

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

(22) Data de pedido: <b>2005.03.18</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): <b>2004.03.19 EP 04290754</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2006.11.29</b>	(72) Inventor(es):
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.11.26</b> <b>042/2015</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 OS REFERIDOS PÉPTIDOS E ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA OS REFERIDOS PÉPTIDOS**

(57) Resumo:

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

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

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

**DESCRIÇÃO****"PÉPTIDOS DERIVADOS DA PROTEÍNA BPLP HUMANA,  
POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAM 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 metalo-ectopeptidases. A presente invenção refere-se também a polinucleótidos que codificam os referidos péptidos e a anticorpos dirigidos contra os referidos péptidos. Além disso, a presente invenção refere-se a utilizações em diagnóstico e terapêutica da proteína BPLP humana, de péptidos derivados desta e seus miméticos, polipéptidos que codificam a proteína BPLP humana ou péptidos derivados desta, bem como anticorpos dirigidos contra proteína BPLP ou péptidos derivados desta.

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

conversão de aminoácidos básicos emparelhados (Rougeot *et al.*, 1994).

Numa abordagem de pós-genómica e fisiómica, foi estabelecido as bases moleculares e funcionais que proporcionam evidência para a existência em mamíferos de um mensageiro hormonal da comunicação intercelular, *i.e.*, o péptido maduro final gerado a partir da pré-pró-hormona SMR<sub>1</sub>: o Pentapéptido 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 androgénios ser segregada de forma aguda em resposta ao stress ambiental agudo, levou a postular 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, bem como interacções socio-sexuais. Os dados obtidos demonstraram que a sialorfina tem a capacidade para modular, em doses relacionadas com os níveis de circulação fisiológica, o padrão de acasalamento de ratos machos, *i.e.*, exercendo, de uma maneira dependente da dose, um efeito duplo

facilitador/inibidor sobre o desempenho sexual, embora estimulando a todas as doses a aparente excitação ou motivação sexual. Assim, é proposto que a sialorfina regulada por androgénios endógenos ajuda a modular o equilíbrio adaptativo entre os mecanismos de excitação e de inibição que proporciona uma resposta sexual apropriada dos ratos machos, dependendo do contexto.

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

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 internacional de patente WO 98/37100 descreve a utilização terapêutica de produtos de maturação de SMR1 para prevenir ou tratar doenças associadas a um desequilíbrio de iões minerais num corpo humano ou animal.

Em resposta a contextos de stress, a sialorfina é libertada de forma aguda, distribuída rapidamente e captada persistentemente pelos seus alvos associados à membrana sistémicos (Rougeot *et al.*, 1997). Os autores demonstraram que a molécula da 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 do mais, foi demonstrado que a sialorfina é um antagonista fisiológico da actividade de NEP *ex vivo*; e a interacção directa da 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 proporcionou evidência directa de que a sialorfina inibiu actividade de NEP (IC 50 da sialorfina: 0,6 μM). A sialorfina, é o primeiro inibidor fisiológico da actividade de NEP-encefalinase identificado até à data em roedores (Rougeot *et al.*, 2003 e Pedido de Patente Europeia EP 1 216 707).

A NEP está localizada na superfície de células dos tecidos nervoso e sistémico, onde desempenha uma função importante como uma ectoenzima que catalisa o processamento pós-secretor ou o metabolismo de um número de neuropéptidos e péptidos reguladores. Os principais substratos fisiologicamente relevantes para a NEP são as encefalinas, substância P e o péptido natriurético auricular (ANP). Estes péptidos sinal de mamíferos estão envolvidos no controlo da percepção da dor 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 por inibidores endógenos, de um ponto de vista fisiológico, bem como fisiopatológico e terapêutico.

Utilizando diferentes modelos de farmacologia molecular e comportamental, os autores demonstraram que o mediador fisiológico, a sialorfina, impede que a NEP espinal e renal degrade os seus dois substratos fisiologicamente relevantes, a Substância P e a 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 de tecidos nervosos (medula espinal) ou de tecidos sistémicos (rim, osso, dente, placenta, próstata, GSM, intestino). *In vivo*, a sialorfina intravenosa desencadeou respostas antinociceptivas potentes em dois modelos comportamentais em ratos de dor aguda e tónica induzida por lesão, o teste de dor por picadela (algesia mecânica) e teste da formalina (algesia química). A analgesia induzida pela sialorfina requereu a activação de receptores opióides  $\mu$  e  $\delta$ , coerente com o envolvimento de receptores opióides endógenos na transmissão encefalinérgica. De facto, estes receptores estão envolvidos na transmissão dos sinais opioidérgicos endógenos, tais como as encefalinas que são inactivadas pela NEP e pela aminopeptidase APN, e também do opiáceo exógeno, a morfina que interage principalmente com o receptor opióide  $\mu$ . Foi concluído que a sialorfina protege as encefalinas endógenas libertadas após estímulos nociceptivos através da inibição de ecto-encefalinases, *in vivo*, e potencia assim o seu efeito analgésico. Por outro lado, o sistema opióide endógeno, em particular a via mediada pelo opióide  $\delta$ , foi também ligado 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 regulador natural sistemicamente activo da actividade de NEP identificado até à data em mamíferos. 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 agentes antinociceptivos e antidepressivos putativos (Rougeot *et al.*, 2003; EP 1,343,519 e EP 1,343,520).

O poderoso efeito analgésico da sialorfina está associado à sua capacidade de proteger completamente as encefalinas da inactivação pelas ectoenzimas de degradação de encefalinas. *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, os quais são apenas específicos para a NEP (tal como o Tiorfano) ou específicos para o APN (tal como a Bestatina) exibem um efeito antinociceptivo não significativo ou fraco. Assim, a sialorfina de rato é um inibidor fisiológico duplo das metalo-ectopeptidases NEP e APN; além disso, este mensageiro de sinal endócrino da resposta adaptativa ao stress é um inibidor potente 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 o celatorfano, que foram desenvolvidos noutra lugar através de métodos de



modelação. Deste modo, a sialorfina está extraordinariamente 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 integrativo. Considerando estas observações, de um ponto de vista funcional bem como fisiopatológico e terapêutico, a importância biológica das funções reguladas pela sialorfina de rato faz com que seja crucial investigar e identificar o homólogo funcional endógeno da sialorfina de rato nos humanos.

A sialorfina é o único regulador fisiológico sistemicamente activo identificado da actividade de encefalinase ligada à membrana em mamíferos. Isto levanta a questão da existência de tal inibidor da NEP-ectopeptidase endógena na saliva e sangue humanos. Não foi detectado o péptido QHNPR imunorreactivo (sialorfina) na saliva humana masculina utilizando um radioimunoensaio altamente sensível e específico (Rougeot *et al.*, 1994). No entanto, os dados bibliográficos permitem supor a presença de substâncias de baixo peso molecular ( $\leq 3000$  Da), que inibem a actividade da ectopeptidase NEP em humanos, especialmente na saliva humana. Embora este(s) componente(s) da saliva não tenha(m) sido caracterizado(s) bioquimicamente, foi observada uma diferença relacionada com o género na produção salivar deste(e) inibidor(es) de ectoenzimas humanas de degradação de encefalinas (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 síntese e secreção principais da sialorfina, respectivamente.

O gene que codifica o precursor de sialorfina SMR1 pertence a uma família multigénica cujos membros foram identificados em humanos. No entanto, o gene humano homólogo *stricto sensu* do gene *SMR1* de rato (*VCSA1* que codifica a SMR1) não foi encontrado em humanos (clonagem de ADNc e análise do genoma humano). Além disso, a potência inibidora da sialorfina de rato contra a NEP humana ancorada à membrana, a qual é expressa por linhas de células da próstata humana (LNCaP), existe mas é cerca de 10 vezes inferior àquela que foi obtida contra a NEP de roedor (rato, coelho). Esta aparente selectividade na interacção funcional entre a sialorfina de rato e a ectoenzima NEP é pelo menos surpreendente considerando o facto de a NEP de rato e humana terem uma analogia de sequência de aminoácidos relativamente alta (cerca de 85%). Por outro lado, a caracterização dos genes humanos da família multigénica à qual pertence o gene que codifica o precursor da sialorfina de rato (SMR1), revelou que existem em humanos, vários genes desta família, entre os quais foram caracterizados três, *i.e.*, os genes *hPB*, *hPBI* e *BPLP* que estão agregados 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 do pentapéptido SMR1 sialorfina.

Os numerosos dados recolhidos pelos inventores sustentam que o novo péptido, de sequência QRFSR, deriva da proteína BPLP ("Proteína Lacrimal Básica Rica em Prolina").

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

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

Por exemplo, estes sítios consenso foram definidos como sítios de dissociação do péptido sinal numa região que tem a sequência necessária para a peptidase sinal e em resíduos básicos emparelhados com ligações R-R reconhecidas como o sinal de processamento pela convertase de aminoácidos básicos emparelhados.

Nesses sítios consenso, os inventores encontraram

então uma sequência QRFSR, estreitamente relacionada, em termos estruturais, com a da sialorfina QHNPR de rato.

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

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

A presente invenção é dirigida a péptidos derivados da proteína BPLP humana, como novos inibidores de metalo-ectopeptidases.

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

A presente invenção é também dirigida a polinucleótidos que codificam os referidos péptidos e derivados peptídicos bem como a anticorpos dirigidos contra os referidos péptidos e seus derivados peptídicos.

Além disso, a presente invenção é dirigida às

utilizações em diagnóstico e terapêutica de uma proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação, bem como às utilizações em diagnóstico e terapêutica de polinucleótidos que codificam um péptido de acordo com a invenção e de anticorpos dirigidos contra um péptido de acordo com a invenção.

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

Por «purificado» e «isolado» entende-se, quando se faz referência a uma proteína ou péptido (incluindo anticorpos) ou uma sequência de nucleótidos, que a molécula indicada está presente na ausência substancial de outras moléculas biológicas. O termo "purificado" como aqui utilizado significa que estão presentes preferencialmente 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 moléculas 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 está substancialmente isenta de outras moléculas de ácido nucleico que não codificam o polipéptido objecto. No entanto, a molécula pode incluir algumas bases ou unidades adicionais que não afectam de forma prejudicial as características básicas da composição.

A invenção é definida pelas reivindicações.

### ***Péptidos***

Para os objectivos da invenção, um "péptido" é uma molécula constituída por uma matriz linear de resíduos de aminoácidos ligados uns aos outros na matriz linear por ligações peptídicas. Essa matriz linear pode ser opcionalmente cíclica, *i.e.*, as extremidades do péptido linear ou as cadeias laterais de aminoácidos no péptido podem ser unidas, *e.g.*, por uma ligação química. Tais péptidos de acordo com a invenção podem incluir muito preferencialmente desde cerca de 3 até cerca de 50 aminoácidos e especialmente desde cerca de 3 até 15 aminoácidos e podem incluir ainda estruturas secundárias, terciárias ou quaternárias, bem como associações intermoleculares com outros péptidos ou outras moléculas não peptídicas. Tais associações intermoleculares podem ser através de, sem limitação, ligação covalente (*e.g.*, através de ligações dissulfureto), ou através de quelação, interacções electrostáticas, interacções hidrófobas, ligação de hidrogénio, interacções ião-dipolo, interacções dipolo-dipolo, ou qualquer combinação das anteriores.

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

Um objecto da presente invenção é um péptido como definido na reivindicação 1 que é derivado da proteína BPLP

humana e que tem uma actividade moduladora, especialmente uma actividade inibidora das metalo-ectopeptidases.

"Derivado da proteína BPLP humana" significa que compreende, consiste essencialmente em, ou consiste num fragmento da proteína BPLP de 3 a cerca de 100 aminoácidos.

Particularmente um objecto da presente invenção é um produto de maturação da proteína BPLP bem como os seus derivados peptídicos.

Mais particularmente, é dirigida a 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.

Um "produto de maturação" é um péptido que é obtido através de dissociação do precursor da proteína BPLP por maturases naturais ou enzimas de conversão de pró-hormonas, ou enzimas de dissociação de aminoácidos básicos não emparelhados ou emparelhados relacionadas tais como, por exemplo a furina, convertases de PC ou PACE 4 (Seidah, 1995).

Os péptidos da invenção incluem "derivados de péptidos".

