma a duas substituições de aminoácidos e reter a especificidade de ligação e/ou actividade fisiológica do referido péptido; e
- o referido péptido ou derivado de péptido compreende a sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, em que:
  - X1 representa o átomo de H ou um aminoácido Tyr; e
  - X2 representa Gln ou Glp quando X1 é H, ou X2 representa Gln quando X1 é Tyr;

em que a referida sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg é a parte C-terminal do referido péptido ou derivado de péptido.

Esse péptido é ainda referido como "péptido de acordo com a invenção".

A presente invenção é também dirigida a polinucleótidos que codificam os referidos péptido de acordo com a invenção assim como a anticorpos dirigidos contra o referido péptido de acordo com a invenção.

Para além disso, a presente invenção revela

utilizações de diagnóstico e terapêutica de proteína BPLP humana, péptidos derivados da proteína BPLP humana, e derivados de péptidos e seus miméticos, assim como utilizações de diagnóstico e terapêutica de polinucleótidos que codificam para a proteína BPLP humana, péptidos derivados da proteína BPLP humana e seus derivados de péptidos e de anticorpos dirigidos contra a proteína BPLP humana, péptidos derivados da proteína BPLP humana e seus derivados peptídicos.

Deve ser entendido que os péptidos, proteínas, ou ácidos nucleicos da invenção estão na forma isolada ou purificada.

Por «purificada» e «isolada» entende-se, quando se refere a uma proteína ou péptido (incluindo anticorpos) ou uma sequência de nucleótidos, que a molécula indicada está presente na ausência substancial de outras macromoléculas biológicas do mesmo tipo. O termo "purificada", como aqui utilizado significa de um modo preferido que estão presentes pelo menos 75% em peso, mais preferencialmente pelo menos 85% em peso, ainda mais preferencialmente pelo menos 95% em peso, e muito preferencialmente pelo menos 98% em peso, de macromoléculas biológicas do mesmo tipo. Uma molécula de ácido nucleico "isolada" ou "purificada" que codifica um polipéptido particular refere-se a uma molécula de ácido nucleico que é substancialmente isento de outras moléculas de ácido nucleico que não codificam o polipéptido sujeito. Contudo, a molécula pode

incluir algumas bases adicionais ou unidades que não afectam de modo prejudicial as características básicas da composição.

### ***Péptidos***

Para os objectivos da invenção, um "péptido" é uma molécula compreendida por uma sequência linear de resíduos de aminoácidos ligados um ao outro na sequência linear através de ligações peptídicas. Essa sequência linear pode ser opcionalmente cíclica, *i.e.*, as extremidades do péptido linear ou as cadeias laterais de aminoácidos no péptido podem ser ligadas, *e.g.*, por uma ligação química. Esses péptidos, de acordo com a invenção, podem incluir desde cerca de três até cerca de 500 aminoácidos, preferencialmente desde cerca de 3 até cerca de 100 aminoácidos, e muito preferencialmente desde cerca de 3 até cerca de 50 aminoácidos e especialmente desde cerca de 3 até 15 aminoácidos e pode ainda incluir estruturas secundárias, terciária ou quaternárias, assim como associações intermoleculares com outros péptidos ou outras moléculas não péptidos. Essas associações intermoleculares podem ser através de, sem limitação, ligação covalente (*e.g.*, através de ligações persulfureto), ou através de quelação, interacções electrostáticas, interacções hidrofóbicas, ligação de hidrogénio, interacções ião-dipolo, interacções dipolo-dipolo, ou qualquer combinação das opções acima.

Nestes péptidos, por ciclização/desciclização N-terminal, Gln e Gln interconvertem-se.

É aqui revelado um péptido que é derivado da proteína BPLP humana e que possui actividade inibidora em metalo-ectopeptidases.

"Derivado da proteína BPLP humana" significa que compreende, consiste essencialmente em, ou consiste num fragmento da proteína BPLP. Numa forma de realização preferida, o referido péptido consiste em 3 até cerca de 150 aminoácidos. Muito preferencialmente, o referido péptido consiste em menos de 100 aminoácidos.

Particularmente um produto de maturação da proteína BPLP, assim como os seus derivados de péptido, são aqui revelados.

Mais particularmente, é aqui revelado um péptido que é um produto de maturação da Proteína Lacrimal Básica rica em Prolina (BPLP) ou derivado peptídico do referido produto de maturação, em que o péptido ou derivados peptídicos apresentam uma propriedade inibidora contra uma metalo-ectopeptidase, especialmente NEP e/ou APN, e mais particularmente NEP.

Ainda mais particularmente, um objectivo da presente invenção é o péptido de acordo com a invenção aqui definida acima. Um "produto de maturação" é um péptido que

é obtido através de clivagem do precursor da proteína BPLP por enzimas que convertem a pró-hormona ou maturases naturais, tais como furina, convertases de PC ou PACE 4 (Seidah, 1995), por exemplo.

Os péptidos da invenção incluem "derivados de péptido".

Os "derivados de péptido" são péptidos que possuem substituições de aminoácidos a partir de um péptido parental, preferencialmente de uma a duas substituições de aminoácidos de um péptido parental particularmente quando o referido péptido parental que compreende menos de 15 aminoácidos e preferencialmente menos de 10 aminoácidos, mas retendo a especificidade de ligação e/ou actividade fisiológica do péptido parental. Como aqui utilizado, "reter a especificidade de ligação do péptido parental" significa ser capaz para se ligar a um anticorpo monoclonal ou policlonal que se liga a um dos produtos de maturação de BPLP com uma afinidade que é pelo menos um décimo, mais preferencialmente pelo menos um meio, e muito preferencialmente pelo menos tão grande como aquela de um dos péptidos que são produtos de maturação de BPLP. A determinação dessa afinidade é preferencialmente realizada em condições de imunoensaio de ligação competitiva convencional. "Retenção da actividade fisiológica do péptido parental" significa reter a capacidade de qualquer um dos péptidos de maturação da BPLP para se ligar e para modular a actividade de uma metalo-ectopeptidase, especialmente NEP e/ou APN, e mais particularmente NEP, e para otimizar o nociceptivo local e

sistémico, inflamatório, pressor, e/ou respostas homeostáticas iónicas ao stress. Determinar se essa actividade é modulada é ainda descrito mais adiante nesta especificação.

Os péptidos da invenção incluem péptidos que compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem na sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, em que X1 representa o átomo de H ou um aminoácido Tyr, X2 representa Gln ou Glp em que X1 é H, ou X2 representa Gln em que X1 é Tyr. Quando o péptido da invenção compreende ou consiste essencialmente na sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, a referida sequência é a parte C-terminal do péptido da invenção.

Os péptidos preferidos de acordo com a invenção compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem na sequência QRFSR.

Mais particularmente, um péptido da invenção é o péptido que consiste na sequência QRFSR (SEQ ID N°. 3).

Outro péptido da invenção é o péptido que consiste na sequência YQRFSR (SEQ ID N°. 4).

Ao longo do texto,

Glp é piroglutamato,  
Tyr ou Y é Tirosina,  
Gln ou Q é glutamina,  
Arg ou R é Arginina,  
Phe ou F é Fenilalanina,  
Ser ou S é Serina.

Os péptidos de acordo com a presente invenção podem ser preparados de um modo convencional através da síntese de péptidos na fase líquida ou sólida através de acoplamentos sucessivos dos diferentes resíduos de aminoácidos a serem incorporados (da extremidade N-terminal para a extremidade C-terminal na fase líquida, ou da extremidade C-terminal para a extremidade N-terminal na fase sólida) em que as extremidades N-terminais e as cadeias laterais reactivas são previamente bloqueadas por grupos convencionais.

Para a síntese da fase sólida, a técnica descrita por Merrifield pode ser utilizada em particular. Alternativamente, a técnica descrita por Houbenweyl em 1974 também pode ser utilizada.

Para mais detalhes, a referência pode ser realizada para WO 98/37100.

Os péptidos de acordo com a presente invenção podem também ser obtidos utilizando métodos de engenharia genética.

Os miméticos de acordo com a invenção são obtidos (i) por substituição de uma ou mais amidas ligadas por uma ligação não amida, (ii) por substituição da cadeia lateral de um ou mais aminoácidos por uma unidade química diferente, (iii) por protecção de um ou mais do terminal N,

o terminal C ou uma ou mais cadeias laterais por um grupo protector, (iv) introduzindo cadeias duplas e/ou ciclização e/ou modificações de estereoespecificidade na cadeia lateral amino para aumentar a rigidez e/ou a afinidade de ligação, (v) por meio de desenvolvimento de concepção de fármacos assistido por computador, (vi) por protecção dos grupos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  hidrofílicos por esterificação com álcool lipofílicos ou por amidação e/ou por acetilação ou adição de carboxilalquilo ou cadeia hidrofóbica aromática no terminal  $\text{NH}_2$ , (vii) por retroinversão isomérica das ligações amida  $\text{CO-NH}$  ou metilação das funções amida, ou (viii) por substituição de L-aminoácidos por D-aminoácidos.

Miméticos preferidos, incluindo peptidomiméticos, retêm a especificidade de ligação e/ou a actividade fisiológica do péptido parental incluindo o derivado de péptido, como descrito acima. Como qui utilizado, um "mimético" é uma molécula que mimetiza algumas propriedades dos péptidos naturais, preferencialmente a sua especificidade de ligação e actividade fisiológica. São obtidos miméticos preferidos através de modificação estrutural de péptidos de acordo com a invenção, preferencialmente utilizando aminoácidos não naturais, D-aminoácidos em vez de L-aminoácidos, restrições conformacionais, substituição isostérica, ciclização, ou outras modificações. Outras modificações preferidas incluem sem limitação, aquelas nas quais uma ou mais ligações amida são substituídas por uma ligação não amida, e/ou uma ou mais cadeias laterais de aminoácido é substituída por uma unidade química diferente, ou um ou mais dos terminais N,

Os terminais C ou uma ou mais cadeias laterais são protegidos por um grupo de protecção, e/ou ligações duplas e/ou ciclização e/ou a estereospecificidade é introduzida na cadeia lateral do aminoácido para aumentar a rigidez e/ou a afinidade da ligação.

Com base na estrutura cristal do domínio de ligação da metalo-ectopeptidase direccionado pelo péptido da invenção com o referido péptido, também podem ser obtidos miméticos por meio de desenvolvimento de concepção de fármaco assistido por computador (Oefner *et al.* (2000); Gomeni *et al.* (2001); Jones *et al.* (2002); Kan (2002)).

Ainda outras modificações preferidas incluem aquelas que pretendem aumentar a resistência à degradação enzimática, melhoramento na biodisponibilidade em particular por tecidos nervosos e das gónadas e mais geralmente nas propriedades farmacocinéticas e especialmente compreendem:

- proteger os grupos hidrofílicas  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  por esterificação ( $\text{COOH}$ ) com álcoois lipofílicos ou por amidação ( $\text{COOH}$ ) e/ou por acetilação ( $\text{NH}_2$ ) ou carboxialquilo ou cadeia hidrofóbica aromática adicionados no terminal  $\text{NH}_2$ ;
- isómeros de retroinversão das ligações amida  $\text{CO-NH}$  ou metilação (ou cetometileno, metileneoxilo, hidroxietileno) das funções amida;
- substituição de L aminoácidos por D aminoácidos.

Todas estas variações são bem conhecidas na técnica. Assim, dadas as sequências peptídicas aqui reveladas, os especialistas na técnica são capazes de conceber e produzir miméticos que possuem características de ligação e/ou actividades fisiológicas semelhantes a, ou superior a, esses péptidos (ver *e.g.*, Horwell *et al.*, (1996); Liskamp *et al.*, (1994); Gante *et al.*, (1994); Seebach *et al.*, (1996)).

Como aqui utilizado, o termo "BPLP-péptido" refere-se à proteína BPLP, péptidos derivados de BPLP, péptidos de maturação de BPLP, e derivados de péptidos e miméticos, incluindo peptidomiméticos, da invenção.

A invenção também revela um complexo molecular que compreende:

- um receptor de metalo-ectopeptidase, especialmente um receptor de NEP, ou o receptor da metalo-ectopeptidase, especialmente um receptor de NEP, sítio de ligação da proteína BPLP ou seus produtos de maturação, *e.g.* QRFSR;
- a proteína BPLP ou seus produtos de maturação, *e.g.* QRFSR.

#### **Ácidos nucleicos, métodos de expressão e métodos de detecção**

Os ácidos nucleicos, também denominados polinucleótidos, tais como moléculas de DNA ou de RNA, que

codificam os péptidos, incluindo derivados de péptidos, definidos acima são também parte da invenção, embora tendo em conta a degeneração do código genético.

Consequentemente, a presente invenção proporciona ácidos nucleicos que codificam para os péptidos de acordo com a invenção.

Particularmente, a presente invenção proporciona ácidos nucleicos que codificam para os péptidos que compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem na sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg como definido acima. Quando o péptido da invenção compreende ou consiste essencialmente na sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, a referida sequência é a parte C-terminal do péptido da invenção. Em formas de realização preferidas, a presente invenção proporciona um ácido nucleico que codifica para péptidos que compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem na sequência QRFSR. Numa forma de realização muito preferida, a presente invenção proporciona um ácido nucleico que codifica para QRFSR ou um ácido nucleico que codifica para YQRFSR.

As sequências que são hidridáveis com qualquer uma das sequências acima ou duas sequências complementares em condições de hibridação convencionais, preferencialmente condições de elevada restringência são reveladas.

Uma molécula de ácido nucleico é "hibridável" com outra molécula de ácido nucleico, quando uma forma de

cadeia única da molécula de ácido nucleico pode emparelhar com a outra molécula de ácido nucleico nas condições apropriadas de temperatura e força iónica da solução (ver Sambrook *et al.*, 1989). As condições de temperatura e força iónica determinam a "restringência" da hibridação. Para o rastreio preliminar para ácidos nucleicos homólogos, podem ser utilizadas condições de hibridação de baixa restringência, correspondendo a uma  $T_m$  (temperatura de fusão) de 55 °C, *e.g.*, 5x SSC, 0,1% de SDS, 0,25% de leite, e sem formamida; ou 30% de formamida, 5x SSC, 0,5% de SDS). Condições de hibridação de restringência moderada correspondem a uma  $T_m$  mais elevada, *e.g.*, 40% de formamida, com 5x ou 6x SCC. As condições de hibridação de elevada restringência correspondem à  $T_m$  mais elevada, *e.g.*, 50% de formamida, 5x ou 6x SCC. SCC é um NaCl a 0,15 M, 0,015 M de Na-citrato. A hibridação requer que os dois ácidos nucleicos contenham sequências complementares, embora dependam da restringência da hibridação, são possíveis desemparelhamentos entre as bases. A restringência apropriada para hibridar ácidos nucleicos depende do comprimento dos ácidos nucleicos e do grau de complementação, variáveis bem conhecidas na técnica. Quanto maior for o grau de semelhança ou de homologia entre duas sequências de nucleótidos, maior será o valor da  $T_m$  para híbridos de ácidos nucleicos que possuem essas sequências. A estabilidade relativa (que corresponde à  $T_m$  mais elevada) das hibridações de ácido nucleico diminui na seguinte ordem: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. Para híbridos superiores a 100 nucleótidos de comprimento, as equações para calcular

a  $T_m$  foram derivadas (ver Sambrook *et al.*, supra, 9.50-9.51). Para hibridação com ácidos nucleicos mais curtos, *i.e.*, oligonucleótidos, a posição de desemparelhamentos torna-se mais importante, e o comprimento do oligonucleótido determina a sua especificidade (ver Sambrook *et al.*, supra, 11.7-11.8). Um comprimento mínimo para um ácido nucleico hibridável é pelo menos de cerca de 10 nucleótidos; preferencialmente pelo menos cerca de 15 nucleótidos; e mais preferencialmente o comprimento é pelo menos cerca de 20 nucleótidos.

Numa forma de realização específica, o termo "condições de hibridação convencionais" refere-se a uma  $T_m$  de 55 °C, e utiliza as condições como apresentadas acima. Numa forma de realização preferida, a  $T_m$  é 60 °C. Numa forma de realização mais preferida, a  $T_m$  é 65 °C. Numa forma de realização específica, "restringência elevada" refere-se a condições de hibridação e/ou de lavagem a 68 °C em 0,2 X SSC, a 42 °C em 50% de formamida, 4 X SSC, ou em condições que originam níveis de hibridação equivalentes àquelas observadas em qualquer uma destas duas condições.

A presente invenção refere-se ainda a vectores para clonagem e/ou expressão compreendendo uma sequência de ácido nucleico da invenção e à célula hospedeira que compreende o ácido nucleico da invenção ou o referido vector, *i.e.* uma célula hospedeira para a qual pelo menos um destes vectores foi transferido. O vector de expressão de acordo com a invenção compreende uma sequência de ácido

nucleico que codifica um péptido de acordo com a invenção, sendo a referida sequência de ácido nucleico ligada operacionalmente a elementos que permitem a sua expressão. O referido vector contém vantajosamente uma sequência de promotor, sinais para iniciação e terminação da tradução, assim como regiões apropriadas para a regulação da tradução. A sua inserção para dentro da célula hospedeira pode ser transiente ou estável. O referido vector pode também conter sinais específicos para a secreção da proteína traduzida.

Estes vários sinais de controlo são seleccionados de acordo com a célula hospedeira e podem ser inseridos nos vectores que se auto-replicam na célula hospedeira seleccionada, ou nos vectores que integram o genoma do referido hospedeiro.

As células hospedeiras podem ser procarióticas ou eucarióticas, incluindo mas não limitadas a bactérias, leveduras, células vegetais, células de insectos, células de mamíferos, incluindo linhas celulares que estão disponíveis comercialmente. Exemplos preferidos para células hospedeiras são células COS-1, células 293, ou células CHO.

Um método para produzir um péptido de BPLP recombinante, em que a referida célula hospedeira é transfectada com o referido vector de expressão e é cultivada em condições que permitem a expressão de um

péptido de BPLP é ainda revelado. A transfecção da célula hospedeira pode ser realizada utilizando qualquer técnica convencional, tal como electroporação ou precipitação com fosfato de cálcio ou lipofectina®.

A proteína ou péptido pode ser então recolhida e purificada, por meio de processos bem conhecidos para purificação: o péptido ou proteína recombinante podem ser purificados a partir de lisados ou extractos celulares, a partir do sobrenadante do meio de cultura, através de métodos tais como cromatografia de HPLC, técnicas de imunoafinidade com anticorpos específicos, e semelhantes.

A presente invenção refere-se ainda a métodos de prognóstico e/ou diagnóstico *in vitro* em que as sequências de ácido nucleico da invenção ou sondas ou iniciadores derivados destas são utilizados para detectar a síntese aberrante, incluindo sínteses elevadas ou baixas anormais, ou anormalidade genéticas ao nível do gene de BPLP.

A invenção proporciona assim um método *in vitro* para o prognóstico e/ou diagnóstico de um estado que envolve uma produção alterada de qualquer um dos produtos de maturação de BPLP de acordo com a invenção, cujo método compreende detectar numa amostra biológica de um sujeito de teste, uma anormalidade em termos de qualidade e/ou quantidade no gene BPLP ou no seu transcrito.

O termo "prognóstico" refere-se à determinação ou

confirmação da probabilidade de surgir uma doença ou estado.

A presente invenção é mais particularmente dirigida a um método para detectar uma anormalidade no gene de BPLP que compreende os passos de:

- colocar em contacto uma amostra biológica contendo DNA com oligonucleótidos específicos que permitem a amplificação da totalidade ou de parte do gene de BPLP, tendo o DNA contido na amostra sido tornado acessível, quando apropriado, para hibridação, e em condições que permitem uma hibridação dos iniciadores com o DNA contido na amostra biológica;
- amplificar o referido DNA;
- detectar os produtos de amplificação;
- comparar os produtos amplificados como obtido para os produtos amplificados obtidos com uma amostra biológica de controlo normal, e deste modo detectar uma possível anormalidade no gene de BPLP.

O método para prognóstico e/ou diagnóstico de um estado que envolve uma produção alterada do produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção também pode ser aplicado à detecção de uma anormalidade no transcrito do gene de BPLP, através da amplificação dos mRNAs contidos numa amostra biológica, por exemplo através de RT-PCR.

Ainda outro objecto da presente invenção é um

método para detectar uma anormalidade no transcrito de BPLP, como previamente definido compreendendo os passos de:

- produzir cDNA a partir de mRNA contido numa amostra biológica;
- colocar em contacto o referido cDNA com oligonucleótidos específicos que permitem a amplificação da totalidade ou de parte do transcrito do gene de BPLP, em condições que permitem a hibridação dos iniciadores com o referido cDNA;
- amplificar o referido cDNA;
- detectar os produtos de amplificação;
- comparar os produtos amplificados como obtidos com os produtos amplificados obtidos com uma amostra biológica de controlo normal, e desse modo detectar uma possível anormalidade no transcrito do gene de BPLP.

Esta comparação dos produtos amplificados obtidos a partir da amostra biológica com os produtos amplificados obtidos com uma amostra biológica normal é uma comparação quantitativa e/ou uma comparação qualitativa. Neste último caso, a comparação pode ser realizada por exemplo através de hibridação específica da sonda, através de sequenciação ou por análise de sítios de restrição.

Um especialista na técnica conhece muito bem os métodos convencionais para analisar o DNA contido numa amostra biológica e para diagnosticar um distúrbio

genético. Estão disponíveis muitas estratégias para a análise genotípica.

Preferencialmente, pode utilizar-se o método de DGGE (Electroforese em Gel com Gradiente Desnaturante/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), ou o método SSCP (Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples/Single Strand Conformation Polymorphism) para detectar uma anormalidade no gene BPLP. Esses métodos são preferencialmente seguidos por sequenciação directa. O método de RT-PCR pode ser utilizado vantajosamente para detectar anormalidades no transcrito de BPLP, uma vez que permite visualizar as consequências de uma mutação de excisão tal como ultrapassar o exão ou excisão aberrante devido à activação de um sítio críptico. Este método é preferencialmente também seguido por sequenciação directa. A técnica mais recentemente desenvolvida utilizando o chip de DNA também pode ser implementada vantajosamente para detectar uma anormalidade no gene BPLP.

Estes métodos para detectar uma anormalidade no gene BPLP, ou no seu transcrito, são particularmente úteis para identificar mutações que resultam numa proteína BPLP ou produtos de maturação não funcionais, e são vantajosos para o prognóstico e/ou diagnóstico de doenças *in vitro*, em que o gene BPLP está envolvido.

Exemplos dessas doenças são doenças citadas na secção "aplicação terapêutica".

### **Anticorpos e métodos de detecção**

A presente invenção revela anticorpos, especificamente dirigidos contra (*i.e.* que reconhecem especificamente) a proteína BPLP. A presente invenção proporciona ainda anticorpos, especificamente dirigidos contra (*i.e.* que reconhecem especificamente) os péptidos de acordo com a invenção.

Conseqüentemente, a presente invenção proporciona anticorpos dirigidos contra péptidos derivados da proteína BPLP humana, e seus derivados peptídicos.

Mais particularmente, a presente invenção proporciona anticorpos dirigidos contra péptidos que compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem na sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg como definido acima. Quando o péptido da invenção compreende ou consiste essencialmente na sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, a referida sequência é a parte C-terminal do péptido da invenção. Em formas de realização preferidas, a presente invenção proporciona anticorpos dirigidos contra (*i.e.* que reconhecem especificamente) péptidos que compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem na sequência QRFSR. Na forma de realização mais preferida, a presente invenção proporciona anticorpos dirigidos contra (*i.e.* que reconhecem especificamente) QRFSR ou anticorpos dirigidos contra (*i.e.* que reconhecem especificamente) YQRFSR.

O termo "anticorpo" nas suas várias formas gramaticais é aqui utilizado para se referir a moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente activas de moléculas de imunoglobulina, *i.e.*, moléculas que contêm um sítio de combinação do anticorpo ou paratopo. As moléculas de anticorpo exemplares são moléculas de imunoglobulina intactas, moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas e porções de uma molécula de imunoglobulina, incluindo aquelas porções conhecidas na técnica como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e F(v).

Anticorpos que inibem a interacção de um produto de maturação de BLP ou um seu derivado peptídico com o seu receptor são mais particularmente úteis.

Embora possam ser utilizados anticorpos policlonais, os anticorpos monoclonais são preferidos porque são mais reprodutíveis a longo termo.

São também conhecidos processos para criar anticorpos policlonais. Tipicamente, esses anticorpos podem ser criados através da administração da proteína ou péptido, incluindo o conjugado peptídico, da presente invenção subcutaneamente a coelhos New Zealand brancos que foram primeiro sangrados para obter soro pré-imune. Os antigénios podem ser injectados num volume total de 50 µL por sítio em dez sítios diferentes ou pelo menos cinco sítios diferentes. Os coelhos são então sangrados cinco semanas após a

primeira injeção e periodicamente reforçados com o mesmo antigénio administrado subcutaneamente a uma concentração cinco vezes mais baixa do que a primeira injeção a um máximo dependendo da qualidade da resposta imunitária três vezes a cada seis semanas. É então recolhida uma amostra de soro a cada 10 dias após cada reforço. Os anticorpos policlonais são então recuperados do soro através de cromatografia de afinidade utilizando o correspondente antigénio para capturar o anticorpo. Este e outros processos para criar anticorpos policlonais são revelados em E. Harlow, *et al.*, editores, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988).

Um "anticorpo monoclonal" nas suas várias formas gramaticais refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contém apenas uma espécie de sítio de combinação de anticorpo capaz de imunorreagir com um epitopo particular. Um anticorpo monoclonal apresenta assim tipicamente uma única afinidade de ligação para quaisquer epitopos com os quais imunorreage. Um anticorpo monoclonal pode, por isso, conter uma molécula de anticorpo possuindo uma pluralidade de sítios de combinação de anticorpo, cada um imuno específico para um epitopo diferente, *e.g.* um anticorpo monoclonal biespecífico.

Métodos laboratoriais para preparar anticorpos monoclonais são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Harlow *et al.*, *supra*). Podem ser preparados anticorpos monoclonais (Mabs) através de imunização de um

mamífero, e.g. um murganho, rato, coelho, cabra, humano e semelhantes, contra a proteína BPLP purificada, produtos de maturação de BPLP ou seus derivados peptídicos, incluindo conjugados BPLP-peptídicos. As células que produzem anticorpo no mamífero imunizado são isoladas e fundidas com células de mieloma ou heteromieloma para produzir células de híbridos (hibridoma). As células de hibridoma que produzem os anticorpos monoclonais são utilizadas como uma fonte do anticorpo monoclonal desejado.

Embora possam ser produzidos Mabs por cultura de hibridomas, a invenção não está limitada a esta técnica. Também está contemplada a utilização de Mabs produzidos por um ácido nucleico de expressão clonado a partir de um hibridoma. Isto é, o ácido nucleico que expressa as moléculas secretadas por um hibridoma pode ser transferido para outra linha de células para produzir um transformante. O transformante é genotipicamente distinto do hibridoma original mas é também capaz de produzir as moléculas de anticorpo desta invenção, incluindo fragmentos imunologicamente activos de moléculas de anticorpo total, correspondendo àquelas secretadas pelo hibridoma. Adicionalmente, a literatura proporciona métodos para formar anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia simples e as variações semelhantes num fragmento de anticorpo imunorreactivo básico. Todos estes são considerados como estando dentro do âmbito da invenção na medida em que uma classe e especificidade de anticorpo é revelada e reivindicada, independentemente da estrutura da

variante precisa que um especialista na técnica pode construir.

A presente invenção refere-se ainda a um método *in vitro* para diagnóstico, prognóstico ou determinação da evolução de um estado que envolve uma produção alterada (*i.e.* uma diminuição ou um aumento da produção em comparação com um indivíduo de controlo) de qualquer um dos produtos de maturação de BPLP de acordo com a invenção. O método compreende detectar, ou quantificar numa amostra biológica de um indivíduo de teste, uma proteína BPLP ou seus produtos de maturação, especialmente QRFSR, em comparação com a mesma numa amostra biológica de um indivíduo de controlo.

Exemplos dessas condições são doenças citadas na secção "aplicações terapêuticas".

A detecção da proteína BPLP ou dos seus produtos de maturação é particularmente útil para avaliar o nível androgénico e/ou determinar uma actividade androgénica anormal.

Uma "amostra biológica" é um fluido de um indivíduo, incluindo soro, sangue, líquido raquidiano, fluido cerebrospinal, urina, leite, saliva ou um extracto de tecido ou uma biopsia de tecido ou órgão, tal como cérebro, medula espinal, tecido ósseo, rim, próstata, placenta, tecido dental, mucosa glandular do estômago, intestino, tecido da glândula salivar, por exemplo.

"Um indivíduo" ou "um doente" é um vertebrado, e.g. um mamífero, preferencialmente um ser humano, independentemente da sua idade, sexo e estado geral. Também estão compreendidas crianças e bebés. O indivíduo de teste pode ser assintomático, pode ser considerado como provável para desenvolver a doença ou estado. Indivíduos com uma suspeição de um distúrbio alvo ou indivíduos que já apresentaram sintomas da doença ou estado também podem ser testados.

O "indivíduo de controlo" pode ser um indivíduo saudável ou um indivíduo sem qualquer distúrbio aparente que pode envolver a proteína BPLP ou um dos seus produtos de maturação. De modo a determinar a evolução de um estado que envolve a proteína BPLP ou um dos seus produtos de maturação, pode ser muito útil para testar um indivíduo quanto à expressão da proteína BPLP ou a seus produtos de maturação, e para monitorizar o efeito de um fármaco ou a disseminação do estado, testando-o(a) por uma segunda vez, e.g. algumas semanas mais tarde. Nesse caso, os resultados do segundo teste são comparados com os resultados do primeiro teste, e em geral também com os resultados obtidos com um indivíduo "saudável". O "indivíduo de controlo" refere-se então quer ao mesmo indivíduo de teste ou a um "indivíduo saudável".

O termo "diagnóstico" refere-se à determinação ou à confirmação de uma doença ou estado num indivíduo.

O termo "prognóstico" refere-se à determinação ou confirmação de uma probabilidade de surgir uma doença ou estado.

A "expressão ou produção de uma proteína BPLP ou um seu produto de maturação" pode ser determinada ensaiando a proteína BPLP ou os seus produtos de maturação.

Esses métodos de ensaio compreendem colocar em contacto uma amostra biológica com um parceiro de ligação capaz de interagir selectivamente com uma proteína BPLP ou seus produtos de maturação, especialmente QRFSR, presentes na amostra. O parceiro de ligação é geralmente um anticorpo, que pode ser policlonal ou monoclonal, preferencialmente monoclonal.

Métodos para produzir anticorpos como descrito acima de acordo com a terapia podem também ser facilmente adaptados para produzir anticorpos úteis para os métodos de diagnóstico de acordo com a invenção.

Por exemplo, a presença ou produção de proteína BPLP ou de qualquer dos seus produtos de maturação, ou uma forma mutada da proteína ou do produto de maturação, pode ser detectada incubando uma amostra biológica com um anticorpo que reconhece especificamente a proteína BPLP ou um anticorpo que reconhece especificamente um seu produto de maturação, especialmente QRFSR, e.g. utilizando técnicas

electroforéticas convencionais e técnicas de imunodiagnóstico líquidas ou sólidas, incluindo imunoenaios tais como competição, reacção directa, ou ensaios de tipo sanduíche. Esses ensaios incluem, mas não está limitado a, transferência de Western; testes de aglutinação; imunoenaios mediados e marcados com enzima, tais como ELISAs; ensaios de tipo biotina/avidina; radioimunoensaio, tal como aqueles que utilizam proteína BPLP radioiodinada ou tritiada ou qualquer um dos seus produtos de maturação, especialmente QRFSR; imunolectroforese; imunoprecipitação, etc. As reacções incluem geralmente revelar marcadores, tais como marcadores fluorescentes, quimioluminescentes, radioactivos, enzimáticos ou moléculas de corante, ou outros métodos para detectar a formação de um complexo entre o antigénio e o anticorpo ou anticorpos reagidos com este.

Os ensaios acima mencionados envolvem geralmente a separação da proteína BPLP não ligada ou seus produtos de maturação não ligados, especialmente QRFSR não ligada, a partir da proteína BPLP ou produtos de maturação, especialmente QRFSR, ligados ao seu anticorpo específico que é imobilizado numa fase sólida. Os suportes sólidos que podem ser utilizados na prática da invenção incluem suportes tais como nitrocelulose (e.g., na forma de membrana ou de poço de microtitulação); cloreto de polivinilo (e.g., películas ou poços de microtitulação); látex de poliestireno (e.g., esferas ou placas de microtitulação); fluoreto de polivinilidina; papel diazotizado;

membranas de nylon; esferas activadas, esferas de resposta magnética, e semelhantes.

Assim, numa forma de realização particular, a presença da proteína BPLP ou seus produtos de maturação, especialmente QRFSR, ligados, de uma amostra biológica pode ser rapidamente detectados utilizando um ligante secundário que compreende outro anticorpo, que pode ser rapidamente conjugado com um marcador enzimático detectável, tal como peroxidase de rábano, fosfatase alcalina ou urease, utilizando métodos conhecidos dos especialistas na técnica. Um substrato enzimático apropriado é então utilizado para criar um sinal detectável, tal como um sinal cromogénico ou fluorogénico, por exemplo. Noutras formas de realização relacionadas, podem ser praticadas técnicas de ELISA de tipo competitivo utilizando métodos conhecidos dos especialistas na técnica.