Os "derivados de péptidos" são péptidos que têm substituições de aminoácidos de um péptido parental, preferencialmente de uma a duas substituições de aminoácidos de um péptido parental particularmente quando o referido péptido parental compreende menos de 15 aminoácidos e preferencialmente menos de 10 aminoácidos, mas que retêm a especificidade de ligação e/ou actividade fisiológica do péptido parental. Como aqui utilizado, "que retêm a especificidade de ligação do péptido parental" significa que é capaz de se ligar a um anticorpo monoclonal ou policlonal que se liga a um dos produtos de maturação da BPLP ou ao receptor dos produtos de maturação da BPLP com uma afinidade que é pelo menos um décimo, mais preferencialmente pelo menos um meio, e muito preferencialmente pelo menos tão grande quanto aquela de um dos péptidos que são produtos de maturação da BPLP. A determinação dessa afinidade é preferencialmente realizada em condições de imunoensaio de ligação competitiva convencional. "Que retêm a actividade fisiológica do péptido parental" significa que retêm 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 desse modo otimizar as respostas nociceptiva, inflamatória, antidepressiva e/ou homeostática iónica locais e sistémicas ao stress. A determinação de se essa actividade é modulada é ainda descrita mais adiante nesta descrição.



Os péptidos da invenção incluem péptidos ou derivados peptídicos que compreendem, consistem essencialmente em ou consistem na sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, em que X1 representa átomo de H ou um aminoácido Cys ou um aminoácido Tyr, X2 representa Gln ou Glp quando X1 é H, ou X2 representa Gln quando X1 é Tyr ou Cys. 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.º 3).

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

Ainda outro péptido da invenção é o péptido que consiste na sequência CQRFSR.

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,  
Cys ou C para Cistina.

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

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

Para mais detalhes, pode fazer-se referência à WO 98/37100.

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

Os miméticos, incluindo peptidomiméticos, preferidos retêm a especificidade de ligação e/ou actividade

fisiológica do péptido parental incluindo o derivado de péptido, como descrito acima. Como aqui utilizado, um "mimético" é uma molécula que mimetiza algumas propriedades dos péptidos naturais, preferencialmente a sua especificidade de ligação e actividade fisiológica. Os miméticos preferidos são obtidos através de modificação estrutural de péptidos de acordo com a invenção, utilizando preferencialmente 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 aminoácidos são substituídas por uma unidade química diferente, ou uma ou mais das extremidades N-terminais, das extremidades C-terminais ou de uma ou mais cadeias laterais são protegidas por um grupo de protecção, e/ou são introduzidas ligações duplas e/ou ciclização e/ou estereoespecificidade na cadeia do aminoácido para aumentar a rigidez e/ou a afinidade de ligação.

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

Ainda outras modificações preferidas incluem

aquelas destinadas a melhorar a resistência à degradação enzimática, a melhorar a biodisponibilidade em particular pelos tecidos nervosos e das gónadas e mais geralmente nas propriedades farmacocinéticas e compreendem especialmente:

- a protecção dos grupos hidrófilos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  por esterificação ( $\text{COOH}$ ) com álcoois lipófilos ou por amidação ( $\text{COOH}$ ) e/ou por acetilação ( $\text{NH}_2$ ) ou adição de cadeia hidrófoba de carboxialquilo ou aromática na extremidade  $\text{NH}_2$ ;
- isómeros de retroinversão das ligações amida  $\text{CO-NH}$  ou metilação (ou cetometileno, metilenooxilo, 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 divulgadas, os especialistas na técnica são capazes de conceber e produzir miméticos que têm características de ligação e/ou actividades fisiológicas semelhantes ou superiores 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 "péptido de BPLP" refere-se à proteína BPLP, péptidos derivados de BPLP, péptidos de maturação da BPLP, e derivados de péptidos da invenção e miméticos, incluindo peptidomiméticos, aqui descritos.

A especificação descreve também um complexo molecular compreendendo:

- um receptor de metalo-ectopeptidases, especialmente um receptor de NEP ou um receptor de APN, 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 as moléculas de ADN ou ARN, que codificam os péptidos, incluindo os derivados de péptidos, definidos acima fazem também parte da invenção, embora tendo em conta a degeneração do código genético.

Por conseguinte, a presente invenção proporciona ácidos nucleicos que codificam os péptidos derivados da proteína BPLP humana, e seus derivados peptídicos.

Particularmente, a presente invenção proporciona ácidos nucleicos que codificam os péptidos que compreendem, consistem essencialmente em, ou consistem na sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg como definida 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 os 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 a QRFSR ou um ácido nucleico que codifica a YQRFSR.

Os ácidos nucleicos da invenção incluem sequências que são hibridizáveis com qualquer uma das sequências acima ou suas sequências complementares sob condições de hibridação convencionais, preferencialmente condições de alta restringência.

Uma molécula de ácido nucleico é "hibridizável" com outra molécula de ácido nucleico, quando uma forma de cadeia simples da molécula de ácido nucleico pode emparelhar com outra molécula de ácido nucleico nas condições apropriadas de temperatura e força iônica da solução (ver Sambrook *et al.*, 1989). As condições de temperatura e força iônica determinam a "restringência" da hibridação. Para a triagem preliminar de ácidos nucleicos homólogos, podem ser utilizadas condições de hibridação de baixa restringência, correspondentes 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). As 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 alta restringência correspondem à  $T_m$  mais alta, e.g., 50 % de formamida, 5x ou 6x SCC. A SCC é um NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M. A hibridação requer que os dois ácidos nucleicos possuam sequências complementares, embora dependendo da restringência da hibridação, são possíveis desemparelhamentos entre as bases. A restringência apropriada para hibridizar 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 homologia entre duas sequências de nucleótidos, maior será o valor da  $T_m$  para os híbridos de ácidos nucleicos que têm essas sequências. A estabilidade relativa (que corresponde a uma  $T_m$  mais elevada) das hibridações de ácido nucleico diminui pela seguinte ordem: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos com mais de 100 nucleótidos de comprimento foram obtidas equações para calcular a  $T_m$  (ver Sambrook *et al.*, supra, 9.50-9.51). Para hibridação com ácidos nucleicos mais curtos, i.e., oligonucleótidos, a posição dos 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 hibridizável é pelo menos cerca de 10 nucleótidos; preferencialmente pelo menos cerca de 15 nucleótidos.

Numa forma de realização específica, o termo "condições de hibridação convencionais" refere-se a uma  $T_m$

de 55 °C, e utiliza condições como estabelecidas 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, "alta restringência" refere-se a condições de hibridação e/ou lavagem a 68 °C em 0,2 X SSC, a 42 °C em formamida a 50 %, 4 X SSC, ou sob condições que proporcionam níveis de hibridação equivalentes àsquelas 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 foi transferida pelo menos um destes vectores. O vector de expressão de acordo com a invenção compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um péptido de acordo com da invenção, estando a referida sequência de ácido nucleico ligada operacionalmente a elementos que permitem a sua expressão. O referido vector contém vantajosamente uma sequência promotora, sinais para iniciação e terminação da tradução, bem como regiões apropriadas para regulação da tradução. A sua inserção dentro da célula hospedeira pode ser transitória ou estável. O referido vector pode conter também sinais específicos para secreção da proteína traduzida.

Estes vários sinais de controlo são seleccionados



de acordo com a célula hospedeira e podem ser inseridos em 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 estando limitadas a bactérias, leveduras, células vegetais, células de insectos, células de mamíferos, incluindo linhas celulares que estão comercialmente disponíveis. Os exemplos preferidos para células hospedeiras são COS-1, células HEK, células 293, ou células CHO.

É ainda divulgado um método de produção de um péptido de BPLP recombinante, em que a referida célula hospedeira é transfectada com o referido vector de expressão e é cultivada sob condições que permitem a expressão de um péptido de BPLP. A transfecção da célula hospedeira pode ser realizada utilizando qualquer técnica corrente, tal como electroporação ou precipitação com fosfato cálcio ou lipofectine®.

A proteína ou péptido pode ser em seguida recolhido e purificado, por meio de procedimentos bem conhecidos para purificação: o péptido ou proteína recombinante pode ser purificado a partir de lisados ou extractos de células, a partir do sobrenadante do meio de cultura, por métodos tais como cromatografia de HPLC, técnicas de imunoafinidade com anticorpos específicos, e semelhantes.

São também divulgados métodos de prognóstico e/ou diagnóstico *in vitro* em que as sequências de ácidos nucleicos da invenção ou sondas ou iniciadores derivados das mesmas são utilizados para detectar a síntese aberrante, incluindo síntese elevada ou baixa anormal, ou anormalidades genéticas ao nível do gene de *BPLP*.

Assim, a invenção proporciona um método *in vitro* para o prognóstico e/ou diagnóstico de uma condição que envolve uma produção alterada de BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção, método esse que compreende a detecção numa amostra biológica de um indivíduo de ensaio, de uma anormalidade em termos de qualidade e/ou quantidade no gene de BPLP ou no seu transcrito.

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

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

- pôr em contacto uma amostra biológica contendo ADN com oligonucleótidos específicos que permitem a amplificação da totalidade ou de parte do gene de BPLP, tendo o ADN contido na amostra sido tornado acessível,

quando apropriado, para hibridação, e em condições que permitem uma hibridação dos iniciadores com o ADN contido na amostra biológica;

- amplificar o referido ADN;
- 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 gene de BPLP.

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

Assim, outro objecto da presente invenção é um método para detectar uma anormalidade no transcrito de BPLP, como anteriormente definido que compreende os passos de:

- produzir ADNc a partir de ARNm contido numa amostra biológica;
- pôr em contacto o referido ADNc com oligonucleótidos específicos que permitem a amplificação da totalidade ou de parte do transcrito do gene *BPLP*, sob condições que permitem uma hibridação dos iniciadores com o referido ADNc;

- amplificar o referido ADNc;
- 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 de sonda específica, através de sequenciação ou por análise de sítios de restrição.

Um especialista na técnica conhece muito bem os métodos correntes para analisar o ADN contido numa amostra biológica e para diagnosticar um distúrbio genético. Estão disponíveis muitas estratégias para análise genotípica.

Preferencialmente, pode utilizar-se o método DGGE (Electroforese em Gel com Gradiente Desnaturante), ou o método SSCP (Polimorfismo Conformacional de Cadeia Simples) para detectar uma anormalidade no gene de BPLP. Tais métodos são preferencialmente seguidos de sequenciação directa. O método de RT-PCR pode ser vantajosamente utilizado para detectar anormalidades no transcrito de BPLP, já que permite visualizar as consequências de uma mutação de excisão-união tal como saltar um exão ou

excisão-união aberrante devido à activação de um sítio críptico. Este método é também preferencialmente seguido de sequenciação directa. A técnica mais recentemente desenvolvida utilizando chip de ADN pode ser também 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 *in vitro* de doenças, em que está envolvido o gene *BPLP*.

Os exemplos de tais doenças são as doenças citadas na secção "aplicação terapêutica".

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

A presente descrição descreve ainda 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 como definidos acima, incluindo os derivados de péptidos.

Por conseguinte, 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 definida 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. Numa forma de realização muito preferida, a presente invenção proporciona anticorpos dirigidos contra (*i.e.* que reconhecem especificamente) QRFSR ou anticorpos dirigidos contra (*i.e.* que reconhecem especificamente) YQRFSR ou anticorpos dirigidos contra (*i.e.* que reconhecem especificamente) CQRFSR.

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 de anticorpo ou paratopo. As moléculas de anticorpo ilustrativas 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).

Os anticorpos que inibem a interacção de um produto de maturação da BPLP ou um seu derivado peptídico com seu receptor são mais particularmente úteis.