Os reagentes do ensaio acima descrito, incluindo os anticorpos, podem ser proporcionados em kits, com instruções adequadas e outros reagentes necessários, de modo a conduzir imunoensaios como descrito acima. O kit também pode conter, dependendo do imunoensaio particular utilizado, marcadores adequados e outros reagentes empacotados e materiais (*i.e.* tampões de lavagens e semelhantes). Podem ser realizados imunoensaios convencionais, tais como aqueles descritos acima, utilizando estes kits.

### Terapia Génica

De acordo com a presente invenção, a modulação da actividade da metalopeptidase de membrana pode ser alcançada por modificação (*i.e.* aumentar ou diminuir) a quantidade da proteína BPLP ou o péptido de acordo com a invenção nas células de um doente e sua libertação, ou expressar e possivelmente libertar o referido péptido ou proteína BPLP. O aumento da quantidade da proteína BPLP ou péptido de acordo com a invenção nas células de um doente e possivelmente a sua libertação, expressando e possivelmente libertar o referido péptido ou proteína BPLP pode ser realizado através da transfecção das células com um vector que expressa BPLP ou um vector que expressa uma proteína BPLP ou um péptido de acordo com a invenção *e.g.* na forma de um DNA nu ou como um vector viral.

Preferencialmente, o ácido nucleico desta invenção forma parte de um vector. Esse vector é um ácido nucleico que compreende uma sequência codificante operacionalmente associada com sequências que controlam a expressão da proteína ou péptido numa célula transfectada com o vector.

A utilização de um tal vector torna na verdade possível melhorar a administração do ácido nucleico nas células do indivíduo e especialmente às células a serem tratadas, e também para aumentar a sua estabilidade nas referidas células, que tornam possível obter um efeito

terapêutico duradouro. Para além disso, é possível introduzir várias sequências de ácido nucleico para o mesmo vector, que também aumenta a eficácia do tratamento.

O vector utilizado pode ser de origem diversa, desde que seja capaz de transformar células animais, preferencialmente células humanas. Numa forma de realização preferida da invenção, é utilizado um vector viral que pode ser seleccionado a partir de adenovírus, retrovírus, vírus adeno-associados (AAV), lentivírus, herpes vírus, citomegalovírus (CMV), vírus vaccinia e semelhantes. Os vectores derivados de adenovírus, retrovírus ou AAVs, vectores retrovirais derivados do HIV, incorporando sequências de ácido nucleico heterólogo foram descritos na literatura.

A presente invenção revela também por isso qualquer vírus recombinante que compreende, inserido no seu genoma, sequência de ácido nucleico que codifica a proteína BPLP, um produto de maturação de BPLP ou um péptido como definido acima, incluindo um derivado de péptido.

Vantajosamente, o vírus recombinante de acordo com a invenção é um vírus defeituoso, desprovido de pelo menos as sequências necessárias para a replicação do referido vírus na célula infectada.

É particularmente vantajoso utilizar as sequências de ácido nucleico da invenção numa forma incorporada num adenovírus, um AAV ou um retrovírus recombinante defeituoso.

A distribuição de gene alvo é descrita na Publicação de Pat. Internacional WO 95/28494, publicado em Outubro de 1995.

Alternativamente, o vector pode ser introduzido *in vivo* por lipofecção. Durante a última década, tem aumentado a utilização de lipossomas para a encapsulação e transfecção de ácidos nucleicos *in vitro*. A informação em relação aos lipossomas é também proporcionada na secção da "composição farmacêutica" do presente pedido.

É também possível introduzir o vector *in vivo* como um plasmídeo de DNA nu. Os vectores de DNA nu para terapia génica podem ser introduzidos nas células hospedeiras desejadas através de métodos conhecidos na técnica, e.g., transfecção, electroporação, microinjecção, transdução, fusão celular, DEAE dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, Lipofectamine®, utilização de uma pistola de genes (gene gun), ou utilização de um transportador de vector de DNA.

### **Composições farmacêuticas**

Os péptidos de BPLP (o mesmo é dizer a proteína BPLP, os péptidos de acordo com a invenção e miméticos como definidos acima), ou os ácidos nucleicos que codificam esses péptidos de BPLP e anticorpos contra péptidos de acordo com a invenção podem ser formulados em composições

farmacêuticas em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável. Por exemplo, as composições farmacêuticas são adequadas para uma administração tópica, oral, sublingual, parentérica, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea ou intraocular e semelhantes.

A invenção também revela uma composição farmacêutica que compreende um polímero do referido péptido de BPLP ou seu mimético.

Preferencialmente, as formas de ácido nucleico formam parte de um vector que expressa o referido ácido nucleico.

Preferencialmente, as composições farmacêuticas contêm veículos que são farmacêuticamente aceitáveis para a formulação capaz de ser injectada.

As composições farmacêuticas adequadas podem ser em particular soluções isotónicas, estéreis, soluções salinas (fosfato de monossódio ou dissódio, sódio, potássio, cálcio ou cloreto de magnésio e semelhantes ou misturas desses sais), ou secos, especialmente composições liofilizadas que após adição, dependendo do caso, de água esterilizada ou soro fisiológico, permitem a constituição de soluções injectáveis.

As doses do péptido de BPLP, anticorpos ou ácido nucleico utilizados para a administração podem ser

adaptadas como uma função de vários parâmetros, e em particular como uma função do modo de administração utilizada, da patologia relevante, ou alternativamente da duração de tratamento desejada.

Para preparar composições farmacêuticas para a terapia com péptidos, uma quantidade eficaz do péptido de BPLP pode ser dissolvido ou disperso num veículo farmacêuticamente aceitável ou meio aquoso.

São aqui fornecidos abaixo exemplos de formulações farmacêuticas.

As composições farmacêuticas compreendem uma quantidade eficaz do péptido BPLP, ácido nucleico ou anticorpos, num veículo farmacêuticamente aceitável ou meio aquoso.

"Farmacêuticamente" ou "farmacêuticamente aceitável" refere-se a entidades moleculares e composições que não produzem uma reacção adversa, alérgica ou outra reacção inconveniente quando administrado a um animal, incluindo um humano, como apropriado.

Como aqui utilizado, um "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e de retardamento da absorção e semelhantes. A utilização desses meios e agentes

para substâncias farmacêuticas activas é bem conhecida na técnica. Excepto na medida em que, como qualquer meio ou agente convencional é incompatível com o ingrediente activo, a utilização nas composições terapêuticas está contemplada. Também podem ser incorporados ingredientes activos suplementares nas composições.

As formas farmacêuticas adequadas para utilização injectável incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis; formulações incluindo óleo de sésamo, óleo de amendoim ou propilenoglicol aquoso; e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injectáveis estéreis. Em qualquer dos casos, a forma deve ser estéril e deve ser fluida até ao ponto de ser fácil aplicar com seringa. Deve ser estável nas condições de fabrico e armazenamento e deve ser preservado contra a acção contaminante de microrganismos, tais como bactérias e fungos.

Podem ser preparadas soluções dos compostos activos como sais de base livre ou farmacologicamente aceitáveis em água misturados adequadamente com um tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulose. Também podem ser preparadas dispersões em glicerol, polietilenoglicóis líquidos, e misturas destes e em óleos. Em condições normais de armazenamento e de utilização, Estas preparações contêm um conservante para prevenir o crescimento de microrganismos.

O veículo também pode ser um solvente ou meio de

dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), suas misturas adequadas, e óleos vegetais. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pela utilização de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pela utilização de tensio-activos. A prevenção da acção dos microrganismos pode ser realizada através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injectáveis pode ser realizada através da utilização nas composições de agentes de retardamento da absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

As soluções estéreis injectáveis são preparadas incorporando os compostos activos na quantidade necessária no solvente apropriado com uma variedade dos outros ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido por esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando os vários ingredientes activos esterilizados num veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos de preparação preferidos são técnicas de secagem

sob vácuo e liofilização que produzem um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma sua solução previamente esterilizada por filtração.

Após formulação, as soluções serão administradas de um modo compatível com a formulação de dosagem e numa quantidade que seja terapêuticamente eficaz. As formulações são facilmente administradas numa variedade de formas de dosagem, tais como o tipo de soluções injectáveis descritas acima, mas também podem ser empregues cápsulas de libertação do fármaco.

Para administração parentérica numa solução aquosa, por exemplo, a solução deve ser tamponada de forma adequada se necessário e o diluente líquido primeiro tornou-se isotónico com soro fisiológico ou glucose suficiente. Estas soluções aquosas particulares são especialmente adequadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Nesta ligação, o meio aquoso estéril que pode ser empregue será conhecido dos especialistas na técnica à luz da presente revelação. Por exemplo, uma dosagem pode ser dissolvida em 1 mL de solução de NaCl isotónica e adicionada a 1000 mL de fluido de hipodermóclise ou injectada no sítio de infusão proposto, (ver por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edição, páginas 1035-1038 e 1570-1580). Alguma variação na dosagem irá necessariamente ocorrer dependendo do estado do indivíduo a ser tratado. A pessoa responsável pela adminis-

tração irá, em qualquer evento, determinar a dose apropriada para o sujeito individual.

O péptido de BPLP de interesse pode ser formulado numa mistura terapêutica para compreender cerca de 0,0001 até 100 miligramas, ou cerca de 0,001 até 0,1 miligramas, ou cerca de 0,1 até 1,0 ou mesmo cerca de 1 miligrama até 10 miligramas ou mesmo cerca de 10 até 100 miligramas por dose ou próximo. Também podem ser administradas doses múltiplas. Dosagens preferidas são desde cerca de 0,1 µg/kg até cerca de 1 mg/kg, mais preferencialmente desde cerca de 1 µg/kg até cerca de 100 µg/kg, e muito preferencialmente desde cerca de 10 µg/kg até cerca de 100 µg/kg.

Adicionalmente às formulações para administração parentérica, tais como injeção intravenosa ou intramuscular, outras formas farmacêuticamente aceitáveis incluem, e.g. comprimidos ou outros sólidos para administração oral; formulações lipossomais; cápsulas de libertação ao longo do tempo; e qualquer outra forma correntemente utilizada, incluindo cremes.

Estão contempladas outras vias de administração, incluindo soluções nasais ou sprays, aerossóis ou inalantes, ou supositórios vaginais ou rectais e pessários.

Em certas formas de realização, a utilização de lipossomas e/ou nanopartículas está contemplada para a introdução de agentes de péptido de BPLP, assim como

vectores de ácido nucleico ou anticorpos nas células hospedeiras.

### **Aplicações terapêuticas**

Os péptidos BPLP descritos acima, anticorpos contra o péptido de acordo com a invenção ou ácidos nucleicos que codificam para os referidos péptidos BPLP são úteis na prevenção ou tratamento de doenças ou distúrbios, em que a modulação da actividade de uma metalo-ectopeptidase de membrana é contemplada, mais particularmente uma metalopeptidase de zinco de membrana, tal como NEP e APN.

Os substratos de NEP naturais são principalmente as hormonas peptídicas: Encefalinas, Substância P, Bradiquinina, Angiotensina II e Péptido Natriurético Atrial que desempenha um papel chave no controlo da percepção da dor central e periférica, fenómeno inflamatório, troca de minerais e/ou tónus arterial (Roques *et al.*, 1993).

Mais particularmente, a endopeptidase neutra, NEP 24-11, é distribuída em ambos os tecidos nervosos e periféricos de mamíferos, e na periferia é particularmente abundante no rim e na placenta. Nestes tecidos a metalopeptidase NEP da superfície celular participa no processamento pós-secretor e no metabolismo de neuropéptidos, péptidos imunorreguladores sistémicos e hormonas peptídicas. Ao controlar os níveis activos de péptidos reguladores em circulação ou secretados, a NEP modula a sua

acção mediada pelo receptor fisiológica. Assim, a NEP ancorada à membrana está envolvida na regulação da actividade de: péptidos vasoactivos potentes tais como Substância P, Bradiquinina (BK), Péptido Natriurético Atrial (ANP), e Angiotensina II (AII); péptidos inflamatórios/imunorreguladores potentes, tais como Substância P e BK e fMet-Leu-Phe (fMLP); neuropéptidos opióides potentes tais como Met e Leu-Encefalinas (Enk) e troca mineral potente e péptidos reguladores da homeostasia de fluidos tais como ANP, Péptido Natriurético de Tipo C (CNP) e Péptido Natriurético de Tipo B (BNP). Contudo, os níveis destes péptidos são alterados através da formação/degradação induzida por NEP apenas nas regiões onde são libertados tonicamente ou onde a sua libertação é despoletada por um estímulo.

De um ponto de vista integrativo, a actividade biológica de NEP é controlada os níveis activos de sinais peptidérgicos envolvidos na regulação da tensão arterial, em fenómenos inflamatórios e na homeostasia de água-mineral, assim como, no controlo do processamento da dor. De um ponto de vista clínico, isto substantia o facto de NEP ser um alvo para fármaco importante em vários estados de doença. Por exemplo, ao inibir a NEP, desse modo aumentando os níveis e a duração da acção de opióides endógenos centrais ou periféricos, pode ser obtido um efeito analgésico, ou por inibição da formação de AII endógena e inactivação de substância P, BK e ANP, podem ser obtidos agentes anti-hipertensão, natriuréticos e

diuréticos. A principal vantagem de modificar as concentrações de péptidos endógenos através da utilização de inibidores de NEP é que os efeitos farmacológicos são induzidos apenas no receptor estimulado pelos efectores naturais, e estão criticamente dependentes na libertação provocada pela tónica ou estímulo no acontecimento dos efectores naturais em situações de stress ambiental, comportamental e fisiopatológico (Roques *et al*, 1993).

Exemplos de metalopeptidases de membrana de mamífero, para além de NEP, são ECE (Enzimas de Conversão de Endotelina/Endothelin-Converting Enzymes), em particular ECE1 e ECE2, o antigénio de superfície celular de eritrócitos KELL e o produto do gene PEX associado com raquitismo hipofosfatémico ligados ao X, assim como ACE (Enzima de Conversão de Angiotensina/Angiotensin Converting Enzyme) e APN (Aminopeptidase N).

A inibição de ACE e/ou ECE tem uma aplicação significativa no tratamento de hipertensão e na prevenção e tratamento de aterosclerose.

A inibição de APN em conjugação com NEP possui aplicação significativa no tratamento da dor.

A inibição de metalopeptidases relacionadas com a membrana possui efeitos terapêuticos no tratamento de tumores, nomeadamente cancro do ovário, colorrectal, do cérebro, do pulmão, do pâncreas, gástrico e melanoma, e

redução da incidência de metástases, aterosclerose e/ou hipertensão. As inibições das metalopeptidases relacionadas com a membrana também possuem efeitos terapêuticos no controlo da dor. Esses efeitos antinociceptivos sobre a dor aguda são efeitos analgésicos, mas também efeitos sobre a dor inflamatória crónica, tal como artrite ou doença inflamatória do intestino.

Para além disso, espera-se que a inibição de metalopeptidase bacteriana ou viral possua efeitos anti-infecção, desempenhando as metalopeptidases um papel importante na invasão do tecido hospedeiro do agente patogénico e processos imunológicos e inflamatórios, por exemplo os de *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis* e *Legionella pneumophila*.

Para além disso, as metalopeptidases bacterianas, especialmente zinco-metalopeptidases desempenham um papel importante nas doenças provocadas por toxinas proteolíticas, tais como as toxinas de *B. anthracis* (factor de Anthrax Letal) e as neurotoxinas de *C. tetanum* e *botulinum*.

Outras metalopeptidases desempenham um papel importante em várias infecções, tais como infecções provocadas por HIV (FR 2 707 169).

A importância de inibidores de proteinase para o tratamento de doenças bacterianas ou virais pode ser encontrada em J. Potempa e J. Travis.

Os diferentes papéis das metalopeptidases são revelados em Turner *et al*, 2001; Kenny *et al*, 1977; Kenny *et al*, 1987; Beaumont *et al*, 1996.

Um objectivo da presente invenção é a utilização dos péptidos terapêuticos acima descritos como agentes analgésicos através da inibição de NEP aos níveis periférico, espinal e/ou supraespinal e desse modo aumentando os níveis e a duração da acção de opióides endógenos central ou periférico, incluindo encefalinas.

A prevenção ou o tratamento da dor, especialmente dor aguda e crónica, dor inflamatória visceral e neuropática, está contemplada.

A prevenção ou o tratamento de qualquer desequilíbrio hidro-mineral é também um objectivo da invenção. Entre os distúrbios alvo, pode citar-se osso, dentes, rim, paratiróide, pâncreas, intestino, mucosa do estômago, próstata, e distúrbios da glândula salivar que são provocados pelo desequilíbrio hidro-mineral.

Em particular, o distúrbio pode ser seleccionado a partir do grupo que consiste em hiper ou hipo-paratiróidismo, osteoporose, pancreatite, litíase da glândula submandibular, nefrolitíase e osteodistrofia.