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

São também bem conhecidos procedimentos para gerar anticorpos policlonais. Tipicamente, tais anticorpos podem ser gerados administrando a proteína ou péptido, incluindo o péptido conjugado, da presente invenção por via subcutânea a coelhos brancos New Zealand que foram primeiro sangrados para obter soro pré-imune. Os antigénios podem ser injectados num volume total de 50  $\mu$ L por sítio em dez sítios diferentes ou pelo menos cinco sítios diferentes. Os coelhos são depois sangrados cinco semanas após a primeira injeção e periodicamente reforçados com o mesmo antigénio administrado por via subcutânea a uma concentração cinco vezes inferior à da injeção primária no máximo três vezes a cada seis semanas, dependendo da qualidade da resposta imunológica. Uma amostra de soro é então recolhida a cada 10 dias após cada reforço. Os anticorpos policlonais são em seguida recuperados a partir do soro por cromatografia de afinidade utilizando o antigénio correspondente para capturar o anticorpo. Este e outros procedimentos para gerar anticorpos policlonais são divulgados em E. Harlow, *et al.*, editors, *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 contêm apenas uma espécie de sítio de combinação de anticorpo capaz de imunorreagir com um epítopo particular. Assim, um anticorpo monoclonal apresenta tipicamente uma única afinidade de ligação para qualquer epítopo com o qual imunorreage. Por conseguinte, um anticorpo monoclonal pode conter uma molécula de anticorpo possuindo uma multiplicidade de sítios de combinação de anticorpos, cada um imuno específico para um epítopo diferente, e.g. um anticorpo monoclonal biespecífico.

Os métodos laboratoriais de preparação de anticorpos monoclonais são bem conhecidos na técnica (ver, for exemplo, Harlow *et al.*, supra). Os anticorpos monoclonais (Mabs) podem ser preparados imunizando um mamífero, e.g. um murganho, rato, coelho, cabra, humano e semelhantes, contra a proteína BPLP purificada, produtos de maturação da BPLP ou seus derivados peptídicos, incluindo péptidos de BPLP conjugados. As células produtoras de anticorpos no mamífero imunizado são isoladas e fundidas com células de mieloma ou heteromieloma para produzir células híbridas (hibridoma). As células de hibridoma que produzem os anticorpos monoclonais são utilizadas como uma fonte do anticorpo monoclonal desejado.

Embora os Mabs possam ser produzidos por cultura de hibridomas, a invenção não está assim limitada. É também



considerada 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 segregadas 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 das moléculas de anticorpo inteiro, correspondentes às segregadas pelo hibridoma. Além disso, a literatura proporciona métodos para preparar anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia simples e variações semelhantes num fragmento de anticorpo imunorreactivo básico. Todos estes são considerados dentro do âmbito da invenção na medida em que é divulgada e reivindicada uma classe e especificidade de anticorpo, independentemente da estrutura exacta da variante que um especialista na técnica possa construir.

A presente invenção refere-se ainda a um método *in vitro* de diagnóstico, prognóstico ou determinação da evolução de uma condição que envolve uma produção alterada (*i.e.* uma diminuição ou um aumento da produção em comparação com um indivíduo de controlo) de BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção. O método compreende a detecção ou quantificação numa amostra biológica de um indivíduo de teste, de uma proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção, especialmente QRFSR, em

comparação com o mesmo numa amostra biológica de um indivíduo de controlo.

Os exemplos de tais condições são as doenças citadas na secção "aplicações terapêuticas".

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

"Um indivíduo" ou "um doente" é um vertebrado, e.g. um mamífero, preferencialmente um ser humano, independentemente da sua idade, género e condição geral. Estão também abrangidas as crianças e bebés. O indivíduo de teste pode ser assintomático, pode ser considerado como tendo probabilidade de desenvolver a doença ou condição. Podem ser também testados indivíduos com suspeição de um distúrbio alvo ou os indivíduos que já apresentaram sintomas da doença ou condição.

O "indivíduo de controlo" pode ser um indivíduo saudável ou um indivíduo sem qualquer distúrbio aparente que possa envolver a proteína BPLP ou um dos seus produtos de maturação. A fim de determinar a evolução de uma

condição que envolve a proteína BPLP ou um dos seus produtos de maturação, pode ser muito útil testar um indivíduo quanto à expressão da proteína BPLP ou de um dos seus produtos de maturação, e seguir o efeito de um fármaco ou a disseminação da condição, testando-o(a) 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 ao mesmo indivíduo de teste ou a um "indivíduo saudável".

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

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

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

Esses métodos de ensaio compreendem pôr em contacto uma amostra biológica com um parceiro de ligação capaz de interagir selectivamente com uma proteína BPLP ou os 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.

Os métodos de produção de anticorpos como descritos acima no contexto da terapêutica podem ser também facilmente adaptados para produzir anticorpos úteis para os métodos de diagnóstico ou prognóstico de acordo com a invenção.

Por exemplo, a presença ou produção de proteína BPLP ou de qualquer um dos seus produtos de maturação, ou de 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 produto de maturação da mesma, especialmente QRFSR, e.g. utilizando técnicas electroforéticas e de imunodiagnóstico líquidas ou sólidas convencionais, incluindo imunoenaios tais como ensaios de competição, reacção directa ou tipo sanduíche. Tais ensaios incluem, mas não se limitam a, transferências de Western; testes de aglutinação; imunoenaios mediados e marcados com enzima, tais como ELISAs; ensaios de tipo biotina/avidina; radioimunoenaios tais como aqueles que utilizam proteína BPLP ou qualquer um dos seus produtos de maturação, especialmente QRFSR, radioiodados ou tritiados; imunolectroforese; imunoprecipitação, etc. As reacções incluem geralmente marcadores de revelação 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 que foram feitos reagir com aquele.

Os ensaios supramencionados envolvem geralmente a separação da proteína BPLP não ligada ou seus produtos de maturação não ligados, especialmente QRFSR não ligada, da proteína BPLP ou produtos de maturação, especialmente QRFSR, ligados ao anticorpo específico que se encontra 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 poço de microtitulação); poli(cloreto de vinilo) (*e.g.*, lâminas ou poços de microtitulação); látex de poliestireno (*e.g.*, esférulas ou placas de microtitulação); fluoreto de polivinilidina; papel diazotado; membranas de nylon; esférulas activadas, esférulas magneticamente sensíveis, e semelhantes.

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

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

### ***Terapia genética***

De acordo com a presente invenção, a modulação da actividade das metalopeptidases da membrana pode ser conseguida modificando (*i.e.* aumentando ou diminuindo) a quantidade de proteína BPLP, e seus produtos de maturação nas células de um doente e a libertação a partir destas, ou expressando e possivelmente libertando um péptido, incluindo derivado de péptido, como definido acima. O aumento da quantidade da proteína BPLP ou seus produtos de maturação nas células de um doente e possivelmente a libertação a partir destas, expressando e possivelmente libertando um péptido como definido acima incluindo um derivado de péptido, pode ser realizado transfectando as células com um vector que expressa BPLP ou um vector que expressa uma proteína BPLP, um produto de maturação da BPLP ou um péptido como definido acima, incluindo um derivado de péptido, *e.g.* na forma de um ADN nu ou como um vector viral.

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

A utilização de um tal vector torna de facto possível melhorar a administração do ácido nucleico às células do indivíduo e especialmente às células a serem tratadas, e também para aumentar a sua estabilidade nas referidas células, o que torna possível obter um efeito terapêutico duradouro. Além disso, é possível introduzir várias sequências de ácido nucleico no mesmo vector, o que aumenta também a eficácia do tratamento.

O vector utilizado pode ser de várias origens, 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 escolhido de adenovírus, retrovírus, vírus adeno-associados (AAV), lentivírus, vírus de herpes, citomegalovírus (CMV), vírus vaccinia e semelhantes. Foram descritos na literatura vectores derivados de adenovírus, retrovírus ou AAVs, vectores retrovirais derivados de HIV, que incorporam sequências heterólogas de ácidos nucleicos.

Por conseguinte, a presente invenção refere-se

também a qualquer vírus recombinante que compreende, inserido no seu genoma, a sequência de ácido nucleico que codifica a proteína BPLP, um produto de maturação da 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 ácidos nucleicos da invenção numa forma incorporada num adenovírus, um AAV ou um retrovírus recombinante defeituoso.

A administração dirigida de genes é descrita na Publicação Internacional de Pat. WO 95/28494, publicada 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 o encapsulamento e transfecção de ácidos nucleicos in vitro. Informação sobre os lipossomas é também proporcionada na secção "composição farmacêutica" do presente pedido.

É também possível introduzir o vector in vivo como um plasmídeo de ADN nu. Os vectores de ADN nu para



terapia genética podem ser introduzidos das células hospedeiras desejadas por métodos conhecidos na técnica, e.g., transfecção, electroporação, microinjecção, transdução, fusão celular, DEAE dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, Lipofectamine®, utilização de um pistola de genes, ou utilização de um veículo de vector de ADN.

### ***Composições farmacêuticas***

Os péptidos de BPLP (o mesmo é dizer a proteína BPLP, péptidos derivados de BPLP, produtos de maturação, péptidos definidos acima, incluindo os derivados peptídicos e miméticos), ou os ácidos nucleicos que codificam tais péptidos de BPLP e anticorpos contra os referidos péptidos de BPLP 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, transcutânea ou intra-ocular e semelhantes.

A invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo o péptido ou derivado de péptido de acordo com a invenção ou um seu mimético, em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Uma matéria-objecto da invenção é também uma composição farmacêutica compreendendo um polímero do referido péptido de acordo com a invenção ou seu mimético.

Preferencialmente, o ácido nucleico faz parte de um vector que expressa o referido ácido nucleico.

Preferencialmente, as composições farmacêuticas contêm veículos que são farmacêuticamente aceitáveis para uma formulação que pode ser injectada.

As composições farmacêuticas adequadas podem ser em particular soluções salinas, isotónicas, estéreis (fosfato monossódico ou dissódico, cloreto de sódio, potássio, cálcio ou magnésio e semelhantes ou misturas de tais sais), ou composições secas, especialmente liofilizadas que após adição de água esterilizada ou soro fisiológico, dependendo do caso, permite a reconstituição de soluções injectáveis.

As doses do péptido de BPLP, anticorpos ou ácido nucleico utilizadas para administração podem ser adaptadas em função de vários parâmetros e, em particular, em função do modo de administração utilizado, da patologia relevante, ou alternativamente da duração de tratamento desejada.

Para preparar composições farmacêuticas para terapia com péptidos, pode dissolver-se ou dispersar-se uma quantidade eficaz do péptido de BPLP num veículo ou meio aquoso farmacêuticamente aceitável.

A seguir são proporcionados exemplos de formulações farmacêuticas.

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

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

Como aqui utilizado, um "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, isotónico e agentes retardadores da absorção e semelhantes. A utilização de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticas activas é bem conhecida na técnica. Excepto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o ingrediente activo, é considerada a sua utilização nas composições terapêuticas. Podem ser também incorporados ingredientes activos adicionais 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 todos os casos, a forma tem de ser estéril e tem de ser fluida até ao ponto em que é fácil de aplicar com uma seringa. Tem de ser estável nas condições de fabrico e conservação e tem de ser conservada contra a acção contaminante de microrganismos, tais como bactérias e fungos.

Podem ser preparadas soluções dos compostos activos na forma de base livre ou como sais farmacologicamente aceitáveis em água misturados adequadamente com um tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulose. Podem ser também preparadas dispersões em glicerol, polietilenoglicóis líquidos e misturas dos mesmos e em óleos. Em condições correntes de conservação e utilização, estas preparações contêm um conservante para prevenir o crescimento de microrganismos.

O veículo pode ser também um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), misturas adequadas dos mesmos, 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 tensioactivos. A prevenção da acção de microrganismos pode ser efectuada por 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 conseguida pela utilização nas composições de agentes de retardamento da absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

As soluções injectáveis estéreis são preparadas incorporando os compostos activos na quantidade necessária no solvente apropriado com uma variedade dos outros ingredientes enumerados acima, consoante necessário, seguido de esterilização por filtração. 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 secagem por liofilização que produzem um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração dos mesmos.

Após formulação, as soluções serão administradas de uma maneira compatível com a formulação de dosagem e numa quantidade que seja terapeuticamente eficaz. As formulações são facilmente administradas numa variedade de formas de dosagem, tais como o tipo de soluções injectáveis descritas acima, mas podem ser também utilizadas cápsulas de libertação de fármaco e semelhantes.