A prevenção ou tratamento de distúrbios debili-

tados interpessoal e comportamental é de interesse adicional. Vários distúrbios mentais são descritos no documento WO 02/051434.

Em particular, a invenção é retirada em qualquer distúrbio seleccionado a partir do grupo que consiste em distúrbio de evitamento, distúrbio da diminuição da atenção, distúrbio autista, distúrbio do défice da atenção, distúrbio da hiperactividade, distúrbio da excitação, hospitalismo, funcionamento interpessoal dificultado e relacionamento com o mundo externo, distúrbio da personalidade esquizóide, esquizofrenia, distúrbio depressivo, interesse no ambiente diminuído, actividade social dificultada ligada com a sexualidade, e comportamento sexual dificultado, incluindo ejaculação precoce e hiperactividade sexual.

As doenças em que se considera a modulação de uma metalopeptidase de membrana também inclui hipertensão, aterosclerose, tumor, artrite inflamatória e doença do intestino.

O tratamento de infecções está também contemplado. Especialmente, a importância dos inibidores da proteinase para o tratamento de doenças bacterianas ou virais pode ser encontrada em J. Potempa e Travis.

Os péptidos de BPLP, são também úteis os anticorpos ou ácidos nucleicos descritos acima para controlar as respostas imunoinflamatórias.

Os péptidos, anticorpos ou ácidos nucleicos como definidos acima são também úteis como um agente natriurético ou um agente diurético.

Outro objectivo da presente invenção é a utilização dos péptidos acima descritos como um substituto no tratamento do abuso de drogas, nomeadamente o abuso da droga morfina.

Na verdade, os estudos sugeriram que a vulnerabilidade para o abuso de drogas e o desenvolvimento de recompensa e dependência de droga é pelo menos em parte, um resultado de modificações pré-existentes ou induzidas e/ou defeito do sistema opióide endógeno. A este respeito, utilizando o péptido de BPLP para potenciar os efeitos de encefalinas endógenas irão reduzir os vários efeitos colaterais (sinais somáticos do desmame) produzidos pela interrupção da administração crónica de morfina ou heroína.

De acordo com a invenção, reduzir o efeito inibidor dos péptidos de BPLP na NEP pode ser desejada, e.g. utilizando um anticorpo contra a proteína BPLP ou péptidos. Este aumento da actividade de NEP é particularmente vantajosa no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como uma doença ou distúrbio associada a amiloidose. Na verdade, foi demonstrado que os inibidores da neprilisina (uma endopeptidase neutra, NEP ou encefalinase) por inibidor sintético, aumenta os níveis de

amilóide  $\beta$  (Newell *et al*, 2003). Leissring *et al*, 2003 relataram ainda que a sobre-expressão transgénica da neprilisina nos neurónios reduz significativamente os níveis de A $\beta$  no cérebro, retarda ou previne completamente a formação de placas amilóides e a sua citopatologia associada, e recupera a letalidade prematura presente em murganhos transgénicos para a proteína precursora amilóide.

Uma doença ou distúrbio está associado com a amiloidose quando os depósitos amilóides ou placas amilóides se encontram em, ou na proximidade dos tecidos afectados pela doença, ou quando a doença é caracterizada pela sobre-produção de uma proteína que é ou que se pode tornar insolúvel. As placas amilóides podem provocar efeitos patológicos directamente ou indirectamente através de mecanismos conhecidos ou desconhecidos. Exemplos de doenças amilóides incluem, mas não estão limitados a, doenças sistémicas, tais como doenças inflamatórias crónicas, mieloma múltiplo, macroglobulinemia, poloneuropatia amilóide familiar (Portuguesa) e cardiomiopatia (Dinamarquesa), amiloidose sistémica senil, polinefropatia amilóide familiar (Iowa), amiloidose familiar (Finlandesa), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, nefropatia amilóide familiar com urticária e surdez (síndrome Muckle-Wells), carcinoma medular da tiróide, amilóide atrial isolada, e amiloidose associada à hemodiálise (HAA); e doenças neurodegenerativas.

O termo "doença neurodegenerativa" refere-se a

uma doença ou distúrbio do sistema nervoso, particularmente envolvendo o cérebro, que se manifesta com sintomas característicos de mal funcionamento do cérebro ou nervo, e.g., lapsos ou defeitos de memória a curto termo ou a longo termo, demência, defeitos cognitivos, problemas de equilíbrio e coordenação, e deficiências emocionais e comportamentais. A presente invenção está mais particularmente relacionada com doenças neurodegenerativas que estão associadas a amiloidose. Essas doenças estão "associadas com a amiloidose" quando as amostras histopatológicas (biopsia) do tecido cerebral dos indivíduos que demonstram esses sintomas revelem formação de placa amilóide. As amostras de biopsia do cérebro, especialmente do cérebro humano, são obtidas com maior dificuldade a partir de indivíduos vivos ou podem não estar disponíveis de todo, frequentemente, a associação de um sintoma ou sintomas de doenças neurodegenerativas com a amiloidose é baseada em critérios diferentes da presença de depósitos amilóides, tais como placas ou fibrilhas, numa amostra de biopsia.

Numa forma de realização específica, de acordo com a presente invenção a doença neurodegenerativa é a doença de Alzheimer (AD). Noutras formas de realização, a doença pode ser a doença rara Sueca caracterizada por uma mutação dupla de KM para NL na proteína precursora amilóide a (APP) próximo do terminal amino da porção AP da APP. Outra dessas doenças é a hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (HCHA ou HCHWA)-tipo Holandês. Outra dessas doenças conhecidas na técnica e dentro do âmbito da

presente invenção inclui, mas não estão limitadas a, angiopatias amilóides cerebrais esporádicas, angiopatias amilóides cerebrais hereditárias, síndrome de Down, Parkinson-demência de Guam, e angiopatias amilóides assintomáticas relacionadas com a idade.

Num outro aspecto, a doença neurodegenerativa é uma encefalopatia espongiforme sub-aguda, tal como, mas não limitado a, scrapie, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Gerstmann-Straussler, kuru, doença degenerativa crónica de veados e alces, encefalopatia espongiforme bovina do gado, e encefalopatia transmissível de marta.

A invenção revela ainda a utilização de um agente que modula a interacção entre a proteína BPLP endógena ou produto de maturação, e.g. QRFSR, e uma metalopeptidase de membrana para a preparação de uma composição terapêutica para prevenir ou tratar doenças em que se considera uma modulação da actividade da referida metalopeptidase da membrana.

#### **Métodos de rastreio**

Os métodos que permitem que uma pessoa especialista na técnica seleccione e purifique os compostos candidatos que se ligam aos mesmos alvos e possuem uma actividade biológica agonista ou antagonista da proteína BPLP ou seus produtos de maturação, e.g. o péptido QRFSR, são aqui descritos adiante.

O composto candidato pode ser uma proteína, um péptido, uma hormona, um anticorpo ou um composto sintético que é um péptido ou uma molécula não peptídica, tal como qualquer composto que pode ser sintetizado através dos métodos convencionais da química orgânica.

A invenção proporciona um método *in vitro* para o rastreio de compostos quanto à sua capacidade para se ligar à NEP, compreendendo os passos de:

- a) incubar um composto candidato com uma célula que expressa NEP, na presença do produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção ;
- b) determinar a capacidade do composto candidato para competir com o produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção, para ligação a NEP.

Os ensaios de ligação do composto candidato são geralmente realizadas a 4 °C até 25 °C ou 37 °C.

A célula que expressa NEP pode estar numa cultura de células, tal como uma cultura de células confluyente em monocamada, ou um espécime de órgão alvo ou uma amostra de tecido (e.g. criosecções, cortes, preparações de membrana ou homogenatos brutos) que contêm sítios de ligação a NEP para a proteína BPLP ou um seu produto de maturação, e.g. o péptido QRFSR.

Uma amostra de tecido preferido que é utilizada nos métodos de rastreio de acordo com a presente invenção é uma preparação de membrana ou cortes da medula espinal de um mamífero, um tecido conhecido a ser apropriado ou medição da actividade de NEP.

Outras amostras de tecido preferido que podem ser utilizadas nos métodos de rastreio de acordo com a presente invenção são todas preparações de tecido periférico que são conhecidos por serem enriquecidos na peptidase NEP e/ou para serem alvos para a proteína BPLP ou um seu produto de maturação, e.g. o péptido QRFSR. Por exemplo, pode utilizar-se a medula externa renal de mamífero, placenta, testículos, próstata e osso. Por exemplo, pode ser aplicado um procedimento para tecidos e/ou células de origem de murganho, rato ou humana ou linhas celulares transfectadas com cDNA de metalo-ectopeptidase, em particular cDNA de NEP, especialmente cDNA de NEP humano.

A proteína BPLP ou seu produto de maturação (ou o péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maduros) é preferencialmente marcado, e.g. através de um marcador radioactivo ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  etc...) ou marcador não radioactivo (digoxigenina, CyDye-európio, fluoresceína, etc..). É então incubado com a célula que expressa NEP durante um tempo suficiente e nas condições para que a ligação específica ocorra.

O marcador que se liga especificamente à célula pode ser então quantificado na presença de várias concentrações do referido composto candidato, por exemplo desde  $10^{-10}$  até  $10^{-5}$  M.

Consequentemente, a presente invenção proporciona ainda um processo para o rastreio de um composto que se liga especificamente a NEP que compreende os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar uma espécie de órgão ou uma amostra de tecido (tal como criossecções ou cortes ou preparações de membrana ou homogenatos brutos) que expressam NEP;
- b) adicionar o composto candidato a ser testado em competição com concentração de meia saturação do produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção;
- c) incubar a cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido do passo a) na presença do composto candidato durante um tempo suficiente e em condições para que ocorra a ligação específica;
- d) quantificar o marcador que se liga especificamente à cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido na presença de várias concentrações do composto candidato (preferencialmente  $10^{-10}$  até  $10^{-5}$  M).

No referido processo acima, uma concentração de meia saturação é a concentração da proteína BPLP ou seu produto de maturação marcados, e.g. o péptido QRFSR (ou o péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maduros) que se liga a 50% dos sítios de ligação de NEP.

Este processo também permite definir a afinidade relativa do composto candidato comparado com a proteína BPLP, ou produtos de maturação, e.g. afinidade para QRFSR (ou o péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maduros).

Outro objectivo da presente invenção é um processo para determinar a afinidade relativa dos compostos ligando que se liga especificamente a NEP, compreendendo o processo os passos a), b), c) e d) do processo acima para cada composto candidato e compreendendo ainda o passo e) de comparar a afinidade de cada composto candidato quantificado no passo d) àquela dos outros compostos candidatos.

Outro objectivo da presente invenção é um processo para determinar a afinidade de um composto que se liga especificamente a NEP; compreendendo os passos de:

a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido (tais

como criossecções ou cortes ou preparações de membrana ou homogenatos brutos) expressando NEP;

b) adicionar o composto candidato que foi previamente marcado com um marcador radioactivo ou um marcador não radioactivo;

c) incubar a cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido do passo a) na presença do composto candidato marcado durante um tempo suficiente e em condições para a ligação específica ocorrer; e

d) quantificar o marcador ligado especificamente à cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido na presença de várias concentrações do composto candidato marcado (preferencialmente  $10^{-10}$  até  $10^{-5}$  M).

O composto candidato é marcado, *e.g.* através de uma proteína BPLP, seu produto de maturação é preferencialmente marcado, *e.g.* através de um marcador radioactivo ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  etc...) ou não radioactivo (digoxigenina, CyDye-európio, fluoresceína, etc..). É então incubado com a célula que expressa NEP durante um tempo suficiente e nas condições para a ligação específica ocorrer.

Pode ainda comparar-se a afinidade de cada composto candidato quantificado para um dos outros compostos candidatos, de modo a que a afinidade relativa do composto candidato que se liga especificamente ao sítio de ligação de NEP para a proteína BPLP ou um seu produto de maturação, *e.g.* o péptido QRFSR, é determinado.

A invenção proporciona ainda um método *in vitro* para rastrear compostos para a sua capacidade actuar como agonistas ou antagonistas de um produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção na actividade de NEP, cujo método compreende os passos de:

- a) incubar um composto candidato com uma célula que expressa NEP, na presença de (i) um produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção, e (ii) um substrato de NEP;
- b) determinar a endoproteólise do substrato de NEP pela NEP, em que uma endoproteólise aumentada na presença do composto candidato, em comparação com a endoproteólise na ausência do composto candidato, é indicativo de uma actividade antagonista; embora uma endoproteólise diminuída na presença do composto candidato, em comparação com a endoproteólise na ausência do composto candidato, é indicativa de uma actividade agonista.

Como aqui utilizado, um agonista de produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção é uma molécula que possui a capacidade para inibir uma actividade de metalo-ectopeptidase, especialmente actividade de NEP.

Como aqui utilizado, um antagonista de um produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção é uma molécula que possui a capacidade para aumentar uma actividade de metalo-peptidase, especialmente a actividade de NEP.

Alternativamente, a actividade de agonista ou antagonista do composto candidato pode ser avaliado na determinação das alterações metabólicas induzidas por este composto candidato no seu alvo, tal como a síntese e/ou libertação dos metabolitos de mensageiro primário ou secundário como um resultado de um sinal de transdução através das cinases de proteína ou adenilato ciclase e a activação de uma proteína da família G.

Em formas de realização particulares, a presente invenção também pertence a um processo para o rastreio de um composto que é um agonista de um produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção, compreendendo os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido (tal como criosecções ou cortes ou preparações de membrana ou homogenatos brutos) expressando NEP;
- b) incubando a cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido do passo a) em concentrações que permitem a medição da actividade enzimática de NEP na presença do composto candidato (preferencialmente  $10^{-10}$  até  $10^{-5}$  M), uma concentração de meia saturação de um produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção e um substrato de NEP durante um tempo suficiente para a endoproteólise do substrato de NEP substrato ocorrer em condições de velocidade inicial;

c) quantificar a actividade da NEP presente no material biológico do passo a) através da medição dos níveis de endoproteólise do substrato de NEP, respectivamente na presença ou na ausência do composto candidato e na presença ou na ausência do produto de maturação de BPLP, ou o péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maduros.

No referido processo acima, uma concentração de meia saturação é a concentração do produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção que resulta numa redução em metade da degradação do substrato de NEP.

Outro objectivo da presente invenção compreende um processo para o rastreio de um composto que é um antagonista de um produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção, compreendendo os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido (criosecções ou cortes ou preparações de membrana ou homogenatos brutos) expressando NEP;
- b) incubar a cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido do passo a) a concentrações que permitem a medição da actividade enzimática de NEP em condições de velocidade inicial na presença de uma concentração submáxima

de um produto de maturação de BPLP de acordo com a invenção e um substrato de NEP, na presença do composto candidato durante um tempo suficiente para que a endoproteólise do substrato de NEP ocorra em condições de velocidade inicial;

c) quantificar a actividade da NEP presente no material biológico do passo a) através da medição dos níveis de endoproteólise do substrato de NEP, respectivamente na presença ou na ausência do composto candidato e na presença ou na ausência do produto de maturação de BPLP.

Numa forma de realização preferida do referido processo acima, a concentração sub-máxima é uma concentração de péptido que resulta numa redução de pelo menos 50% e preferencialmente de pelo menos 75% da degradação do substrato.

Os exemplos e as figuras abaixo ilustram a invenção sem limitar o seu âmbito.

#### **LEGENDAS DAS FIGURAS:**

A Figura 1 apresenta o perfil de HPLC de permutacatiónica representativa do marcador  $^3\text{H-YQRFSSR}$  adicionada a 2,5 mL de extracto salivar metanol-ácido correspondendo a 2,5 mL de saliva humana. A recuperação do pico radioactivo principal foi avaliada em 75-84% (barras a ponteados).

A Figura 2 apresenta o perfil de HPLC de permuta catiónica representativa de um extracto salivar de metanol-ácido obtido a partir de 7 mL de saliva humana. As fracções foram analisadas para a sua potência inibidora da endoproteólise de substância P por actividade de ecto-endopeptidase humana (linha da célula LNCaP).

A Figura 3 é um perfil de HPLC de fase reversa representativa das fracções 13-14 principais de HPLC-EC activo (barras ponteadas). As fracções foram analisadas quanto à sua potência inibidora da endoproteólise da substância P pela actividade da ecto-endopeptidase humana (linha celular LNCaP).

A Figura 4 é um perfil de HPLC de fase reversa representativo das fracções principais de HPLC-RP activas. As fracções foram analisadas quanto à sua potência inibidora da endoproteólise da substância P através da actividade de ecto-endopeptidase humana (barras pretas) e sua absorvência a 274 nm (linha preta).

A Figura 5 apresenta o efeito do péptido QRFSR de BPLP na degradação da substância P pela actividade de ecto-endopeptidase humana (linha celular LNCaP), a concentração eficaz do péptido QRFSR variou desde 1 até 25  $\mu\text{M}$  e sendo a metade do valor máximo a 11  $\mu\text{M}$ .

A Figura 6 apresenta o efeito de YQRFSR derivado do péptido hBPLP-QRFSR na degradação da subs-

tância P pela actividade de ecto-endorpeptidase humana (linha celular LNCaP), a concentração eficaz do péptido YQRFSS variou desde 5 até 50  $\mu\text{M}$  e sendo a metade do valor máximo a 30  $\mu\text{M}$ .

A Figura 7 apresenta o efeito de YQRFSS derivado do péptido hBPLP-QRFSS sobre a degradação da substância P pela actividade da ecto-endorpeptidase NEP de rato (tecido renal), a concentração eficaz do péptido YQRFSS variou desde 5 até 75  $\mu\text{M}$  e sendo a metade do valor máximo a 38  $\mu\text{M}$ .

A Figura 8 é uma análise cromatográfica de RP-HPLC do péptido YQRFSS.

#### **EXEMPLOS:**

O estudo foi concebido para pesquisar inibidores naturais de metalo-ectopeptidases, especialmente de NEP e/ou APN, particularmente nas secreções salivares humanas. A estratégia para a detecção e o isolamento deste produto foi baseado no isolamento de componentes salivares de baixa massa molecular, que inibe a endoproteólise de substrato sensível a NEP por células humanas que expressa a NEP humana ancorada à membrana. Os inventores desenvolveram os modelos de detecção funcional (preparações de membranas de células LNCaP e HEK humanas que expressam NEP) e de isolamento molecular (sistemas de cromatografia de HPLC), para a identificação pela análise de sequências do(s) inibidor(es) de ectopeptidase(s) endógena(s) naturais em humanos, *i.e.*, o(s) homólogo(s) funcionais salivares endógenos da sialorfina de rato.

**EXEMPLO 1: Preparação de saliva humana**

O protocolo da investigação clínica estabelecido com o "centre de recherche Vaccinale et Biomedicale" do Instituto Pasteur I, número de acesso: 2045, recebeu o acordo do comité CCPPRB (PARIS-COCHIN) e as amostragens de saliva humana de 10 machos saudáveis voluntários, teve o início em Maio de 2003 e continuou até Outubro de 2003. A saliva foi recolhida em tubo "microsorp" previamente arrefecidos contendo aprotinina (1000 KIU/mL) Pefabloc (0,4 mM) e HCl (0,1 N) de concentração final; assumindo que este meio inibe as actividades de proteólise. Assim, as amostras de saliva foram armazenadas a -80 °C até ser realizado o processo de extracção com metanol.

**EXEMPLO 2: Materiais e modelos experimentais para a inibição de NEP****1 - Fontes de ectopeptidases humanas NEP e APN:**

Foram descritas várias linhas celulares humanas como expressando NEP assim como outros membros da família metaloectopeptidase; entre elas estão uma linha celular de osteoblastos, MG-63 (osteossarcoma), uma linha celular de trofoblasto, BeWo (coriocarcinoma da placenta), uma linha celular de epitélio da próstata, LNCaP (adenocarcinoma) e uma linha celular de enterócito, Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal). As condições de cultura em meio definido útil

para as análises de farmacologia celular foram primeiro desenvolvidas. Em segundo lugar, os inventores confirmaram, utilizando transferências de Northern e análises imunocitoquímicas, que as LNCaP e BeWo foram as únicas linhas celulares capazes de expressar NEP (mRNA e proteína da superfície celular) em condições de meio de cultura definidas (*i.e.*, RPMI contendo insulina, transferina e selênio, GIBCO) e após indução por DHT (di-hidrotestosterona) e forskolina, respectivamente e finalmente, no modelo experimental de incubações estáticas de preparações de membrana com origem a partir destas células, os inventores definiram os parâmetros que permitem analisar a endoproteólise mediada por NEP humana da substância P nas condições de medição da velocidade inicial, *i.e.* 100 pM/min/ $\mu$ g de proteínas de membrana de células LNCaP (10 vezes menos de actividade específica menor para BeWo). A actividade da membrana de LNCaP foi inibida na presença de inibidor de NEP sintético específico, tal como tiorfano (62% para a potência inibidora máxima a 500 nM). Em contraste, a bestatina (25  $\mu$ M) e captopril (10  $\mu$ M) que bloqueia as actividades da aminopeptidase (APN, APB.) e da enzima que converte a angiotensina (ACE), respectivamente, não inibiu a hidrólise da substância P por ectopeptidases de superfície celular; indicando desse modo que nas condições experimentais, a degradação extra celular da substância P foi principalmente provocada pela actividade da endopeptidase NEP localizada na superfície destas células.

Adicionalmente, o modelo *in vitro* utilizando as preparações de membrana de células HEK transfectadas com cDNA de NEP humano (as células HEK não expressam metaloectopeptidase) e NEP humana recombinante solúvel (sem o citosol N-terminal e segmento de transmembrana) também foram desenvolvidos.

## 2 - Substratos e inibidores:

As actividades de amino- e endo-ectopeptidase de membrana *in vitro*, de membranas celulares humanas são ensaiadas *in vitro* através da medição da degradação dos seguintes substratos sintéticos e naturais:

a/ *substratos fluorogénicos específicos sintéticos:*

- Mca-R-P-P-G-F-S-A-F-K (Dnp)-OH e/ou Suc-A-A-F-Amc (NEP) (R&D systems e Bachem)
- Ac-A-Amc (APN) (Bachem)

b/ *Substratos fisiológicos:*

- Substância P tritiada modificada [(3,4<sup>3</sup>H)Pro<sup>2</sup>-Sar<sup>9</sup>-Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substância P (DuPont-NEN) e Substância P Nativa: R-P-K-P-Q-Q-F-F-G-L-M (NEP-DPPIV-ACE) (Peninsula-Biovalley)
- Met-encefalina nativa: Y-G-G-F-M (NEP-APN) (Peninsula-Biovalley) Medindo a hidrólise destes substratos

através de peptidases de membrana celular na presença e ausência de diferentes inibidores de peptidase sintética selectiva disponível avaliou a especificidade do ensaio de peptidase:

- Tiorfano, Fosforamidon (NEP) (Sigma e Roche)
- Bestatina, Amastatina (APN) (Calbiochem)
- DPPIV inibitor II (DPPIV) (Calbiochem)
- Captopril (ACE) (Sigma)

### 3 - Medição das actividades de peptidase

As actividades de ectopeptidase foram medidas de acordo com o protocolo desenvolvido e estabelecido para a caracterização funcional da sialorfina de rato (Rougeot *et al.*, 2003). Resumidamente, para as preparações de membrana, as células foram homogeneizadas a 4 °C em 10 volumes (vol./p.) de Tris/HCl a 50 mM tamponado a pH 7,1. Uma primeira centrifugação a 1000 X g e 5 °C durante 5 min permite remover os resíduos celulares e os núcleos no sedimento. Uma segunda centrifugação a 100 000 X g e 5 °C durante 30 min concentra a fracção de membrana no sedimento, que irá ser superficialmente lavado três vezes em tampão Tris/HCl frio, ressuspenso em tampão fresco, fraccionado e armazenado a -80 °C enquanto se espera que seja utilizado como fonte enzimática. A determinação das proteínas foi realizada utilizando o ensaio da proteína Bio-Rad DC com Albumina do Soro Bovino (BSA) como o padrão.

A hidrólise de substratos foi medida através da

monitorização da taxa de metabolismo em condições de medição de velocidade inicial na presença e ausência de inibidores específicos. Estes foram adicionados ao meio de pré-incubação. A mistura de reacção convencional consistiu em membranas celulares num volume final de 200 µL de Tris-HCl a 50 mM pH 6,5-7,2. O substrato foi adicionado após pré-incubação durante 10 min e a digestão foi realizada durante 20 min a 25 °C num banho de água com agitação constante. A reacção foi terminada através de arrefecimento para 4 °C e adicionando HCl (concentração final de 0,3 N). Os tubos de reacção foram então centrifugados (4 700 X g durante 15 min a 4 °C) e o restante substrato intacto e seus metabolitos foram medidos.

No caso da utilização de substratos naturais, a substância P ou Met-encefalina, os produtos da reacção são isolados e quantificados de acordo com as suas características diferenciais hidrofóbicas:

- foram utilizados cartuchos C-18 Sep-Pak (Waters) para analisar a hidrólise de substância P marcada com radioactividade. Os metabolitos <sup>3</sup>H foram isolados por eluição com H<sub>2</sub>O-0,1% TFA e depois com 25% de metanol-0,1% de TFA (4 mL cada). O substrato tritiado intacto foi eluído com 75-100% de metanol-0,1% de TFA (4 mL).
- Foi utilizada RP-HPLC acoplada a um espectrofotómetro para analisar a hidrólise de Met-encefalina, (coluna C-18 LUNA, AIT). Eluição com um gradiente linear durante 30-min desde 0,1% de TFA em água até 0,1% de

TFA em 100% de acetonitrilo, a 1 mL/min, foram separados os dois metabolitos de Met-encefalina (YGG:  $5,8 \pm 0,2$ ; FM:  $12,8 \pm 0,1$  min de tempo de retenção) e o substrato intacto (YGGFM:  $18,8 \pm 0,2$  min). As suas identidades e quantidades relativas (altura do pico) foram verificadas monitorizando o fluxo de saída da coluna a 264 nm (L3000, Merck).

- O desaparecimento do substrato de Met-encefalina inicial foi também quantificado por radioimunoensaio (RIA). O ensaio utilizado anti-soro anti-Met encefalina (Gros *et al.*, 1978) e  $^{125}\text{I}$ -Met-encefalina (80 TBq/mmol, NEN); detectou concentrações nanomolares de Met-encefalina na presença de concentrações micromolares de metabolitos Tyr-Gly-Gly e Phe-Met. A radioactividade de cada fracção foi determinada através de espectrometria de cintilação líquida.

No caso da utilização de substratos sintéticos, a cinética do surgimento do sinal fluorescente (intensidade e polarização) foi directamente analisada utilizando um espectrofluorímetro de multi-poços; a intensidade do sinal é directamente proporcional à quantidade de metabolitos formados durante a reacção.

### **EXEMPLO 3: Purificação de saliva humana e cromatografia**

O protocolo de extracção e purificação dos componentes salivares humanos mimetizam aquele que foi

desenvolvido e estabelecido para a caracterização molecular da sialorfina da saliva de rato (Rougeot *et al.*, 1994), e os extractos e fracções cromatográficas foram analisados quanto à sua capacidade para inibir a hidrólise do substrato fisiológico, substância P, pelas membranas celulares humanas contendo NEP.

Extracção e purificação dos compostos salivares humanos potencialmente reguladores da actividade da encefalinase. Resumidamente, após descongelação a +4 °C, as amostras de saliva foram tratadas de acordo com o seguinte procedimento:

- Procedimento de extracção metanol-ácido: Extracção de componentes de baixa massa molecular em metanol-ácido a 4 °C; para 1 volume de saliva foram adicionados 4 volumes de metanol contendo 0,1% de solução de ácido trifluoroacético (TFA). Este primeiro passo realiza a eliminação de proteínas de elevado peso molecular (incluindo as enzimas de degradação), que são inactivados e precipitados em meio de ácido e metanol, respectivamente e permite a solubilização dos constituintes salivares de baixo peso molecular ( $\leq 10$  Kda). A mistura de metanol foi rapidamente misturada em vórtice e centrifugada durante 15 min a +4 °C e 12 000 g; o metanol foi removido do sobrenadante após liofilização a -110 °C.

- Cromatografia de permuta catiónica de HPLC (HPLC-EC):  
A saliva extraída com metanol foi solubilizada no solvente A, *i.e.*, acetato de amónio a 10 mM pH 4,3, e injectada numa coluna de HEMA-IEC BIO-1000 carboximetilo (Alltech). Os componentes foram eluídos e isolados de acordo com a sua característica catiónica, num gradiente linear de dois passos de 10-500 mM e 500-900 mM de acetato de amónio a pH 4,7, respectivamente e a 1 mL/min de taxa de fluxo. As fracções de 2 mL foram recolhidas e testadas após a liofilização para a sua potência inibidora da actividade de ectopeptidase humana (LNCaP).

A qualidade e a recuperação de extracção e sucessivas cromatografias foram estimadas utilizando um padrão interno (o péptido tritiado:  $^3\text{H}$ -YQRF $\text{SR}$ ) adicionado a uma amostra salivar representativa, como ilustrado na Figura 1; a recuperação do marcador adicionado à amostra extraída correspondente a 2,5 mL de saliva humana foi avaliada a 75-84%. Cromatografia de permuta catiónica de HPLC de saliva extraída com metanol (Figura 2; perfil representativo de um extracto salivar correspondente a 7 mL de saliva humana) revelou claramente a presença de dois componentes salivares moleculares principais, que foram eluídos no perfil de gradiente de acetato de amónio do primeiro passo (10-500 mM) em tempos de retenção de 26-28 e 36-38 min, respectivamente, e que inibiram em  $\geq 90\%$  a endoproteólise da substância P por peptidases ligadas à membrana humanas (Os 2 picos activos visualizados na figura

2 com os tempos de retenção de 6 e 48 min correspondem à exclusão e ao volume total da coluna, respectivamente).

- Cromatografias de HPLC de fase reversa (RP-HPLC). As fracções activas das HPLC-EC anteriores foram solubilizadas no solvente A [0,1% TFA em H<sub>2</sub>O] e injectadas numa coluna Synergi Max-RP (Phenomenex). Os componentes das amostras foram eluídos (1 mL/min) com um gradiente linear de 1-99% de solvente B [acetonitrilo-TFA, 100-0,1, em vol.]. As fracções de 1 mL foram recolhidas e analisadas após liofilização para a sua potência inibidora em direcção à actividade de ectopeptidase humana da superfície celular (LNCaP). A recuperação do marcador interno foi avaliada em 61%. O fraccionamento por RPHPLC (Figura 3), das formas moleculares activas isoladas das fracções 13-14 (26-28 min. de tempo de retenção) da HPLC-EC anterior, demonstrou a presença de duas populações moleculares principais inibindo a actividade de endopeptidase humana, e que foram eluídas dentro do perfil de gradiente de acetonitrilo aos tempos de retenção de 23-25 e 28-30 min, respectivamente.

Estas fracções sofreram outro processo de purificação numa coluna synergi Max-RP-HPLC nova, através de eluição com um gradiente linear de 1-99% do solvente B [100% de metanol-0,1% de TFA]. Os eluatos da coluna foram recolhidos em tubos microsorb a intervalos de 1-min e as fracções foram testadas após liofilização quanto à sua

actividade inibidora de NEP. Como apresentado na figura 4, foram determinadas duas formas moleculares principais, que inibiram a endoproteólise da substância P por ectopeptidases humanas, foram por isso isoladas com tempos de retenção de 20-21 e 29-30 min respectivamente, e as suas sequências de aminoácidos foram determinadas.

- Ciphergen ProteinChip e análises de sequências de aminoácidos. A análise da sequência N-terminal foi realizada por degradação de Edman automatizada utilizando sequenciadores de péptidos Applied Biosystems (plate-forme d'Analyse et de Microséquençage des Protéines, Institut Pasteur). A forma molecular que elui da última RP-HPLC a 18 min de tempo de retenção (fracção 20) correspondendo a 690 e 769,5 Da de massa molecular e to à seguinte sequência de cinco resíduos de aminoácidos: QRFSR. A fracção que elui aos 26 min de tempo de retenção (fracção 28) correspondeu a dois componentes moleculares de 622-666 Da e 6495 Da, respectivamente; a determinação de aminoácidos da massa molecular mais elevada indicou que corresponde a uma sequência salivar de Polipéptido Básico Rico em Prolin, a sequência de 61 aminoácidos humana de PRP-E (Isemura et al., 1982).

Por analogia com a sialorfina salivar de rato, estes dados proporcionam evidência directa para a existência de um tipo sialorfina salivar humana, um pentapéptido QRFSR de estrutura e função fortemente relacionada com o pentapéptido QHNPR de rato e que é secretado

para as secreções salivares humanas; elas apoiam a tese de que QRFSR é o produto maduro proteoliticamente processado a partir de uma proteína precursora de um modo semelhante à via de maturação de SMR1 e precursores do péptido-hormona. Para além disso, como para o péptido QHNPR de rato, o péptido QRFSR excretado parece ser acumulado nas secreções salivares humanas em diferentes formas, entre as quais as formas livres incluindo provavelmente uma forma de sal de acetato e as formas complexas envolvendo interações hidrofóbicas com PRP-E salivar.