Por exemplo, para administração parentérica numa solução aquosa, a solução deve ser adequadamente tamponada se necessário e o diluente líquido tornado primeiro isotónico com soro fisiológico ou glucose suficiente. Estas soluções aquosas particulares são especialmente adequadas para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. A este respeito, os meios aquosos estéreis que podem ser utilizados serão conhecidos dos especialistas na técnica à luz da presente divulgação. Por exemplo, uma dosagem poderia ser dissolvida em 1 mL de solução de NaCl isotónica e adicionada a 1000 mL de líquido de hipodermóclise ou injectada no sítio de infusão proposto, (ver por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, páginas 1035-1038 e 1570-1580). Ocorrerá necessariamente alguma variação na dosagem dependendo da condição do indivíduo a ser tratado. A pessoa responsável pela administração determinará, em qualquer evento, a dose apropriada para o indivíduo em questão.

O péptido de BPLP de interesse pode ser formulado numa mistura terapêutica de forma a compreender cerca de 0,0001 a 100 miligramas, ou cerca de 0,001 a 0,1 miligramas, ou cerca de 0,1 a 1,0 ou até mesmo cerca de 1 miligrama a 10 miligramas ou até mesmo cerca de 10 a 100 miligramas por dose ou próximo. Podem ser também administradas doses múltiplas. As dosagens preferidas são desde cerca de 0,1 µg/kg a cerca de 1 mg/kg, mais preferencial-

mente desde cerca de 1 µg/kg a cerca de 100 µg/kg, e muito preferencialmente desde cerca de 10 µg/kg a cerca de 100 µg/kg.

Além das formulações para administração parentérica, tal como injeccção intravenosa ou intramuscular, outras formas farmacêuticamente aceitáveis incluem, e.g. comprimidos ou outros sólidos para administração oral; formulações lipossómicas; cápsulas de libertação regulada; e qualquer outra forma actualmente utilizada, incluindo cremes.

São consideradas outras vias de administração, incluindo soluções ou formulações para pulverização nasal, aerossóis ou inalantes, ou supositórios vaginais ou rectais e pessários ou cremes, e polímeros de administração de acção prolongada.

Em certas formas de realização, é considerada a utilização de lipossomas e/ou nanopartículas para a introdução dos agentes de péptidos de BPLP, bem como vectores de ácido nucleico ou anticorpos nas células hospedeiras.

A invenção refere-se também às composições farmacêuticas definidas acima compreendendo ainda um segundo agente farmacêutico que actua sinergicamente com o péptido de BPLP.

### ***Aplicações terapêuticas***

Os péptidos de BPLP descritos acima, anticorpos contra os referidos péptidos de BPLP ou ácidos nucleicos que codificam os referidos péptidos de BPLP são úteis na prevenção ou tratamento de doenças ou distúrbios, em que é procurada uma modulação da actividade de uma metalo-ectopeptidase de membrana, 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, Bradicinina, Angiotensina II e Péptido Natriurético Auricular, a quais desempenham um papel chave no controlo da percepção da dor central e periférica, fenómenos inflamatórios, troca de minerais e/ou tónus arterial (Roques *et al.*, 1993).

Mais particularmente, a endopeptidase neutra, NEP 24-11, encontra-se distribuída pelos 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 metabolismo de neuropéptidos, péptidos imunorreguladores sistémicos e hormonas peptídicas. Ao controlar os níveis activos de péptidos reguladores circulantes ou segregados, a NEP modula a sua acção fisiológica mediada pelo receptor. Desse modo, a NEP ancorada à membrana está envolvida na regulação da



actividade de: péptidos vasoactivos potentes tais como Substância P, Bradicinina (BK), Péptido Natriurético Auricular (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 líquidos tais como ANP, Péptido Natriurético de tipo C (CNP) e Péptido Natriurético de tipo B (BNP). No entanto, os níveis destes péptidos são modificados através da formação/degradação induzida pela NEP apenas nas regiões onde são libertados tonicamente ou onde a sua libertação é desencadeada por um estímulo.

De um ponto de vista integrativo, a actividade biológica da NEP é controlar os níveis activos de sinais peptidérgicos envolvidos na regulação da tensão arterial, em fenómenos inflamatórios e na homeostasia da água-minerais, bem como, no controlo do processamento da dor. De um ponto de vista clínico, isto justifica o facto de a NEP ser um alvo farmacológico importante em vários estados patológicos. Por exemplo, ao inibir a NEP, aumentando desse modo os níveis e duração da acção de opióides endógenos centrais ou periféricos, pode ser obtido um efeito analgésico ou um efeito antidepressivo, ou ao inibir a formação de AII endógena e inactivar as substância P, BK e ANP, podem ser obtidos agentes anti-hipertensores, 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 da libertação tónica ou evocada por estímulos dos efectores naturais que ocorrem em situações de stress ambiental, comportamental e fisiopatológico (Roques *et al*, 1993).

Os exemplos de metalopeptidases de membranas de mamíferos, além da NEP, são a ECE (Enzimas de Conversão de Endotelina), em particular ECE1 e ECE2, o antigénio da superfície de eritrócitos KELL e o produto do gene PEX associado ao raquitismo hipofosfatémico ligado ao X, bem como a ACE (Enzima de Conversão da Angiotensina) 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 conjunto com NEP tem aplicação significativa no tratamento de dor e depressão.

A inibição de metalopeptidases relacionadas com a membrana tem efeitos terapêuticos no tratamento de tumores, nomeadamente cancros ovariano, colorrectal, do cérebro, do pulmão, do pâncreas, gástrico e melanoma, e na redução da incidência de metástases, aterosclerose e/ou hipertensão. As inibições de metalopeptidases relacionadas com a membrana têm também efeitos terapêuticos no controlo da

dor. Tais efeitos antinociceptivos na dor aguda são efeitos analgésicos, mas também efeitos sobre a dor inflamatória crônica tal como artrite ou doença inflamatória do intestino.

Além disso, prevê-se que a inibição de metalopeptidases bacterianas ou virais possua efeitos anti-infecciosos, desempenhando as metalopeptidases um papel importante na invasão do tecido hospedeiro pelo agente patogénico e nos processos imunológicos e inflamatórios, por exemplo aqueles de *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis* e *Legionella pneumophila*.

Além disso, as metalopeptidases bacterianas, especialmente as metalopeptidases de zinco desempenham um papel importante nas doenças provocadas por toxinas proteolíticas, tais como as toxinas de *B. anthracis* (factor Letal de Antraz) 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 707169).

A importância dos 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 divulgados em Turner *et al*, 2001; Kenny *et al*, 1977; Kenny *et al*, 1987; Beaumont *et al*, 1996.

Um objecto da presente invenção é os péptidos ou ácidos nucleicos terapêuticos descritos acima para serem utilizados como agentes analgésicos através da inibição da NEP e APN aos níveis periférico, espinal e/ou supraespinal, aumentando, desse modo, os níveis e duração da acção de opióides endógenos centrais ou periféricos, incluindo encefalinas.

Encontra-se contemplada a prevenção ou tratamento de dor, especialmente dor aguda e crónica, dor inflamatória e neuropática visceral.

É também descrita a prevenção ou tratamento de qualquer desequilíbrio hidromineral. Entre os distúrbios alvo, pode citar-se os distúrbios dos ossos, dentes, rim, paratireóide, pâncreas, intestino, mucosa do estômago, próstata e glândula salivar que são provocados pelo desequilíbrio hidromineral.

Em particular, o distúrbio pode ser seleccionado do grupo consistindo de hiper ou hipoparatiroidismo, osteoporose, pancreatite, litíase da glândula submandibular, nefrolitíase e osteodistrofia.

A prevenção ou tratamento de distúrbios interpes-

soais e comportamentais debilitados é de maior interesse. Vários distúrbios mentais são descritos na WO 02/051434.

Em particular a descrição refere-se a qualquer distúrbio seleccionado do grupo consistindo de distúrbio evitante, distúrbio de estado de consciência diminuído, distúrbio autístico, distúrbio de hiperactividade com défice de atenção, distúrbio da excitação, hospitalismo, funcionamento interpessoal e relacionamento com o mundo exterior dificultados, distúrbio esquizóide da personalidade, esquizofrenia, distúrbio depressivo, interesse diminuído pelo ambiente, actividade social dificultada associada à sexualidade, e comportamento sexual debilitado, incluindo ejaculação prematura e hiperactividade sexual.

Doenças em que é procurada uma modulação de uma metalopeptidase de membrana incluem também a hipertensão, aterosclerose, tumor, artrite inflamatória e doença do intestino.

É também descrito o tratamento de infecções. Especialmente, a importância dos inibidores de proteínase para o tratamento de doenças bacterianas ou virais pode ser encontrada em J. Potempa e Travis.

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

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

A presente descrição descreve também a utilização dos péptidos ou ácidos nucleicos descritos acima como um substituto no tratamento do abuso de drogas, nomeadamente o abuso da droga morfina.

Na realidade, estudos sugeriram que a vulnerabilidade para o abuso de drogas e o desenvolvimento de recompensa e toxicodependência é pelo menos em parte, uma consequência de modificações preexistentes ou induzidas e/ou defeito do sistema opióide endógeno. A este respeito, a utilização do péptido de BPLP ou ácido nucleico para potenciar os efeitos das encefalinas endógenas reduzirá os vários efeitos secundários (sinais somáticos do desmame) produzidos pela interrupção da administração crónica de morfina ou heroína.

De acordo com a invenção, a redução do efeito inibidor dos péptidos de BPLP sobre a NEP pode ser desejada, *e.g.* utilizando um anticorpo contra a proteína BPLP ou péptidos. Esta melhoria da actividade de NEP é particularmente vantajosa no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como uma doença ou distúrbio associado à amiloidose. De facto, foi demonstrado que a inibição da neprilisina (uma endopeptidase neutra, NEP ou encefalinase) por inibidores sintéticos, aumenta os níveis

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

Uma doença ou distúrbio é associado à amiloidose quando os depósitos amilóides ou placas amilóides se encontram sobre ou na proximidade dos tecidos afectados pela doença, ou quando a doença é caracterizada pela produção excessiva de uma proteína que é ou que se pode tornar insolúvel. As placas amilóides podem provocar efeitos patológicos directa ou indirectamente por mecanismos conhecidos ou desconhecidos. Os exemplos de doenças amilóides incluem, mas não se limitam a, doenças sistémicas, tais como doenças inflamatórias crónicas, mieloma múltiplo, macroglobulinemia, polineuropatia 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 de Muckle-Wells), carcinoma medular da tireóide, amilóide auricular isolada, e amiloidose associada à hemodiálise (HAA); e doenças neurodegenerativas.

O termo "doença neurodegenerativa" refere-se a

uma doença ou distúrbio do sistema nervoso, envolvendo particularmente o cérebro, que se manifesta com sintomas característicos de disfunção cerebral ou nervosa, *e.g.*, lapsos ou defeitos de memória de curto prazo ou longo prazo, demência, defeitos cognitivos, problemas de equilíbrio e coordenação, e deficiências emocionais e comportamentais. A especificação descreve também doenças neurodegenerativas que estão associadas à amiloidose. Tais doenças estão "associadas à amiloidose" quando amostras histopatológicas (biopsia) de tecido cerebral de indivíduos que demonstram tais sintomas revelem a formação de placa amilóide. As amostras de biopsia do cérebro, especialmente cérebro humano, são obtidas com grande 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 baseia-se em critérios diferentes da presença de depósitos de amilóides, tais como placas ou fibrilhas, numa amostra de biopsia.

Em particular, 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 de amilóide (APP) próximo da extremidade amino da porção  $\beta$ AP da APP. Outra doença desse tipo é a hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (HCHA ou HCHWA)-tipo Holandês. Outras doenças desse tipo conhecidas na técnica incluem, mas não se limitam a, angiopatia amilóide cerebral esporádica, angiopatia amilóide cerebral hereditária, síndrome de Down,



Parkinson-demência de Guam, e angiopatia amilóide assintomática relacionada com a idade.

Num outro aspecto, a doença neurodegenerativa é uma encefalopatia espongiiforme subaguda, tal como, mas não se limitando a, tremor epizoótico dos ovinos, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Gerstmann-Straussler, kuru, doença de perda crónica de massa de veados e alces, encefalopatia espongiiforme bovina do gado, e encefalopatia transmissível de marta.

A descrição divulga 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 da membrana para a preparação de uma composição terapêutica para prevenir ou tratar doenças em que é procurada uma modulação da actividade da referida metalopeptidase da membrana.

### ***Métodos de triagem***

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

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 pelos métodos convencionais de química orgânica.