#### **EXEMPLO 4: Síntese e teste do péptido QRFSR**

O péptido QRFSR foi sintetizado e analisado quanto à sua capacidade para inibir a degradação do substrato de NEP fisiológico, a substância P, *in vitro*, no modelo experimental de incubação estática de membranas celulares LNCaP humanas. O péptido QRFSR, inibiu a endoproteólise extra-celular da substância P mediada por NEP humana expressa na superfície de células epiteliais da próstata humana. A concentração eficaz para QRFSR variou desde 1 até 25  $\mu\text{M}$ , e sendo o valor de metade do máximo (IC50) a 11  $\mu\text{M}$  (Figura 5). Surpreendentemente, mas de um modo redundante em relação ao que foi observado com sialorfina de rato em relação à NEP humana, a eficiência inibidora do péptido de QRFSR humano em relação a actividade de NEP renal de rato é pelo menos 10-vezes inferior àquela obtida em relação à NEP de superfície de célula humana (LNCaP). Surpreendentemente, o derivado do péptido YQRFSR,

que foi sintetizado por trítio marcado e conjugação imunogénico para o desenvolvimento de anticorpos e sistema de detecção de imunoensaio, pareceu exibir uma eficácia inibidora relativamente semelhante em relação às actividades de ecto-endopeptidase humana e de rato (Figuras 6 e 7).

Tabela: Potência inibidora de péptidos naturais e derivados humanos e de rato em relação a ambas as actividades de ectoendopeptidase humana e de rato:

Ectoendopeptidase de	Células humanas	Tecidos de rato
QHNPR	4 até 40 PM	0,4 até 4 $\mu$ M
QHNP		$\geq 50$ $\mu$ M
QRFSR	2,5 até 25 $\mu$ M	$\geq 100$ $\mu$ M
YQRFSR	5 até 50 $\mu$ M	5-75 $\mu$ M
QRGPR	$\geq 90$ $\mu$ M	
QRGPRGP	$\geq 90$ $\mu$ M	

Para além disso, o péptido QRGPR (20 - 90  $\mu$ M) que pode estar potencialmente amadurecido a partir dos produtos do gene hPB, não teve nenhum efeito sobre a endoproteólise da substância P induzida pelas membranas celulares humanas de LNCaP; este resultado leva os inventores a propor que a natureza de três aminoácidos centrais do pentapéptido inibidor de NEP natural (Q-Nterminal e R-Cterminal comum) é determinar a assinatura para a afinidade e/ou especificidade da sua interacção funcional com ectoendopeptidase NEP. Para além disso, apesar da forte analogia da sequência de aminoácidos primária entre a NEP de rato e humana ( $\neq$

85%), os inventores observaram uma especificidade relativa na interacção funcional de ambos o inibidor natural-pentapéptido, respectivamente o QHNPR de rato e QRFSR humano. Todos estes resultados proporcionam evidência para a existência de uma especificidade conformacional na secundária e terciária de ambas as ectoenzimas; a determinação da estrutura cristalina do complexo binário formado com a sialorfina ou seus derivados e a NEP humana deve permitir ganhar visão sobre o modo de ligação destes inibidores competitivos naturais.

Os inventores utilizaram o péptido  $^3\text{H}$ -YQRFSR tritiado para estabelecer os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, deste peptidomimético funcional humano de sialorfina de rato *in vivo* em ratos machos adultos (biodistribuição-biodisponibilidade-eliminação) assim como para definir o seu mecanismo do metabolismo e o *turnover in vivo* e *in vitro*, (Figura 8). As características cromatográficas de RPHPLC revelaram que:

- o péptido YQRFSR não é metabolizado por membranas de células humanas contendo NEP, na verdade 93% foi recuperado como péptido intacto contra 94% na ausência de membranas metabolizantes,
- nas mesmas condições experimentais, o péptido YQRFSR inibe em 70% a endoproteólise da substância P por estas membranas celulares humanas.

Por isso, o YQRFSR é útil para a investigação da

actividade analgésica dos produtos de maturação de BPLP nos dois modelos de rato comportamental de dor aguda, *i.e.*, o Teste da dor de Pin e o teste de Formalina, que estudaram para a caracterização funcional da sialorfina *in vivo* (Rougeot *et al.*, 2003).

### REFERÊNCIAS

Beaumont *et al.*, (1996) zinc metallopeptidases in health and disease, 105-129).

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

Gante *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 1699 (1994)

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

Horwell *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 4: 1573 (1996)

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

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

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

Jones E. et al., Drug discovery technology. Start-up showcase and structure-based drug design. *Drugs*, Sept. 2002; 5(9):894-895

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

Kenny et al, (1977) Proteinases in mammalian cells and tissues

Kenny et al, (1987) Mammalian ectoenzymes

Leissring et al., (2003) Enhanced Proteolysis of  $\beta$ -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death, *Neuron.*, 40, 1087-1093

Liskamp et al., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1: 113 (1994)

Marini, M., Roda, L. G., 2000. Enkephalin-degrading enzymes and their inhibitors in human saliva. *Peptides*. 21(1), 125-135.

Newell et al., (2003) Thiorphan-induced neprilysin inhibition raises amyloid  $\beta$  levels in rabbit cortex and cerebrospinal fluid, *Neuroscience letters* 350, 178-180

Oefner C. et al. Structure of human Neutral Endopeptidase (Neprilysin) complexed with Phosphoramidon, *J. Mol. Biol.* (2000), 296, 341-349

Potempa J. e Travis. J., Proteinases as virulence factors in bacterial diseases and as potential targets for therapeutic interaction with proteinase inhibitors. In proteases as targets for therapy. 99, 159-188, Eds K. Helm, B.D. Korant e J.C. Cheronis - Springer Handbook Exp. Pharm. 140.

Roques et al. (1993) *Pharmacological Reviews* 45, 87-146

Rosinski-Chupin, I., Tronik, D., Rougeon, F., 1988. High

level of accumulation of a mRNA coding for a precursorlike protein in the submaxillary gland of male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(22), 8553-8557.

Rougeot, C., Messaoudi, M., Hermitte, V., Rigault, A. G., Blisnick, T., Dugave, C., Desor, D., Rougeon, F., 2003. Sialorphin, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14), 8549-8554.

Rougeot, C., Rosinski-Chupin, I., Njamkepo, E., Rougeon, F., 1994. Selective processing of submandibular rat 1 protein at dibasic clivage sites. Salivary and bloodstream secretion products. *Eur J Biochem.* 219(3), 765-773.

Rougeot, C., Vienet, R., Cardona, A., Le Doledec, L., Grognet, J. M., Rougeon, F., 1997. Targets for SMR1-pentapeptide suggest a link between the circulating peptide and mineral transport. *Am J Physiol.* 273(4 Pt 2), R1309-1320.

Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Seebach *et al.*, *Helv. Chim. Acta* 79: 913 (1996)

Seidah *et al.*, (1995) the mammalian family of subtilisin/Kexin-like, Pro-protein Convertases.

Intramolecular chaperones and protein folding ; 9, 181-203

Turner *et al.* (2001) *Bioessays*, 23, 261-9

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Institut Pasteur

<120> péptidos derivados da proteína BPLP humana

<130> BET03P1242

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 947

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (81)..(686)

<400> 1

```

aattgagtat ctggcaagag taagattaag cagtaatttg ttccaaagaa gaatcttcta 60
ccaaggagca accttaaaga atg aaa tta act ttc ttc ttg ggc ctg ttg gct 113
Met Lys Leu Thr Phe Phe Leu Gly Leu Leu Ala
      1             5             10

ctt att tca tgt ttc aca ccc agt gag agt caa aga ttc tcc aga aga 161
Leu Ile Ser Cys Phe Thr Pro Ser Glu Ser Gln Arg Phe Ser Arg Arg
      15             20             25

cca tat cta cct ggc cag ctg cca cca cct cca ctc tac agg cca aga 209
Pro Tyr Leu Pro Gly Gln Leu Pro Pro Pro Pro Leu Tyr Arg Pro Arg
      30             35             40

tgg gtt cca cca agt ccc cca cct ccc tat gac tca aga ctt aat tca 257
Trp Val Pro Pro Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Asp Ser Arg Leu Asn Ser
      45             50             55

cca ctt tct ctt ccc ttt gtc cca ggg cga gtt cca cca tct tct ttc 305
Pro Leu Ser Leu Pro Phe Val Pro Gly Arg Val Pro Pro Ser Ser Phe
      60             65             70             75

tct cga ttt agc caa gca gtc att cta tct caa ctc ttt cca ttg gaa 353
Ser Arg Phe Ser Gln Ala Val Ile Leu Ser Gln Leu Phe Pro Leu Glu
      80             85             90

tct att aga caa cct cga ctc ttt ccg ggt tat cca aac cta cat ttc 401
Ser Ile Arg Gln Pro Arg Leu Phe Pro Gly Tyr Pro Asn Leu His Phe
      95             100             105

cca cta aga cct tac tat gta gga cct att agg ata tta aaa ccc cca 449
Pro Leu Arg Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Ile Arg Ile Leu Lys Pro Pro
      110             115             120

ttt cct cct att cct ttt ttt ctt gct att tac ctt cct atc tct aac 497
Phe Pro Pro Ile Pro Phe Phe Leu Ala Ile Tyr Leu Pro Ile Ser Asn

```

```

125              130              135
cct gag ccc caa ata aac etc acc acc gca gat aca aca atc acc aca 545
Pro Glu Pro Gln Ile Asn Ile Thr Thr Ala Asp Thr Thr Ile Thr Thr
140              145              150              155
aat ccc ccc acc act gca aca gca acc acc agg cac ttc cac aaa acc 593
Asn Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Thr Arg His Phe His Lys Thr
160              165              170
cac aat gac gat cag ctc ctc sac agt acc tat ctc ttc aac acc aga 641
His Asn Asp Asp Gln Leu Leu Asn Ser Thr Tyr Leu Phe Asn Thr Arg
175              180              185
gcc tgc cac ctc cat atc agc agc aac ccc cgc agc atc tac tga 686
Ala Cys His Leu His Ile Ser Ser Asn Pro Arg Ser Ile Tyr
190              195              200
aaatactact caaattctcg ccaaccgtcc tcacacagta ttgctcaatg ccaactgtcca 746
agttacgact tocaaccasa ctatattaag cagcccagcc tttaaaagtt tttggcaaaa 806
actctttgcc atttttggtt gaacatgcaa taaatgatat tttccaaact gctctgatat 866
cttagaagaa ataaactgca atgattttga tggaaccaac cctgatctaa ccagcacact 926
aaataaaagta tttgaaccaat a 947

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 201

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 2