A invenção proporciona um método *in vitro* para seleccionar compostos quanto à sua capacidade para se ligar ao sítio de ligação da NEP da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção e.g. o péptido QRFSR, que compreende os passos de:

a) incubar um composto candidato com uma célula que expressa a NEP, na presença da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação, e.g. o péptido QRFSR, ou na presença de qualquer péptido que retenha a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos de maturação, e.g. o péptido YQRFSR;

b) determinar a capacidade do composto candidato para competir com a proteína BPLP ou o seu produto de maturação, e.g. o péptido QRFSR ou com o péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos de maturação, e.g. o péptido YQRFSR, para se ligar à NEP.

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

A célula que expressa a NEP pode estar numa cultura de células, tal como uma monocamada de cultura de células alvo confluentes, ou num espécime de órgão alvo ou numa amostra de tecido (e.g. criossecções, cortes, preparações de membranas ou homogenatos em bruto) que contém sítios de ligação de NEP da proteína BPLP ou um seu produto de maturação, e.g. o péptido QRFSR.

Uma amostra de tecido preferido que é utilizada nos métodos de triagem de acordo com a presente invenção é uma preparação de membranas ou cortes da medula espinal de um mamífero, um tecido conhecido como sendo apropriado para medição da actividade de NEP

Outras amostras de tecidos preferidos que podem ser utilizadas nos métodos de triagem de acordo com a presente invenção são todas as preparações de tecidos periféricos que são conhecidos por serem enriquecidos em peptidase NEP e/ou por serem alvos para a proteína BPLP ou um seu produto de maturação, e.g. o péptido QRFSR. Por exemplo, pode utilizar-se medula externa renal de mamífero, placenta, testículo, próstata e osso. Por exemplo, um tal procedimento pode ser aplicado aos tecidos e/ou células de origem em murganho, rato ou humanos ou linhas de células transfectadas com ADNc de metalo-ectopeptidases, em particular ADNc de NEP, especialmente ADNc 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 maturados) é preferencialmente marcado, e.g. por um marcador radioactivo ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  etc...) ou não radioactivo (digoxigenina, CyDye-európio, fluoresceína etc..). Em seguida é incubado com a célula que expressa a NEP durante um tempo suficiente e nas condições para que ocorra ligação específica.

O marcador ligado 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.

Por conseguinte, a presente invenção proporciona ainda um processo para seleccionar um composto que se liga especificamente aos sítios de ligação de NEP da proteína BPLP, ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção que compreende os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido (tal como criossecções ou cortes ou preparações de membranas ou homogenatos em bruto) que contém sítios de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção;
- b) adicionar o composto candidato a ser testado em competição com uma concentração de semi-satu-

ração da proteína BPLP ou seu produto de maturação marcado, ou um péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados;

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 ligação específica;

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 (preferencialmente  $10^{-10}$  até  $10^{-5}$  M).

No referido processo acima, uma concentração de semi-saturação é a concentração da proteína BPLP ou seu produto de maturação marcado, *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 maturados) que se liga a 50 % dos sítios de ligação de NEP.

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

A presente especificação descreve também um processo para determinar a afinidade relativa dos compostos ligandos que se ligam especificamente aos sítios de ligação de NEP da proteína BPLP, ou produtos de maturação, (ou o péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados), compreendendo o referido processo os passos a), b), c) e d) do processo acima para cada composto candidato e compreendendo ainda o passo e) de comparação da afinidade de cada composto candidato quantificado no passo d) com aquela dos outros compostos candidatos.

Outro objecto da presente invenção é um processo para determinar a afinidade de um composto que se liga especificamente ao sítio de ligação de NEP da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção, que compreende os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido (tal como criossecções ou cortes ou preparações de membranas ou homogenatos em bruto) que contém sítios de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção;
- 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 que ocorra ligação específica; 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  $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  M).

O composto candidato é preferencialmente marcado, e.g. por um marcador radioactivo ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{126}\text{I}$  etc...) ou não radioactivo (digoxigenina, CyDye-európio, fluoresceína etc..). Em seguida, é incubado com a célula que expressa a NEP durante um tempo suficiente e em condições para que ocorra ligação específica.

Pode ainda comparar-se a afinidade de cada composto candidato quantificado com a dos outros compostos candidatos, para que seja determinada a afinidade relativa do composto candidato que se liga especificamente ao sítio de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um seu produto de maturação, e.g. o péptido QRFS.

A invenção proporciona ainda um método *in vitro* para seleccionar compostos quanto à sua capacidade para actuar como agonistas ou antagonistas da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação de acordo com a

invenção na actividade de NEP, método esse que compreende os passos de:

- a) incubar um composto candidato com uma célula que expressa a NEP, na presença de (i) a proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção, ou qualquer péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados, e (ii) um substrato de NEP;
- b) determinar a endoproteólise do substrato de NEP pelo NEP, em que uma endoproteólise aumentada na presença do composto candidato, em comparação com a endoproteólise na ausência do composto candidato, é indicativa de uma actividade antagonista; enquanto 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 uma proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção é uma molécula que tem a capacidade para inibir uma actividade de metalo-ectopeptidase, especialmente actividade de NEP ou APN.

Como aqui utilizado, um antagonista de uma proteína BPLP ou seu produto de maturação é uma molécula que tem a capacidade para aumentar uma actividade de metalo-peptidase, especialmente actividade de NEP ou APN.



Além disso, a actividade agonista ou antagonista do composto candidato pode ser avaliada determinando as alterações metabólicas induzidas por este composto candidato no seu alvo, tal como a síntese e/ou libertação de metabolitos mensageiros primários ou secundários devido a um sinal de transdução através de proteína-cinases ou adenilato-ciclase e à activação de uma proteína da família G.

Em formas de realização particulares, a presente invenção refere-se também a um processo para seleccionar um composto que é um agonista da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção, que compreende os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido (tal como criossecções ou cortes ou preparações de membranas ou homogenatos em bruto) que contém sítios de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção,
- b) incubar 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  $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  M), uma concentração de semi-saturação da

proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção ou qualquer péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados e um substrato de NEP durante um tempo suficiente para que ocorra a endoproteólise do substrato de NEP sob condições de velocidade inicial;

c) quantificar a actividade da NEP presente no material biológico do passo a) medindo os níveis de endoproteólise do substrato de NEP, respectivamente na presença ou na ausência do composto candidato e na presença ou na ausência da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção, ou o péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados.

No referido processo acima, uma concentração de semi-saturação é a concentração de proteína BPLP ou um seu produto de maturação que resulta numa redução em metade da degradação do substrato de NEP.

Outro objecto da presente invenção compreende um processo para seleccionar um composto que é um antagonista da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção, que compreende os passos de:

a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido (criossecções ou cortes ou preparações de membranas ou homogenatos em bruto) que contém sítios de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção;

b) incubar 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 sob condições de velocidade inicial na presença de uma concentração submáxima da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção ou qualquer péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados e um substrato de NEP, na presença do composto candidato durante um tempo suficiente para que ocorra a endoproteólise do substrato de NEP sob condições de velocidade inicial;

c) quantificar a actividade da NEP presente no material biológico do passo a) medindo os níveis de endoproteólise do substrato de NEP, respectivamente na presença ou na ausência do composto candidato e na presença ou na ausência da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação de acordo com a invenção ou o péptido que retém a especificidade de ligação ou a

actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados.

Numa forma de realização preferida do referido processo acima, uma concentração submáxima é uma concentração de péptido que resulta numa redução em pelo menos 50 % e preferencialmente em 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 mostra o perfil de HPLC de troca catiónica representativo do marcador  $^3\text{H}$ -YQRF $^3\text{S}$ R adicionado a 2,5 mL de extracto salivar de metanol-ácido correspondente a 2,5 mL de saliva humana. A recuperação do pico radioactivo principal foi avaliada em 75-84 % (barras ponteadas).

A Figura 2 mostra o perfil de HPLC de troca catiónica representativo de um extracto salivar de metanol-ácido obtido a partir de 7 mL de saliva humana. As fracções foram analisadas quanto à sua potência inibidora da endoproteólise da substância P pela actividade ectoendopeptidase humana (linha de células LNCaP).

A Figura 3 é um perfil de HPLC de fase inversa representativo das fracções 13-14 activas por

HPLC-EC principais (barras ponteadas). As fracções foram analisadas quanto à sua potência inibidora da endoproteólise da substância P pela actividade de ecto-endopeptidase humana (linha de células LNCaP).

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

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

A Figura 6 mostra o efeito do YQRFSR derivado do péptido QRFSR da hBPLP na degradação da substância P pela actividade de ecto-endopeptidase humana (linha de células LNCaP), a concentração eficaz do péptido YQRFSR variou desde 5 a 50  $\mu\text{M}$  e encontrando-se metade do máximo a 30  $\mu\text{M}$ .

A Figura 7 mostra o efeito do YQRFSR derivado do péptido QRFSR da hBPLP na degradação da substância P pela actividade da ecto-endopeptidase NEP de rato (tecido renal), a concentração eficaz do péptido YQRFSR variou desde 5 a 75  $\mu\text{M}$  e encontrando-se metade do máximo a 38  $\mu\text{M}$ .

A Figura 8 é uma análise cromatográfica por RP-HPLC do péptido YQRFSSR. O péptido YQRFSSR (175 µM) não foi metabolizado pelas endopeptidases da superfície das células humanas, *in vitro*, ao passo que inibiu em 70% a endoproteólise da substância P mediada pela ectoendopeptidase NEP humana. As características cromatográficas de RP-HPLC revelaram que:

1/ o péptido YQRFSSR não é metabolizado pelas membranas de células humanas contendo NEP; 93 % foi recuperado como péptido intacto contra 94 % na ausência de membranas de metabolização;

2/ nas mesmas condições experimentais o péptido YQRFSSR inibe em 70% a endoproteólise da substância P por estas membranas de células humanas.

A Figura 9 mostra o efeito inibidor do péptido QRFSR na degradação da substância P pela NEP humana recombinante. Efeito inibidor dependente da concentração do Péptido QRFSR na actividade da NEP humana recombinante solúvel e nenhum efeito do péptido QRFSR na endoproteólise da substância P pela actividade da hDPPIV recombinante solúvel. A Figura 10 mostra o efeito inibidor do péptido QRFSR na degradação do substrato sintético do APN pelo APN humano da superfície celular. Inibição dependente da concentração pelo péptido QRFSR da

dissociação do substrato cromogénico Ala-pNA pelo HEK- hAPN da superfície celular.

A Figura 11 mostra o efeito inibidor do péptido QRFSR na degradação do substrato sintético da NEP pela NEP humana da superfície celular. Inibição dependente da concentração pelo péptido QRFSR da dissociação do substrato fluorogénico Mca-BK2 pelo HEK- hNEP da superfície celular.

A Figura 12 mostra o efeito *in vivo* do péptido YQRFSR no tempo dispendido pelo rato a lambar a pata posterior injectada com formalina; Média  $\pm$  EPM.

A Figura 13 mostra o efeito *in vivo* do péptido YQRFSR no número de espasmos de dor após injeção de formalina na pata posterior; Média  $\pm$  EPM.

A Figura 14 mostra o efeito *in vivo* do péptido YQRFSR no índice de espasmos de dor durante os 60 minutos após a injeção de formalina. A analgesia induzida pelo péptido derivado de QRFSR requer a activação dos receptores opióides endógenos.

#### **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 isolamento deste produto foi com base no isolamento de componentes salivares de baixa massa molecular, que inibem a endoproteólise do substrato sensível à NEP pelas células humanas que expressam 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 por análise de sequência do(s) inibidor(es) da ectopeptidase NEP endógena natural em humanos, *i.e.*, o(s) homólogo(s) funcional(ais) salivar(es) endógeno(s) da sialorfina de rato.

#### **EXEMPLO 1: Preparação de saliva humana**

O protocolo de investigação clínica estabelecido com o "centre de recherche Vaccinate et Biomedicate" do Instituto Pasteur, número de acesso: 2045, recebeu o acordo da comissão CCPRB (PARIS-COCHIN) e as amostragens de saliva humana de 10 voluntários masculinos saudáveis, começaram em Maio de 2003 e prosseguiram em Outubro de 2003. A saliva foi recolhida em tubos "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 conservadas a -80 °C até ser realizado o procedimento de extracção com metanol.