```

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

```

Asn Ile Thr Thr Ala Asp Thr Thr Ile Thr Thr Asn Pro Pro Thr Thr  
 145 150 155 160

Ala Thr Ala Thr Thr Arg His Phe His Lys Thr His Asn Asp Asp Gln  
 165 170 175

Leu Leu Asn Ser Thr Tyr Leu Phe Asn Thr Arg Ala Cys His Leu His  
 180 185 190

Ile Ser Ser Asn Pro Arg Ser Ile Tyr  
 195 200

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Arg Phe Ser Arg  
 1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Tyr Gln Arg Phe Ser Arg  
 1 5

Lisboa, 18 de outubro de 2012

## REIVINDICAÇÕES

1. Péptido que é um produto de maturação da Proteína Lacrimal Básica rica em Prolina (BPLP) ou um derivado peptídico do referido produto de maturação, em que:

- o péptido ou derivado peptídico apresenta uma propriedade inibidora contra a metalo-ectopeptidase NEP e/ou APN;

- o referido péptido inclui desde 3 até 15 aminoácidos e sendo obtido através da clivagem do precursor da proteína BPLP pela furina, convertases de PC ou PACE 4, e o referido derivado peptídico deriva do referido péptido através de uma a duas substituições de aminoácidos e retém a especificidade de ligação e/ou actividade fisiológica do referido péptido; e

- o referido péptido ou derivado peptídico compreende a sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, em que:

- X1 representa o átomo de H ou um aminoácido Tyr; e

- X2 representa Gln ou Glp em que X1 é H, ou X2 representa Gln quando X1 é Tyr;

em que a referida sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg é a parte C-terminal do referido péptido ou derivado de péptido.

2. Péptido da reivindicação 1, que consiste na sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg.

3. Péptido da reivindicação 2, em que o referido péptido compreende a sequência QRFSR ou YQRFSR.

4. Péptido da reivindicação 3, que consiste na sequência QRFSR.

5. Péptido da reivindicação 3, que consiste na sequência YQRFSR.

6. Ácido nucleico que codifica um péptido de qualquer uma das reivindicações 1 até 5.

7. Vector para clonagem e/ou expressão, cujo vector compreende um ácido nucleico da reivindicação 6.

8. Célula hospedeira que compreende o ácido nucleico da reivindicação 6 ou o vector da reivindicação 7.

9. Anticorpo que reconhece especificamente um péptido de qualquer uma das reivindicações 1 até 5.

10. Composição farmacêutica que compreende um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 ou um seu mimético, em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável, em que o referido mimético é

obtido (i) através de substituição de uma ou mais ligações amida por uma ligação não amida, (ii) por substituição de uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos por uma unidade química diferente, (iii) através da protecção de um ou mais dos terminal N, o terminal C ou uma ou mais cadeias laterais por um grupo de protecção, (iv) através da introdução de ligações duplas e/ou ciclização e/ou modificação da estereoespecificidade na cadeia lateral amino para aumentar a rigidez e/ou afinidade de ligação, (v) através do desenvolvimento de concepção de fármaco assistido por computador, (vi) através da protecção dos grupos hidrofílicos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  por esterificação com álcoois lipofílicos ou por amidação e/ou por acetilação ou adição de cadeia hidrofóbica carboxilalquilo ou aromática no terminal  $\text{NH}_2$ , (vii) através de retroinversão isomérica das ligações  $\text{CO-NH}$  amida ou metilação das funções amida, ou (viii) através da substituição de L aminoácidos por D aminoácidos.

11. Composição farmacêutica, compreendendo um polímero de um péptido de acordo com as reivindicações 1 até 5, ou um seu mimético, em associação com um veículo farmacologicamente aceitável, em que o referido mimético é obtido (i) através de substituição de uma ou mais ligações amida por uma ligação não amida, (ii) por substituição de uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos por uma unidade química diferente, (iii) através da protecção de um ou mais dos terminal N, o terminal C ou uma ou mais cadeias laterais por um grupo de protecção, (iv) através da introdução de ligações duplas e/ou ciclização e/ou modificação

da estereoespecificidade na cadeia lateral amino para aumentar a rigidez e/ou afinidade de ligação, (v) através do desenvolvimento de concepção de fármaco assistido por computador, (vi) através da protecção dos grupos hidrofílicos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  por esterificação com álcoois lipofílicos ou por amidação e/ou por acetilação ou adição de cadeia hidrofóbica carboxilalquilo ou aromática no terminal  $\text{NH}_2$ , (vii) através de retroinversão isomérica das ligações  $\text{CO-NH}$  amida ou metilação das funções amida, ou (viii) através da substituição de L aminoácidos por D aminoácidos.

12. Composição farmacêutica compreendendo um ácido nucleico da reivindicação 6 ou um vector expressando o referido ácido nucleico em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

13. Composição farmacêutica compreendendo um ácido nucleico que codifica para a proteína BPLP ou um vector expressando o referido ácido nucleico em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

14. Composição farmacêutica compreendendo um anticorpo da reivindicação 9 em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

15. Composição farmacêutica compreendendo uma proteína BPLP em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

16. Utilização de um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 ou um seu mimético, para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença em que se procura a modulação da actividade de uma metalopeptidase de membrana, em que o referido mimético é obtido (i) através de substituição de uma ou mais ligações amida por uma ligação não amida, (ii) por substituição de uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos por uma unidade química diferente, (iii) através da protecção de um ou mais dos terminal N, o terminal C ou uma ou mais cadeias laterais por um grupo de protecção, (iv) através da introdução de ligações duplas e/ou ciclização e/ou modificação da estereoespecificidade na cadeia lateral amino para aumentar a rigidez e/ou afinidade de ligação, (v) através do desenvolvimento de concepção de fármaco assistido por computador, (vi) através da protecção dos grupos hidrofílicos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  por esterificação com álcoois lipofílicos ou por amidação e/ou por acetilação ou adição de cadeia hidrofóbica carboxil-alquilo ou aromática no terminal  $\text{NH}_2$ , (vii) através de retroinversão isomérica das ligações  $\text{CO-NH}$  amida ou metilação das funções amida, ou (viii) através da substituição de L aminoácidos por D aminoácidos.

17. Utilização da reivindicação 16, em que a metalopeptidase é uma metalopeptidase de zinco de membrana.

18. Utilização da reivindicação 17, em que a metalopeptidase é NEP ou APN.

19. Utilização de um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 ou um seu mimético, para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento da dor, em que o referido mimético é obtido (i) através de substituição de uma ou mais ligações amida por uma ligação não amida, (ii) por substituição de uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos por uma unidade química diferente, (iii) através da protecção de um ou mais dos terminal N, o terminal C ou uma ou mais cadeias laterais por um grupo de protecção, (iv) através da introdução de ligações duplas e/ou ciclização e/ou modificação da estereoespecificidade na cadeia lateral amino para aumentar a rigidez e/ou afinidade de ligação, (v) através do desenvolvimento de concepção de fármaco assistido por computador, (vi) através da protecção dos grupos hidrofílicos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  por esterificação com álcoois lipofílicos ou por amidação e/ou por acetilação ou adição de cadeia hidrofóbica carboxilalquilo ou aromática no terminal  $\text{NH}_2$ , (vii) através de retroinversão isomérica das ligações  $\text{CO-NH}$  amida ou metilação das funções amida, ou (viii) através da substituição de L aminoácidos por D aminoácidos.

20. Utilização da reivindicação 19, em que a dor é crónica, aguda, inflamatória visceral ou dor neuropática.

21. Utilização de um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 ou um seu mimético, para a preparação de um medicamento para a prevenção ou

tratamento de desequilíbrio hidro-mineral, em que o referido mimético é obtido (i) através de substituição de uma ou mais ligações amida por uma ligação não amida, (ii) por substituição de uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos por uma unidade química diferente, (iii) através da protecção de um ou mais dos terminal N, o terminal C ou uma ou mais cadeias laterais por um grupo de protecção, (iv) através da introdução de ligações duplas e/ou ciclização e/ou modificação da estereoespecificidade na cadeia lateral amino para aumentar a rigidez e/ou afinidade de ligação, (v) através do desenvolvimento de concepção de fármaco assistido por computador, (vi) através da protecção dos grupos hidrofílicos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  por esterificação com álcoois lipofílicos ou por amidação e/ou por acetilação ou adição de cadeia hidrofóbica carboxil-alquilo ou aromática no terminal  $\text{NH}_2$ , (vii) através de retroinversão isomérica das ligações  $\text{CO-NH}$  amida ou metilação das funções amida, ou (viii) através da substituição de L aminoácidos por D aminoácidos.

22. Utilização da reivindicação 21, para a prevenção ou tratamento de distúrbios ósseos, dos dentes, do rim, da paratiróide, do pâncreas, do intestino, do estômago, da próstata, e das glândulas salivares que são provocados por um desequilíbrio hidro-mineral.

23. Utilização da reivindicação 22, em que o distúrbio é seleccionado a partir do grupo que consiste em hiper ou hipo-paratiroidismo, osteoporose, pancreatite,

litíase da glândula submandibular, nefrolitíase e osteodistrofia.

24. Utilização de um péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 ou um seu mimético, para a prevenção ou tratamento de distúrbio de interpessoal e comportamental debilitado, em que o referido mimético é obtido (i) através de substituição de uma ou mais ligações amida por uma ligação não amida, (ii) por substituição de uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos por uma unidade química diferente, (iii) através da protecção de um ou mais dos terminal N, o terminal C ou uma ou mais cadeias laterais por um grupo de protecção, (iv) através da introdução de ligações duplas e/ou ciclização e/ou modificação da estereoespecificidade na cadeia lateral amino para aumentar a rigidez e/ou afinidade de ligação, (v) através do desenvolvimento de concepção de fármaco assistido por computador, (vi) através da protecção dos grupos hidrofílicos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  por esterificação com álcoois lipofílicos ou por amidação e/ou por acetilação ou adição de cadeia hidrofóbica carboxilalquilo ou aromática no terminal  $\text{NH}_2$ , (vii) através de retroinversão isomérica das ligações  $\text{CO-NH}$  amida ou metilação das funções amida, ou (viii) através da substituição de L aminoácidos por D aminoácidos.

25. Utilização da reivindicação 24, em que o distúrbio é seleccionado a partir do grupo que consiste em distúrbio de evitamento, distúrbio da diminuição da atenção, distúrbio autista, distúrbio do défice da atenção,

distúrbio da hiperactividade, distúrbio da excitação, hospitalismo, funcionamento interpessoal dificultado e relacionamento com o mundo externo, distúrbio da personalidade esquizóide, esquizofrenia, distúrbio depressivo, interesse no ambiente diminuído, actividade social dificultada ligada com a sexualidade, e comportamento sexual dificultado, incluindo ejaculação precoce e hiperactividade sexual.

26. Utilização da reivindicação 24, em que o distúrbio é um distúrbio depressivo.

27. Utilização de acordo com a reivindicação 16, para a prevenção ou tratamento de artrite inflamatória.

28. Utilização de acordo com a reivindicação 16, para a prevenção ou tratamento de hipertensão.

29. Utilização de acordo com a reivindicação 16, em que o péptido actua como um agente natriurético.

30. Utilização de um péptido de acordo com a reivindicação 16, em que o péptido actua como um agente diurético.

31. Utilização de acordo com a reivindicação 16, para a prevenção ou tratamento de aterosclerose.

32. Utilização de acordo com a reivindicação 16, para a prevenção ou tratamento de um tumor.

33. Utilização de acordo com a reivindicação 16, para a prevenção ou tratamento da doença inflamatória do intestino.

34. Utilização de acordo com a reivindicação 16, para o tratamento de infecções.

35. Utilização de acordo com a reivindicação 16, para controlar as respostas imuno-inflamatórias.

36. Utilização de acordo com a reivindicação 16, para o tratamento de uma doença neurodegenerativa.

37. Utilização de acordo com a reivindicação 36, para o tratamento de uma doença neurodegenerativa associada com a amiloidose.

38. Utilização de um ácido nucleico da reivindicação 6, para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença como definido em qualquer uma das reivindicações 16 a 37.

39. Utilização de um anticorpo da reivindicação 9, para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença como definido em qualquer uma das reivindicações 16 até 37.

40. Método *in vitro* para prognóstico, diagnós-

tico ou determinação da evolução de um estado que envolve uma produção alterada de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5, cujo método compreende detectar, ou quantificar numa amostra biológica de um indivíduo de teste, um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5, em comparação com a produção do mesmo numa amostra biológica de um indivíduo de controlo.

41. Método da reivindicação 40, em que a detecção da produção de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 é realizada colocando em contacto uma amostra biológica com um anticorpo, como definido na reivindicação 9.

42. Método *in vitro* para o prognóstico ou diagnóstico de um estado envolvendo uma produção alterada de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5, cujo método compreende detectar numa amostra biológica de um indivíduo de teste, uma anormalidade quantitativa e/ou qualitativa no gene BPLP ou no seu transcrito.

43. Método *in vitro* para o rastreio de compostos quanto à sua capacidade para se ligarem a NEP, compreendendo os passos de:

a) incubar um composto candidato com uma célula que

expressa NEP, na presença de um péptido que é um produto de maturação da proteína BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5;

b) determinar a capacidade do composto candidato para competir com o referido produto de maturação para ligação a NEP.

44. Método da reivindicação 43, compreendendo os passos de:

a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido que expresse NEP;

b) adicionar o composto candidato a ser testado em competição com uma concentração de meia saturação do produto de maturação marcado da proteína BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5;

c) incubar a cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido do passo a) na presença do composto candidato durante um tempo suficiente e em condições para que a ligação específica ocorra;

d) quantificar o marcador ligado especificamente à cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido na presença de várias concentrações do composto candidato.

45. Processo para determinar a afinidade de um composto que se liga especificamente a NEP, compreendendo os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido que expressem NEP;
- b) adicionar o composto candidato que foi previamente marcado com um marcador radioactivo ou não radioactivo;
- c) incubar a cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido do passo a) na presença do composto candidato durante um tempo suficiente e em condições para que a ligação específica ocorra;
- d) quantificar o marcador ligado especificamente à cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido na presença de várias concentrações do composto candidato.

46. Método *in vitro* para rastrear compostos quanto à sua capacidade para actuarem como agonistas ou antagonistas de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 sobre a actividade de NEP, cujo método compreende os passos de:

- a) incubar um composto candidato com uma célula que expresse NEP, na presença de (i) um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5, e (ii) um substrato de NEP;
- b) determinar a endoproteólise do substrato de NEP

pela NEP, em que uma endoproteólise aumentada na presença do composto candidato, em comparação com a endoproteólise na ausência do composto candidato, é indicadora de uma actividade antagonista; enquanto uma endoproteólise diminuída na presença do composto candidato, em comparação com a endoproteólise na ausência do composto candidato, é indicadora de uma actividade agonista.

47. Método da reivindicação 46, para rastrear um composto que é um agonista de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5, compreendendo os passos de:

- a) preparar a cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido que expresse NEP;
- b) incubar a cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido do passo a) a concentrações que permitem medir a actividade enzimática de NEP na presença de (i) o composto candidato, (ii) a concentração de meia saturação do péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5 e (iii) um substrato NEP, durante um tempo suficiente para que a endoproteólise do substrato de NEP ocorra em condições de velocidade inicial;
- c) quantificar a actividade da NEP presente no material biológico do passo a) através da medição dos

níveis de endoproteólise do substrato NEP, respectivamente na presença ou na ausência do composto candidato e na presença ou na ausência do referido péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5.

48. Método da reivindicação 46 para o rastreio de um composto que é um antagonista do péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5, compreendendo os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido que expressem NEP;
- b) incubar a cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido do passo a) a concentrações que permitem a medição da actividade enzimática de NEP em condições de velocidade inicial na presença de uma concentração submáxima de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5, e um substrato de NEP, na presença do composto candidato, durante um tempo suficiente para que a endoproteólise do substrato de NEP ocorra nas condições de velocidade inicial;
- c) quantificar a actividade da NEP presente no material biológico do passo a) através da medição dos níveis de endoproteólise do substrato de NEP, respectivamente na presença ou na ausência do composto candidato e na presença ou na ausência do péptido que

é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 5.

49. Método da reivindicação 47 ou 48, em que a referida cultura de células, espécime de órgão ou amostra de tecido é seleccionado a partir do grupo que consiste na preparação de membrana ou cortes de medula espinal de um mamífero, medula externa renal de mamífero, placenta, testículos, próstata ou osso, ou tecidos e/ou células de origem em murganho, rato ou humana ou linhas celulares transfectadas com cDNA de metaloectopeptidase.

Lisboa, 18 de outubro de 2012

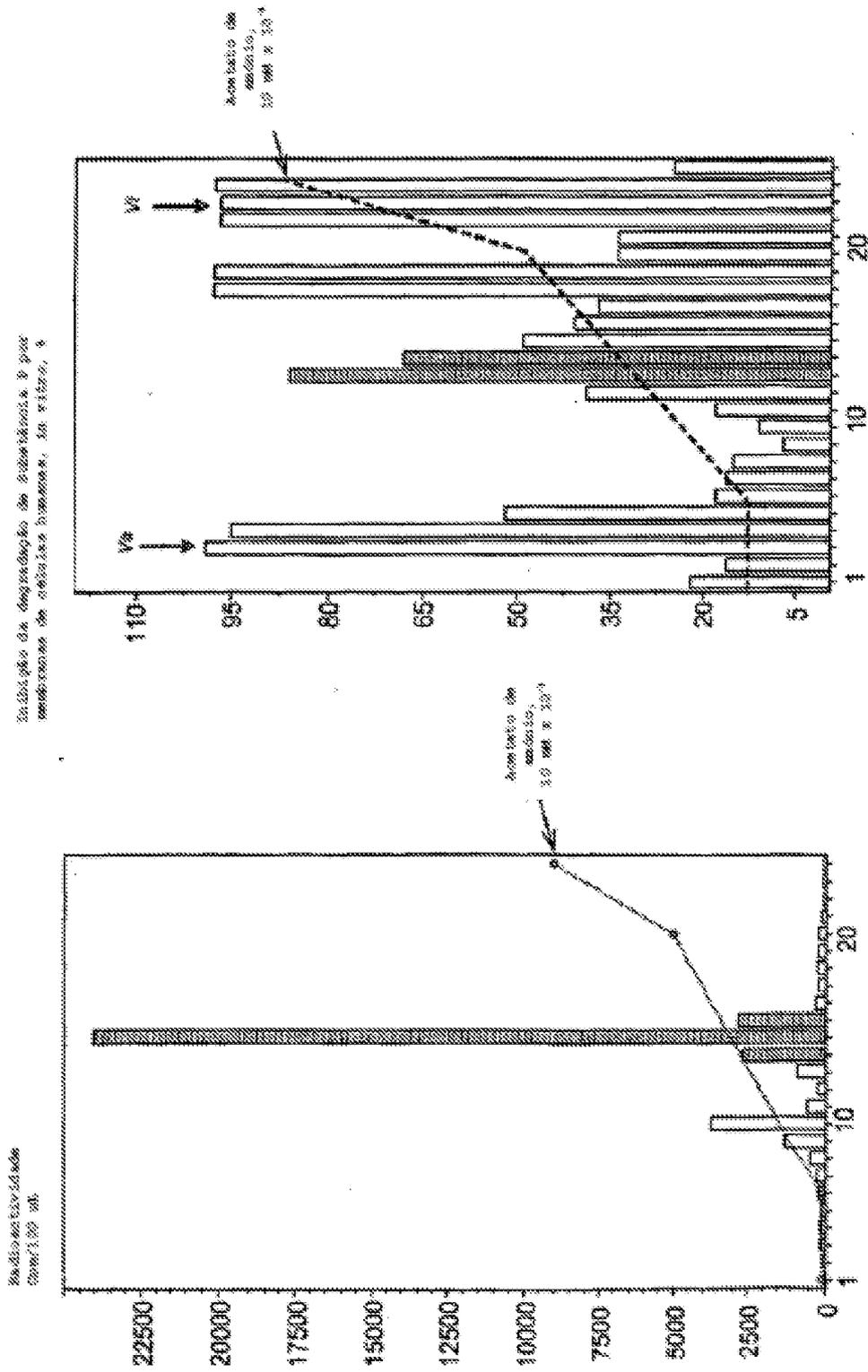
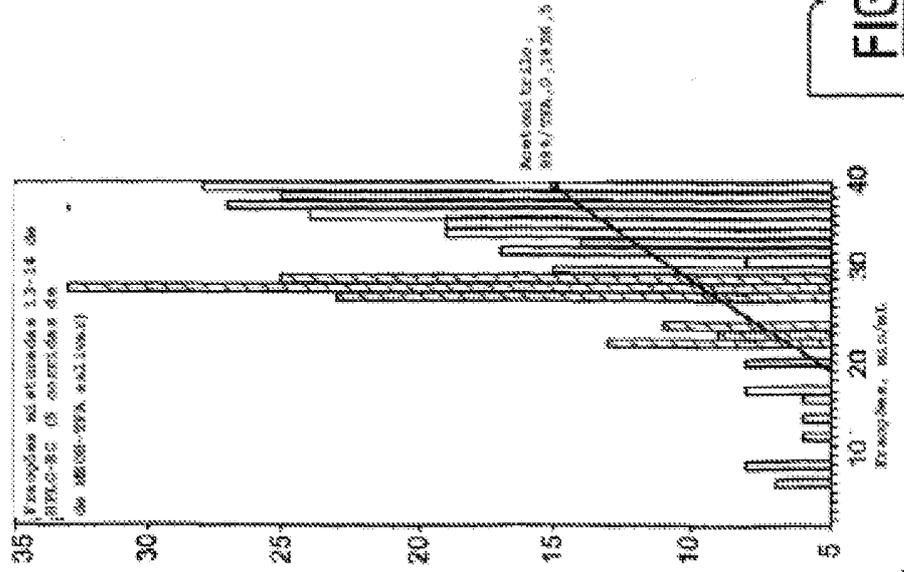


FIG. 1

FIG. 2

Inibição da endoproteólise da Substância Z, %



Inibição da endoproteólise da Substância P, %

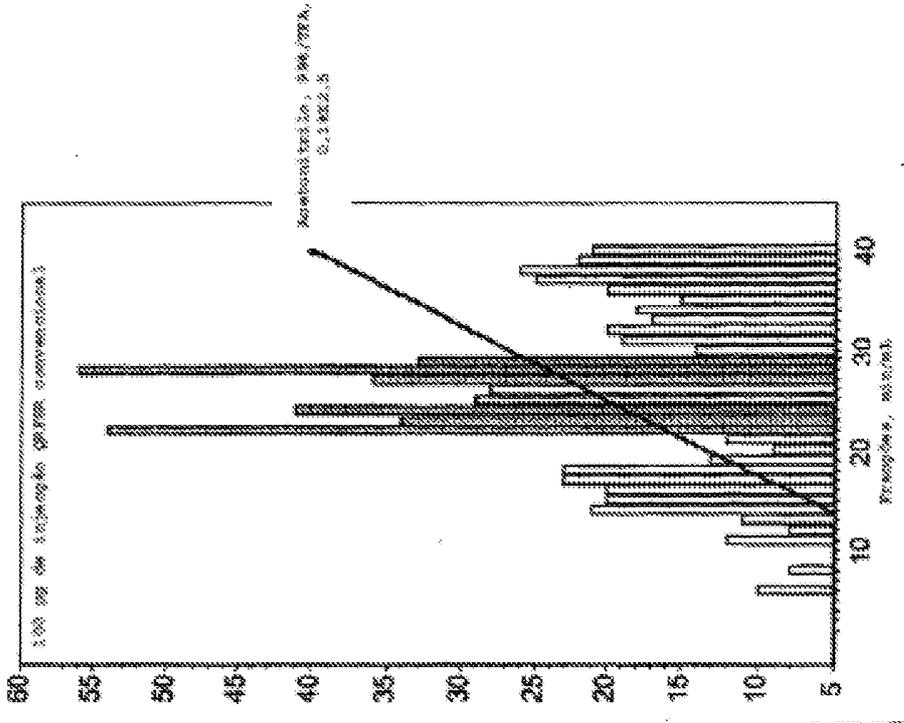
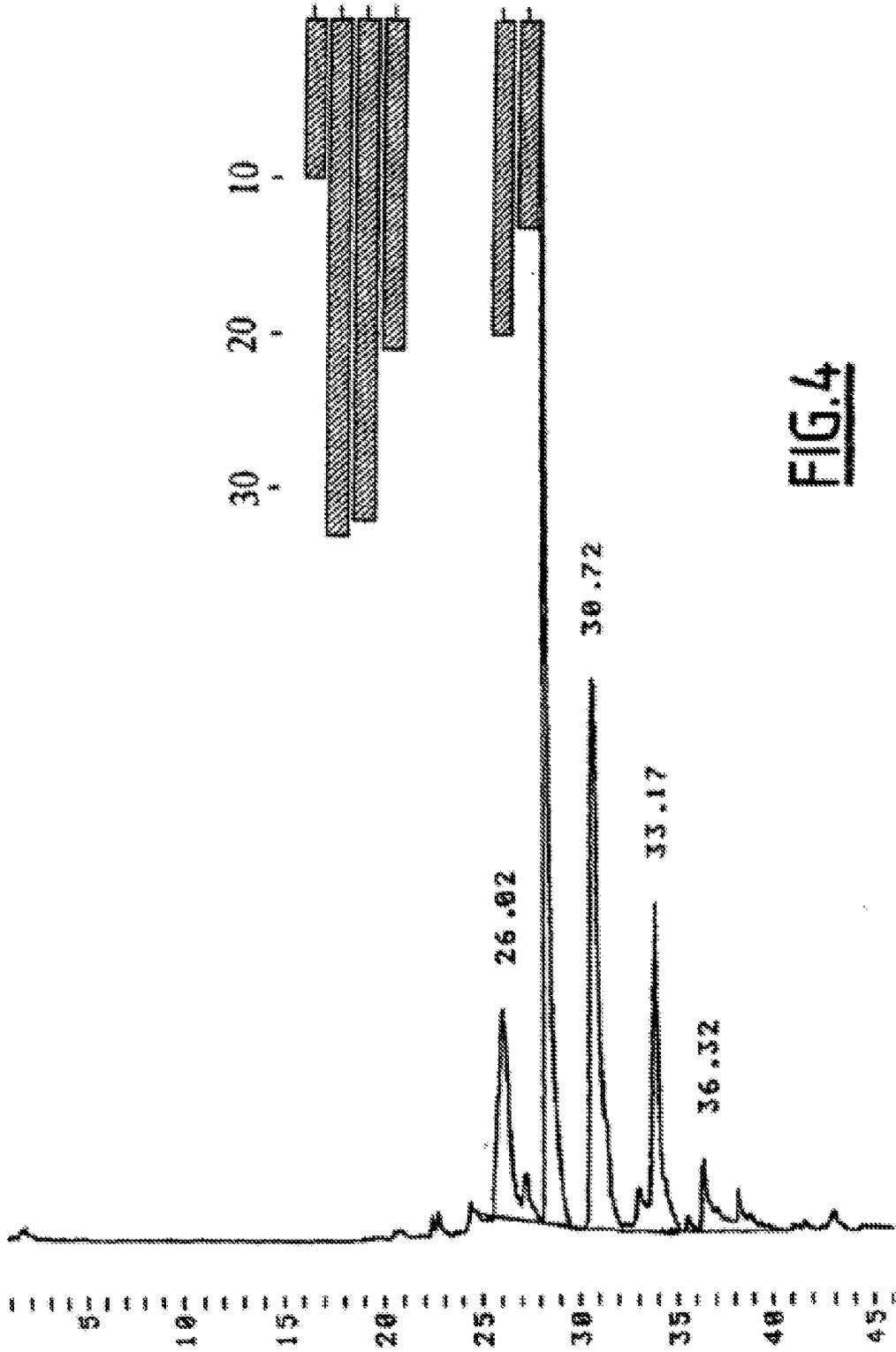
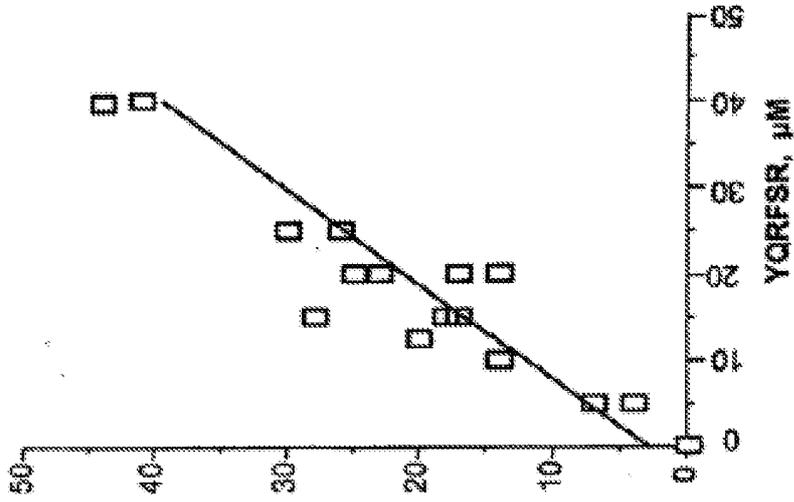


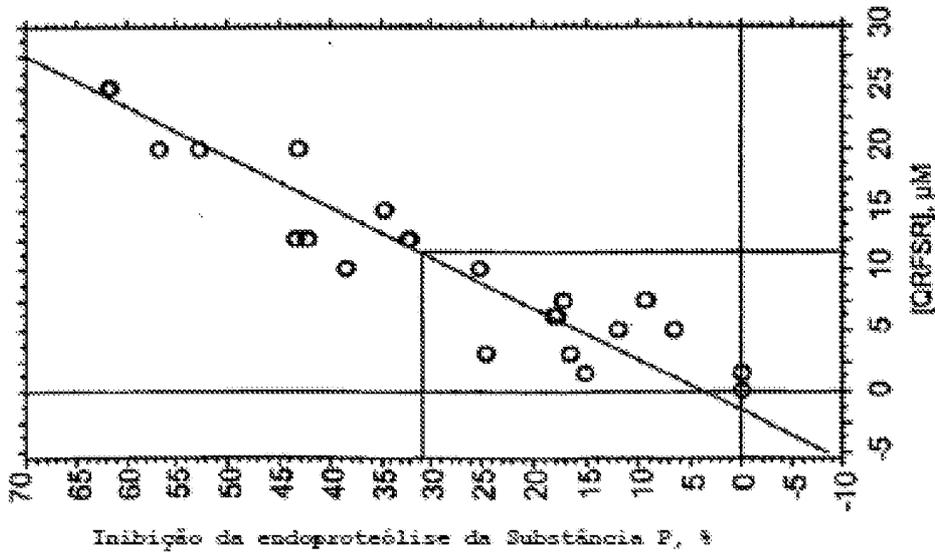
FIG.3



Inibição da endoproteólise da Substância P, %



**FIG.6**



**FIG.5**

Inibição da endogentrólise da substância P, %

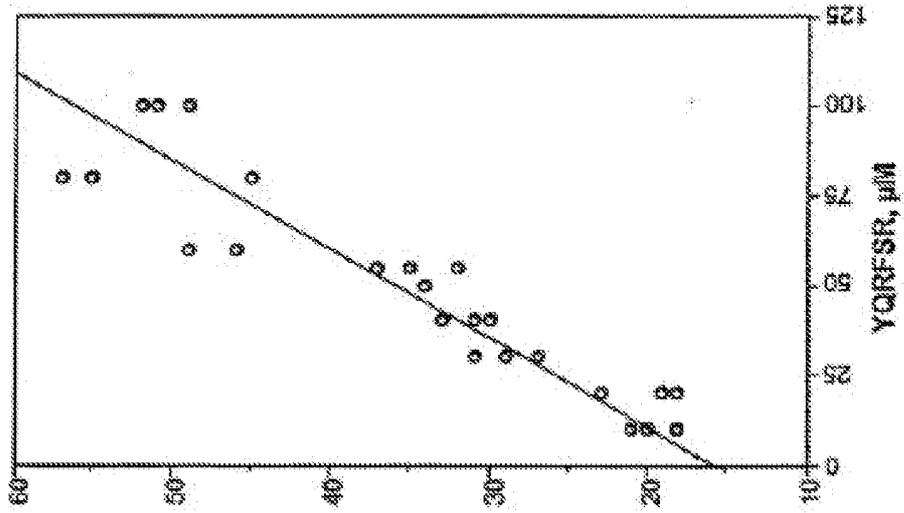
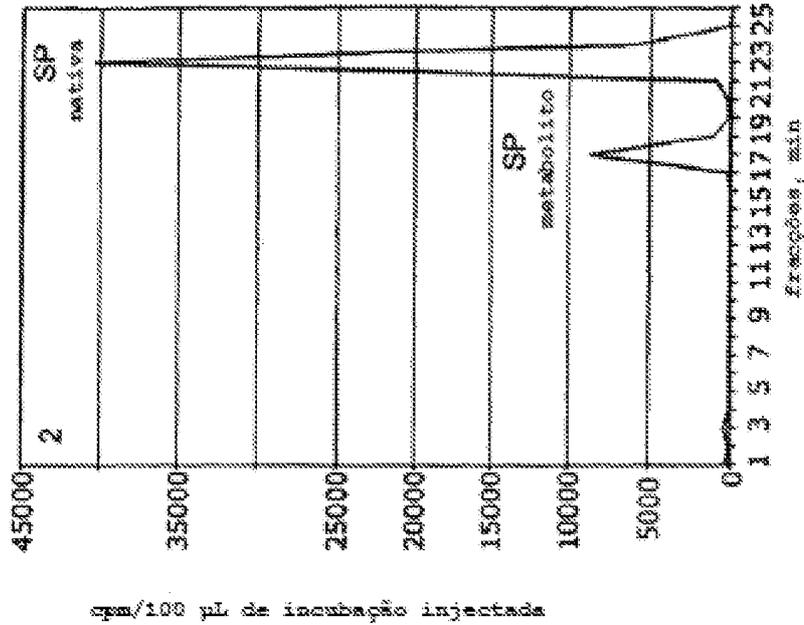


FIG.7

Endoproteólise da Substância P  
(100 nM) por membranas celulares  
humanas (17 µg prote.) na presença  
de ZGFRFR (175 µM)



Endoproteólise da Substância P  
(100 nM) por membranas celulares  
humanas LNCaP (17 µg prot.)

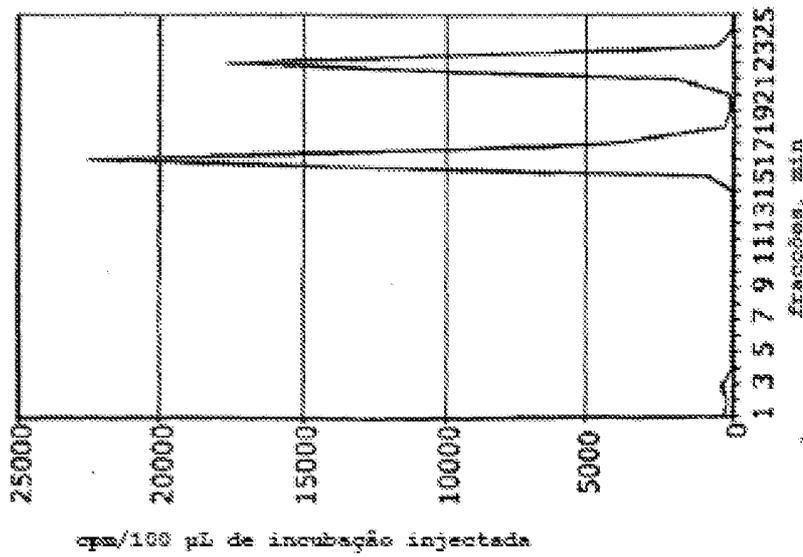


FIG. 8

## REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

### Documentos de patentes citadas na Descrição

- EP 0394424 A
- WO 0103221 A
- WO 9837100 A
- EP 1216707 A
- EP 1243519 A
- EP 1343520 A
- WO 9528494 A
- FR 2707169
- WO 02051434 A

### Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1035-1036/1570-1580
- **Beaumont et al.** zinc metalloproteinases in health and disease, 1998, 105-129
- **Dickinson, D. P. ; Thiesse, M.** cDNA cloning of an abundant human lacrimal gland mRNA encoding a novel tear protein. *Curr Eye Res.*, 1996, vol. 15 (4), 377-386
- **Gante et al.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, vol. 33, 1699
- **Gomeni R. et al.** Computer-assisted drug development : an emerging technology for designing first-time-in-man and proof-of-concept studies from preclinical experiments. *Eur. J. of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 261-270
- **Horwell et al.** *Bioorg. Med. Chem.*, 1996, vol. 4, 1573
- **Isemura, S. ; Saitoh, E.** Nucleotide sequence of gene PBI encoding a protein homologous to salivary proline-rich protein P-B. *J Biochem (Tokyo)*, 1987, vol. 121 (6), 1025-1030
- **Isemura, S.** Nucleotide sequence of gene PBII encoding salivary proline-rich protein P-B. *J Biochem (Tokyo)*, 2000, vol. 127 (3), 393-398
- **Isemura, S. ; Saitoh, E. ; Sanada, K.** Fractionation and characterization of basic proline-rich peptides of human parotid saliva and the amino acid sequence of proline-rich peptide P-E. *J Biochem (Tokyo)*, 1982, vol. 91 (6), 2067-2075
- **Jones E. et al.** Drug discovery technology. Start-up showcase and structure-based drug design. *Drugs*, Sept., 2002, vol. 5 (9), 894-895
- **Kan.** *Impact of recombinant DNA technology and protein engineering on structure-based drug design : case studies of HIV-1 and HCMV proteases*, 2002
- **Kenny et al.** *Proteinases in mammalian cells and tissues*, 1977
- **Kenny et al.** *Mammalian ectoenzymes*, 1987
- **Leissring et al.** Enhanced Proteolysis of  $\beta$ -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron.*, 2003, vol. 40, 1087-1093
- **Liskamp et al.** *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1994, vol. 1, 113
- **Marini, M. ; Roda, L. G.** Enkephalin-degrading enzymes and their inhibitors in human saliva. *Peptides*, 2000, vol. 21 (1), 125-135
- **Newell et al.** Thiorphan-induced neprilysin inhibition raises amyloid  $\beta$  levels in rabbit cortex and cerebrospinal fluid. *Neuroscience letters*, 2003, vol. 350, 176-180
- **Oefner C. et al.** Structure of human Neutral Endopeptidase (Neprilysin) complexed with Phosphinomidon. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 296, 341-348
- Proteinases as virulence factors in bacterial diseases and as potential targets for therapeutic interaction with proteinase inhibitors. **Potempa J. ; Travis. J.** *proteases as targets for therapy*. Springer Handbook Exp. Pharm., vol. 99, 159-188
- **Roques et al.** *Pharmacological Reviews*, 1993, vol. 45, 87-146
- **Rosinski-Chupin, I. ; Tronik, D. ; Rougeon, F.** High level of accumulation of a mRNA coding for a precursor-like protein in the submaxillary gland of male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1988, vol. 85 (22), 8553-8557
- **Rougeot, C. ; Messaoudi, M. ; Hermitte, V. ; Rigault, A. G. ; Blisnick, T. ; Dugave, C. ; Desor, D. ; Rougeon, F.** Sialorphin, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2003, vol. 100 (14), 8549-8554
- **Rougeot, C. ; Rosinski-Chupin, I. ; Njamkpo, E. ; Rougeon, F.** Selective processing of submandibular rat 1 protein at dibasic cleavage sites. Salivary and bloodstream secretion products. *Eur J Biochem.*, 1994, vol. 219 (3), 765-773

- Rougeot, C. ; Vienet, R. ; Cardona, A. ; Le Doledec, L. ; Grognet, J. M. ; Rougeon, F. Targets for SMR1-pentapeptide suggest a link between the circulating peptide and mineral transport. *Am J Physiol.*, 1997, vol. 273, R1309-1320
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Seebach et al. *Helv. Chim. Acta*, 1996, vol. 78, 913
- Seidah et al. the mammalian family of subtilisin/Kexin-like, Pro-protein Convertases. *Intramolecular chaperones and Protein folding*, 1995, vol. 9, 181-203
- Turner et al. *Bioessays*, 2001, vol. 23, 261-9