#### **EXEMPLO 2: Materiais e modelos experimentais para inibição da NEP**

##### 1- Fontes das ectopeptidases humanas NEP e APN:

Foram descritas várias linhas de células humanas



como expressando a NEP bem como outros membros da família da metaloectopeptidases; entre elas encontra-se uma linha celular de osteoblastos, MG-63 (osteossarcoma), uma linha celular de trofoblastos, BeWo (coriocarcinoma placentário), uma linha de células epiteliais da próstata, LNCaP (adenocarcinoma) e uma linha celular de enterócitos, Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal). Foram primeiro desenvolvidas condições de cultura em meio definido úteis para as análises de farmacologia celular. Em segundo lugar, os inventores confirmaram utilizando transferência de Northern e análises imunocitoquímicas que as LNCaP e BeWo eram as únicas linhas de células capazes de expressar a NEP (ARNm e proteína da superfície celular) em condições de cultura em meio definido (*i.e.*, RPMI contendo insulina, transferina e selênio, GIBCO) e após indução pela DHT (di-hidrotestosterona) e forskolina, respectivamente. E finalmente, no modelo experimental de incubações estáticas de preparações de membranas com origem a partir destas células, os inventores definiram os parâmetros que permitem analisar a endoproteólise mediada pela NEP humana da substância P nas condições de medição de velocidade inicial, *i.e.* 100 pM / min / µg de proteínas das membranas de células LNCaP (actividade específica 10 vezes menor para as BeWo). A actividade das membranas da 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 µM) e o captopril (10 µM) que bloqueiam as actividades da aminopeptidase (APN, APB.) e da enzima de conversão da angiotensina (ACE), respectivamente,

não inibiram a hidrólise da substância P pelas ectopeptidases da superfície celular; indicando assim que nas condições experimentais, a degradação extracelular da substância P era principalmente provocada pela actividade da endopeptidase NEP localizada na superfície destas células.

Além disso, foi também desenvolvido o modelo *in vitro* utilizando as preparações de membranas de células HEK transfectadas com ADNc de NEP humana ou ADNc de APN humano (as células HEK não expressam estas metaloectopeptidases) e NEP humana recombinante solúvel ou DPP IV humana recombinante solúvel (Dipeptidilaminopeptidase IV) (sem o citosol N-terminal e segmento transmembranar).

## 2- Substratos e inibidores:

As actividades *in vitro* das amino- e endo-ectopeptidases de membrana das membranas de células humanas são analisadas *in vitro* medindo a degradação dos seguintes substratos sintéticos e naturais:

a/ *Substratos fluorogénicos ou cromogénicos 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 ou Ala-pNA (APN) (Bachem)

*b/ Substratos fisiológicos:*

- Substância P tritiada modificada [(3,4<sup>3</sup>H)Pro-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-enkefalina nativa: Y-G-G-F-M (NEP-APN) (Peninsula-Biovalley) Medindo a hidrólise destes substratos por peptidases da membrana celular na presença e ausência de diferentes inibidores de peptidase sintéticos selectivos disponíveis foi avaliada a especificidade do ensaio de peptidase:
  - Tiorfano, Fosforamidão (NEP) (Sigma e Roche)
  - Bestatina, Amastatina (APN) (Calbiochem)
  - inibidor II de DPPIV (DPPIV) (Calbiochem)
  - Captopril (ACE) (Sigma)

3- Medição das actividades das peptidases

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 membranas, as células foram homogeneizadas a 4 °C em 10 volumes (vol./peso) de Tris/HCl 50 mM tamponado a pH 7,1. Uma primeira centrifugação a 1000 X g e 5 °C durante 5 min permite remover os detritos celulares e os núcleos no sedimento. Uma segunda centrifugação a 100 000 X g e 5 °C durante 30 min concentra a fracção de membranas no

sedimento, o qual será superficialmente lavado três vezes em tampão de Tris/HCl frio, ressuspensão em tampão fresco, dividido em alíquotas e conservado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , enquanto aguarda para ser utilizado como fonte de enzima. A determinação das proteínas foi realizada utilizando o ensaio de proteína DC da Bio-Rad com Albumina de Soro Bovino (BSA) como o padrão.

A hidrólise dos substratos foi medida seguindo a 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 reaccional convencional consistiu em membranas celulares num volume final de  $200\text{ }\mu\text{L}$  de Tris-HCl  $50\text{ mM}$ , pH  $6,5-7,2$ . O substrato foi adicionado após pré-incubação durante  $10\text{ min}$  e a digestão realizada durante  $20\text{ min}$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  num banho de água com agitação constante. A reacção foi terminada arrefecendo até  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e adicionando HCl (concentração final de  $0,3\text{N}$ ). Os tubos reaccionais foram em seguida centrifugados ( $4700\text{ X g}$  durante  $15\text{ min}$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e medidos o substrato intacto remanescente e seus metabolitos.

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

- foram utilizados cartuchos C-18 Sep-Pak (Waters) para analisar a hidrólise da substância P marcada radio-

activamente. Os metabolitos  $^3\text{H}$  foram isolados por eluição com  $\text{H}_2\text{O}$ -0,1 % de TFA e em seguida com 25% de metanol-0,1 % de TFA (4 mL cada). O substrato tritiado intacto foi eluído com 75-100 % metanol-0,1% de TFA (4 mL).

- foi utilizada RP-HPLC acoplada a um espectrofotómetro para analisar a hidrólise da Met-encefalina, (coluna C-18 LUNA, AIT). A eluição com um gradiente linear de 30 min desde 0,1 % de TFA em água até 0,1 % de TFA em acetonitrilo a 100%, a 1 mL/min, separa os dois metabolitos da 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 caudal de saída da coluna a 264 nm (L3000, Merck).
- O desaparecimento do substrato Met-encefalina inicial foi também quantificado por radioimunoensaio (RIA). O ensaio utilizou 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 dos metabolitos Tyr-Gly-Gly e Phe-Met. A radioactividade de cada fracção foi determinada por espectrometria de cintilação líquida.

No caso da utilização de substratos sintéticos, a cinética de aparecimento do sinal fluorescente (intensidade e polarização) foi directamente analisada utilizando um

espectrofluorímetro de múltiplos poços; a intensidade do sinal é directamente proporcional à quantidade de metabolitos produzidos durante a reacção.

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

O protocolo de extracção e purificação dos componentes salivares humanos imitou aquele que foi desenvolvido e estabelecido para a caracterização molecular da sialorfina da saliva de rato (Rougeot *et al.*, 1994), e os extractos e as fracções cromatográficas foram analisados quanto à sua capacidade para inibir a hidrólise do substrato fisiológico, substância P, pelas membranas de células 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 com metanol-ácido: Extracção de componentes de baixa massa molecular em metanol-ácido a 4 °C; a 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 alto peso molecular (incluindo as enzimas de degradação), as quais são

inactivadas e precipitadas 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 agitada 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 HPLC de troca catiónica (HPLC-EC): A saliva extraída com metanol foi solubilizada no solvente A, *i.e.*, acetato de amónio 10 mM pH 4,3, e injectada numa coluna de carboximetilo HEMA-IEC BIO-1000 (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 um caudal de 1 mL / min. Foram recolhidas fracções de 2 mL e testadas após liofilização quanto à sua potência inibidora da actividade de ectopeptidase humana (LNCaP).

A qualidade e a recuperação da extracção e das sucessivas cromatografias foram estimadas utilizando um padrão interno (o péptido tritiado: 3H-YQRFSSR) 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 em 75-84%. A cromatografia de HPLC de troca catiónica da 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, os quais foram eluídos no perfil de gradiente de acetato de amónio do primeiro passo (10-500 mM) aos 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 inversa (RP-HPLC). As fracções activas das HPLC-EC anteriores foram solubilizadas no solvente A [0,1 % de TFA em H<sub>2</sub>O] e injectadas numa coluna Synergi Max-RP (Phenomenex). Os componentes da amostra foram eluídos (1 mL/min) com um gradiente linear de 1-99 % de solvente B [acetonitrilo-TFA, 100-0,1, em vol.]. Foram recolhidas fracções de 1 mL e analisadas após liofilização quanto à sua potência inibidora da actividade de ectopeptidase humana da superfície celular (LNCaP). A recuperação do marcador interno foi avaliada em 61 %. O fraccionamento por RP-HPLC (Figura 3) das formas moleculares activas isoladas das fracções 13-14 (26-28 min. de tempo de retenção) da HPLC-EC anterior, mostrou a presença de duas populações moleculares principais que inibem 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 nova coluna synergi Max-RP-HPLC através de eluição com um gradiente linear de 1-99 % de solvente B [100% de metanol-0,1 % de TFA]. Os eluatos da coluna foram recolhidos em tubos microsorb em intervalos de 1 min. e as fracções foram testadas após liofilização quanto à sua actividade inibidora de NEP. Como se mostra na figura 4, foram assim isoladas duas formas moleculares principais, as quais inibiram a endoproteólise da substância P por ectopeptidases humanas, com tempos de retenção de 20-21 e 29-30 min respectivamente, e foram determinadas as suas sequências de aminoácidos.

- Ciphergen ProteinChip e análises das 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 Microséquencage des Protéines, Institut Pasteur). A forma molecular que elui da RP-HPLC final ao tempo de retenção 18 min. (fracção 20) correspondeu a 690 e 769,5 Da de molecular massa e à seguinte sequência de cinco resíduos de aminoácidos: QRFSR. Aquela que eluiu ao tempo de retenção 26 min. (fracção 28) correspondeu a dois componentes moleculares de 622-666 Da e 6.495 Da, respectivamente; a determinação de aminoácidos da

massa molecular mais elevada indicou que corresponde a uma Sequência Polipeptídica Rica em Prolina Básica salivar, a PRP-E humana com uma sequência de 61 aminoácidos (Isemura *et al.*, 1982).

Por analogia com a sialorfina salivar de rato, estes dados proporcionam evidência directa para a existência de um análogo de sialorfina salivar humano, um pentapéptido QRFSR de estrutura e função estreitamente relacionadas com as do pentapéptido QHNPR de rato e que é segregado nas secreções salivares humanas; aqueles apoiam que o QRFSR é o produto maduro processado proteoliticamente a partir de uma proteína precursora de uma maneira semelhante à via de maturação de SMR1 e de precursores de hormonas peptídicas. Além disso, como para o péptido QHNPR de rato, o péptido QRFSR segregado parece acumular-se nas secreções salivares humanas sob formas diferentes, entre as quais as formas livres incluindo provavelmente uma forma de sal de acetato e as formas complexas que envolvem interacções hidrófobas elevadas com a PRP-E salivar.

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

O péptido QRFSR foi sintetizado e analisado quanto à sua capacidade para inibir a degradação do substrato fisiológico da NEP, a substância P, *in vitro*, no modelo experimental de incubação estática de membranas celulares de LNCaP humanas. O péptido QRFSR, inibiu a endoproteólise extracelular da substância P mediada pela

NEP humana expressa na superfície de células epiteliais da próstata humana. A concentração eficaz para o QRFSR variou desde 1 a 25  $\mu\text{M}$ , e encontrando-se metade do máximo (IC50) a 11  $\mu\text{M}$  (Figura 5). Surpreendentemente, mas de uma forma redundante em relação ao que foi observado com a sialorfina de rato para a NEP humana, a eficiência inibidora do péptido QRFSR humano para a actividade de NEP renal de rato é pelo menos 10 vezes inferior àquela obtida para a NEP da superfície de células humanas (LNCaP). Surpreendentemente, o derivado do péptido YQRFSR, que foi sintetizado por marcação com trítio e conjugação imunogénica para o desenvolvimento de anticorpos e do sistema de detecção de imunoensaio, pareceu exibir uma eficácia inibidora relativamente semelhante para as actividades da ectoendopeptidase humana e de rato (Figuras 6 e 7).

Quadro: potência inibidora de péptidos humanos e de rato naturais e derivados para as actividades das ectoendopeptidases humana e de rato:

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

Além do mais, o péptido QRGPR (20 - 90  $\mu$ M) que podia ser potencialmente maturado a partir de produtos do gene *hPB*, não tinha qualquer efeito na endoproteólise da substância P induzida pelas membranas de células humanas LNCaP; este resultado leva os inventores a propor que a natureza dos três aminoácidos centrais do pentapéptido inibidor de NEP natural (Q-Nterminal e R-Cterminal comum) é a assinatura determinante para a afinidade e/ou especificidade da sua interação funcional com a ectoendopeptidase NEP. Além disso, apesar da forte analogia da sequência de aminoácidos primária entre a NEP de rato e humana ( $\approx$  85 %), os inventores observaram uma especificidade relativa na interação funcional de ambos os pentapéptidos inibidores naturais, 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 obter conhecimentos sobre o modo de ligação destes inibidores competitivos naturais.

Os inventores utilizaram o péptido 3H-YQRFSR tritiado para estabelecer os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, deste peptidomimético funcional humano da sialorfina de rato *in vivo* em ratos machos adultos (biodistribuição-biodisponibilidade-eliminação) bem como para definir o seu mecanismo de metabolismo e o ciclo *in vivo* e *in vitro*, (Figura 8). As características cromatográficas de RP-HPLC revelaram que:

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

Por conseguinte, o YQRFSS é útil para investigar a actividade analgésica dos produtos de maturação da BPLP em modelos comportamentais de dor aguda em ratos, *e.g.*, o teste de dor por Picadela e o teste de Formalina, que foram estudados para a caracterização funcional da sialorfina *in vivo* (Rougeot *et al.*, 2003).

#### **EXEMPLO 5: Caracterização adicional dos péptidos de QRFSS *in vitro***

A especificidade inibidora do péptido QRFSS foi avaliada medindo a endoproteólise da substância P (SP) num ensaio enzimático *in vitro* utilizando NEP humana solúvel purificada e DPPIV humana (sem o citosol N-terminal e o segmento transmembranar). Utilizando o ensaio de hNEP recombinante selectivo, foi estabelecida a interacção molecular do péptido QRFSS humano com a hNEP, que proporcionou evidência directa que o péptido inibiu a actividade de hNEP: como se mostra na Figura 9, o péptido QRFSS preveniu a endoproteólise da SP mediada pela NEP em 90%; a sua

potência inibidora foi rigorosamente dependente da concentração ( $r^2= 0,99$ ,  $n=18$ ), variou desde 5 a 50  $\mu\text{M}$  e teve metade do máximo a  $29 \pm 1 \mu\text{M}$ . Em contraste, a degradação da SP pela hDPPIV recombinante não foi prevenida por 25 ou 50  $\mu\text{M}$  de péptido QRFSR, o que indica que a potência inibidora do péptido QRFSR nas ectoenzimas da superfície celular catabolizantes de SP *in vitro*, é simplesmente devido à sua interacção específica com a ectopeptidase NEP. Além disso, a partir de estudos de monitorização do metabolismo da SP *in vivo*, parece provável que o péptido QRFSR, como a QHNPR-sialorfina de rato, não protege completamente a SP endógena de dissociação pelas ectopeptidases inactivadoras de SP espinais e, por conseguinte, não potenciaria a nonicepção mediada por SP *in vivo*.

As encefalinas são inactivadas *in vivo* com eficiência acentuada (em poucos segundos) por ambas as ectopeptidases, NEP e APN. Devido ao papel complementar da NEP e APN na inactivação de encefalinas, apenas os inibidores sintéticos de NEP-APN misturados induzem respostas antinociceptivas em vários modelos da dor.

Assim, a especificidade inibidora do péptido QRFSR foi avaliada num ensaio enzimático utilizando preparações de membranas de células humanas HEK recombinantes que expressam selectivamente a NEP ou APN ancorada à membrana humana. Estes modelos de células transfectadas foram desenvolvidos no laboratório. As actividades de amino- e endo-ectopeptidases das membranas de células

humanas foram analisadas *in vitro* medindo a degradação de substratos fluorogénicos específicos artificiais, o substrato de NEP utilizado foi: Mca-R-P-P-G-F-S-A-F-K- (Dnp)-OH (Mca-BK2) e o substrato de APN foi: Ala-pNA. Utilizando o ensaio de hNEP ancorada à membrana selectivo, os inventores determinaram que a inibição pelo péptido QRFSR da endoproteólise da Mca-BK2 pela NEP é dependente da concentração ( $r^2 = 0,88$ ,  $n = 29$  pontos de determinação) e as doses eficazes variaram desde 5 a 50  $\mu\text{M}$ . Utilizando o ensaio de hAPN ancorada à membrana selectivo, os inventores demonstraram que o péptido QRFSR inibe a dissociação da Ala-pNA pema hAPN em doses eficazes de 10 a 90  $\mu\text{M}$  ( $r^2 = 0,93$ ,  $n=22$  pontos de determinação) (ver Figuras 10 e 11).

Quadro 1: Sumário dos efeitos inibidores de QRFSR ( $\text{IC}_{50}$ ) nas actividades das ectoenzimas NEP e APN, *in vitro* e *ex vivo*:

Fontes de enzimas	Substrato	Valores de $\text{IC}_{50}$ do péptido QRFSR
HEK-hNEP	Substância P (60 nM)	14 $\mu\text{M}$
	McaBK2 (5 $\mu\text{M}$ )	33 $\pm$ 6 $\mu\text{M}$
LNCaP	Substância P	11 $\pm$ 3 $\mu\text{M}$
	McaBK2	25 $\pm$ 1 $\mu\text{M}$
hNEP solúvel	Substância P	29 $\pm$ 1 $\mu\text{M}$
HEK-hAPN	Ala-pNA (100 $\mu\text{M}$ )	65 $\pm$ 9 $\mu\text{M}$

Estes resultados indicam que o pentapéptido QRFSR

humano é um inibidor duplo eficaz das actividades das ectopeptidases NEP e APN, *in vitro*. Além disso, devido ao papel complementar da NEP e APN na inactivação de encefalinas e por analogia com a sialorfina de rato que exerce uma poderosa actividade analgésica, a informação biológica e genómica combinada, acumulada levou os inventores a propor que o péptido QRFSR, ao inibir as ectopeptidases NEP-APN de inactivação de encefalinas, potencia os mecanismos antinociceptivos dependentes de encefalina, *in vivo*.

**EXEMPLO 6: Caracterização funcional do péptido QRFSR *in vivo***

Apesar da forte analogia da sequência de aminoácidos primária entre a NEP de rato e humana ( $\approx 85\%$ ), os inventores observaram uma selectividade em relação à espécie na potência inibidora de ambos os pentapéptidos inibidores, respectivamente o QHNPR de rato e QRFSR humano. Surpreendentemente, o derivado do péptido YQRFSR, o qual foi sintetizado por marcação com trítio, pareceu exibir uma eficácia inibidora relativamente semelhante para ambas as ectoendopeptidases humana e de rato (gama de concentrações eficazes entre 5 e 50  $\mu\text{M}$ ). Assim, a potência antinociceptiva do péptido derivado de QRFSR foi investigada no modelo comportamental de dor aguda em ratos, *i.e.*, o teste de formalina, que foi utilizado para a caracterização *in vivo* da acção de sialorfina de rato (Rougeot *et al.*, 2003). A administração sistémica de 0,5 e 1 mg/kg de péptido YQRFSR inibiu a fase inicial (primeiros 20 min após



injecção de formalina) do reflexo de lambar a pata posterior injectada com formalina. Por exemplo, o tempo despendido a lambar a pata por ratos tratados foi significativamente reduzido de  $144 \pm 17$  s,  $n=8$  (veículo) para  $97 \pm 14$  s,  $n=8$  (0,5 mg/kg) ( $p=0,05$ ) e para  $84 \pm 13$  s,  $n=8$  (1 mg/kg) ( $p = 0,02$  pelo teste t de Dunnett). Surpreendentemente, em contraste com os ratos tratados com sialorfina de rato, os ratos tratados com o péptido YQRFSR despenderam significativamente menos tempo a lambar a pata durante a fase tardia (40 a 60 min após a injecção de formalina) do teste de formalina (ratos tratados com veículo:  $63 \pm 13$  s vs. ratos tratados com 1 mg/kg:  $9 \pm 3$  s,  $p = 0,001$ ). Embora menos potente do que a sialorfina de rato, em termos de doses eficazes (100-200  $\mu$ g/kg, *iv*), o péptido derivado de QRFSR parece ser tão eficaz na sua potência supressora da dor (1 mg/kg, *iv*) quanto o inibidor de NEP-APN misturado sintético RB101 (2,5-5 mg/kg, *iv*) no modelo de dor induzida com formalina.

Estes dados (como apresentados nas Figuras 12, 13 e 14) indicam claramente que o péptido YQRFSR inibe a nonicepção induzida por estímulos químicos agudos e de acção prolongada.

A sua potência analgésica é quase tão eficaz quanto uma dose de 3 mg/kg de morfina.

Além disso, a analgesia induzida pelo péptido derivado de QRFSR no comportamento da dor evocada por

substância química é totalmente revertida na presença de um antagonista do receptor opióide, a nalaxona, o que é coerente com um envolvimento das vias opioidérgicas endógenas no seu efeito analgésico.

### 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 proline-rich protein P-B. *J Biochem (Tokyo)*. 121(6), 1025-1030.

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

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 Phosphonomidon, *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 and 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 precursor-like protein in the submaxillary gland of male rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 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 USA*. 100(14), 8549-8554.
- Rougeot, C., Rosinski-Chupin, I., Njamkepo, E., Rougeon, F., 1994. Selective processing of submandibular rat 1 protein at dibasic cleavage sites. Salivary and bloodstream secretion products. *Eur J Biochem*. 219(3), 765-773.
- Rougeot, C., Vienet, R., Cardona, A., Le Doledec, L., Grognet, J. M., Rougeon, F., 1997. Targets for SMR1-pentapeptide suggest a link between the circulating peptide and mineral transport. *Am J Physiol*. 273(4 Pt 2), R1309-1320.
- 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



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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 201

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 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

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

<400> 5

Cys Gln Arg Phe Ser Arg  
 1 5

Lisboa, 24 de fevereiro de 2015

**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:

(i) o péptido ou derivado peptídico exibe uma propriedade moduladora, especialmente uma propriedade inibidora contra uma metalo-ectopeptidase;

(ii) o péptido ou derivado peptídico tem no máximo 15 aminoácidos de comprimento;

(iii) o péptido compreende a sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, em que:

- X1 representa átomo de H ou um aminoácido Tyr ou um aminoácido Cys,

- X2 representa Gln ou Glp quando X1 é H, ou X2 representa Gln quando X1 é Tyr ou Cys,

em que a referida sequência X1-X2-Arg-Phe-Ser-arg é a parte C-terminal do referido péptido; e

(iv) o derivado peptídico deriva do referido péptido por uma a duas substituições de aminoácidos.

2. Péptido da reivindicação 1, em que a referida metalo-ectopeptidase é NEP ou APN.



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

4. Péptido da reivindicação 1, em que o referido péptido compreende a sequência QRFSR, YQRFSR ou CQRFSR.

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

6. Péptido da reivindicação 4, que consiste na sequência YQRFSR.

7. Péptido da reivindicação 4, que consiste na sequência CQRFSR.

8. Péptido da reivindicação 3, que consiste na sequência Glp-Arg-Phe-Ser-Arg.

9. Ácido nucleico que codifica o péptido de qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

10. Vector para clonagem e/ou expressão, vector esse que compreende o ácido nucleico da reivindicação 9.

11. Célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico da reivindicação 9 ou o vector da reivindicação 8.

12. Anticorpo que reconhece especificamente o péptido de qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

13. Composição farmacêutica compreendendo o péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 ou um seu mimético, em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

14. Composição farmacêutica, compreendendo um polímero do péptido de acordo com as reivindicações 1 a 8, ou um seu mimético, em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13 ou 14, em que o referido mimético é obtido (i) por 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) por protecção de uma ou mais da extremidade N-terminal, da extremidade C-terminal ou de uma ou mais cadeias laterais por um grupo de protecção, (iv) por introdução de ligações duplas e/ou ciclização e/ou estereoespecificidade na cadeia de aminoácidos para aumentar a rigidez e/ou afinidade de ligação, (v) por meio de desenvolvimento de concepção de fármacos assistido por computador, (vi) por protecção dos grupos hidrófilos  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  por esterificação ( $\text{COOH}$ ) com álcoois lipófilos ou por amidação ( $\text{COOH}$ ) e/ou por acetilação ou adição de cadeia hidrófoba de carboxialquilo ou aromática na extremidade  $\text{NH}_2$ , (vii) por retroinversão isomérica das ligações amida  $\text{CO-NH}$  ou metilação das funções amida, ou (viii) pela substituição de L-aminoácidos por D-aminoácidos.

16. Composição farmacêutica compreendendo o ácido nucleico da reivindicação 9 ou um vector que expressa o referido ácido nucleico.

17. Composição farmacêutica compreendendo o anticorpo da reivindicação 12.

18. Composição farmacêutica de acordo com as reivindicações 13 a 16, compreendendo ainda um segundo agente farmacêutico que actua sinergicamente com o péptido de BPLP.

19. Péptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou um seu mimético, para ser utilizado na prevenção ou tratamento da dor.

20. Péptido para a utilização de acordo com a reivindicação 19, em que a dor é dor crónica, aguda, inflamatória visceral ou neuropática.

21. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 9, para ser utilizado na prevenção ou tratamento de uma doença como definida na reivindicação 19 ou 20.

22. Método *in vitro* para prognóstico, diagnóstico ou determinação da evolução de uma condição que envolve uma produção alterada de BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 8, método esse que compreende a detecção ou quantificação numa amostra biológica de um indivíduo de teste, de uma proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, e comparação da produção da proteína BPLP ou do referido péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 com a produção do mesmo numa amostra biológica de um indivíduo de controlo.

23. Método da reivindicação 22, em que a detecção da produção de BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 é realizada pondo em contacto uma amostra biológica com um anticorpo como definido na reivindicação 12.

24. Método *in vitro* para o prognóstico ou diagnóstico de uma condição que envolve uma produção alterada de BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, método esse que compreende a detecção numa amostra biológica de um indivíduo de teste, de uma anormalidade quantitativa e/ou qualitativa no gene de BPLP ou no seu transcrito.

25. Método *in vitro* para seleccionar compostos quanto à sua capacidade para ligar-se ao sítio de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto

de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, que compreende os passos de:

- i. incubar um composto candidato com uma célula que expressa a NEP, na presença da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou na presença de qualquer péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos de maturação;
- ii. determinar a capacidade do composto candidato para competir com a proteína BPLP ou um seu produto de maturação, ou com o péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos de maturação, para ligar-se a NEP.

26. Método da reivindicação 25, que compreende os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido que contém sítios de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8;
- b) adicionar o composto candidato a ser testado em competição com uma concentração de semi-saturação da proteína BPLP ou seu produto de maturação marcado, ou do péptido que retém a especificidade de ligação ou a

actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados;

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 ligação específica;

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.

27. Processo para determinar a afinidade de um composto que se liga especificamente ao sítio de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, que compreende os passos de:

a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido que contém sítios de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8;

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 que ocorra ligação específica; 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.

28. Método *in vitro* para seleccionar compostos quanto à sua capacidade para actuar como agonistas ou antagonistas da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 na actividade de NEP, método esse que compreende os passos de:

- a) incubar um composto candidato com uma célula que expressa a NEP, na presença de (i) a proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou qualquer péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados, 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 indicativa de uma actividade antagonista; enquanto uma endoproteólise diminuída na presença do composto candidato, em comparação com a endoproteólise na ausência do composto candidato, é indicativa de uma actividade agonista.

29. Método da reivindicação 28 para seleccionar um composto que é um agonista da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, que compreende os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido que contém sítios de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8;
- b) incubar 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 de (i) o composto candidato, (ii) uma concentração de semi-saturação da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 ou qualquer péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados e (iii) um substrato de NEP, durante um tempo suficiente para que ocorra a endoproteólise do substrato de NEP sob condições de velocidade inicial;
- c) quantificar a actividade da NEP presente no material biológico do passo a) medindo os níveis de endoproteólise do substrato de NEP, respectivamente na presença ou na ausência do composto candidato e na presença ou na ausência da proteína BPLP ou de um



péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou do péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados.

30. Método da reivindicação 28 para seleccionar um composto que é um antagonista da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, que compreende os passos de:

- a) preparar uma cultura de células ou preparar um espécime de órgão ou uma amostra de tecido que contém sítios de ligação de NEP da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8;
- b) incubar 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 sob condições de velocidade inicial na presença de uma concentração submáxima da proteína BPLP ou de um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 ou qualquer péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados, e um substrato de NEP, na presença do composto candidato, durante um tempo suficiente para que ocorra a endoproteólise do

substrato de NEP sob condições de velocidade inicial;

c) quantificar a actividade da NEP presente no material biológico do passo a) medindo os níveis de endoproteólise do substrato de NEP, respectivamente na presença ou na ausência do composto candidato e na presença ou na ausência da proteína BPLP ou um péptido que é um produto de maturação da BPLP de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 ou do péptido que retém a especificidade de ligação ou a actividade fisiológica da proteína BPLP ou dos seus produtos maturados.

Lisboa, 24 de fevereiro de 2015

Radioatividade,  
cpm/100  $\mu$ l

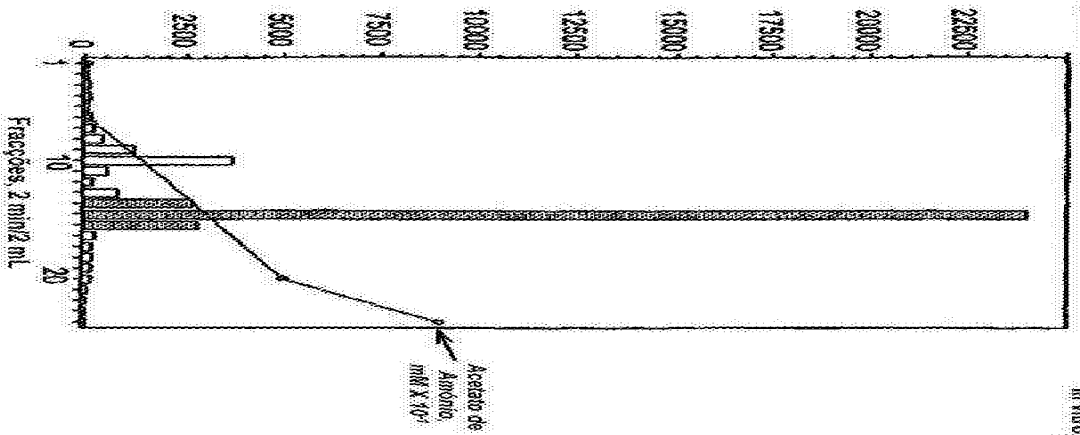


FIG.1

Inibição da degradação da substância P  
pelas membranas de células humanas,  
in vitro, %

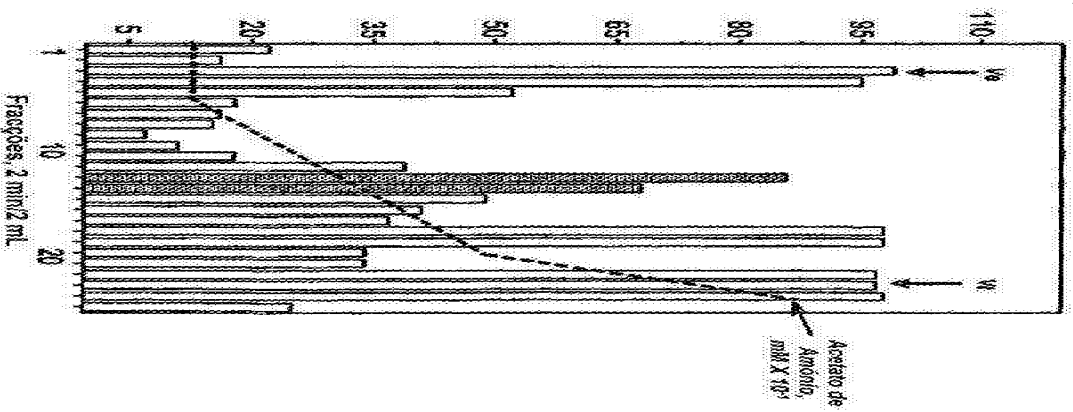
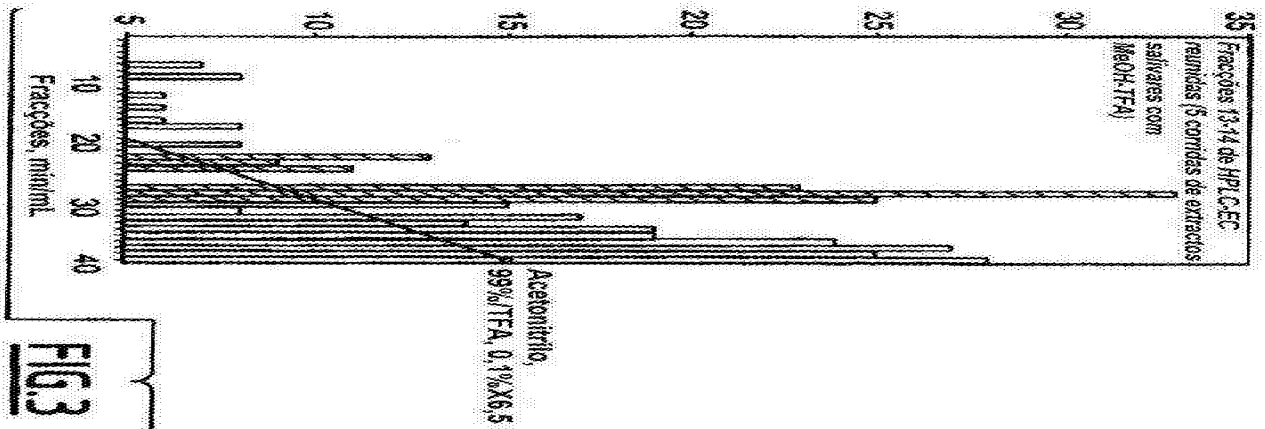


FIG.2

Inibição da endoproteólise da substância P, %



Inibição da endoproteólise da substância P, %

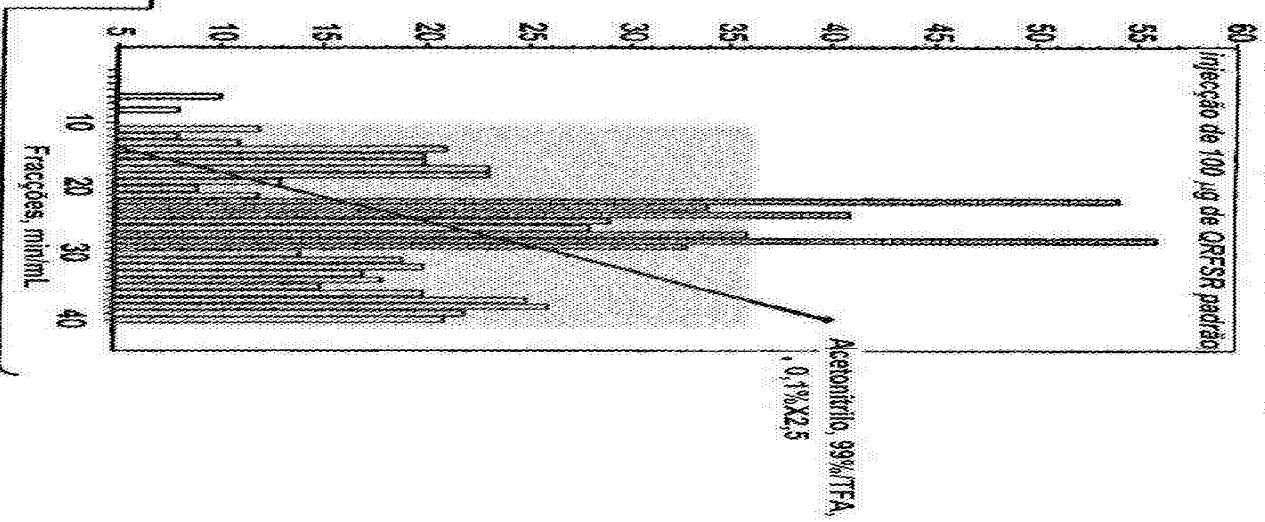
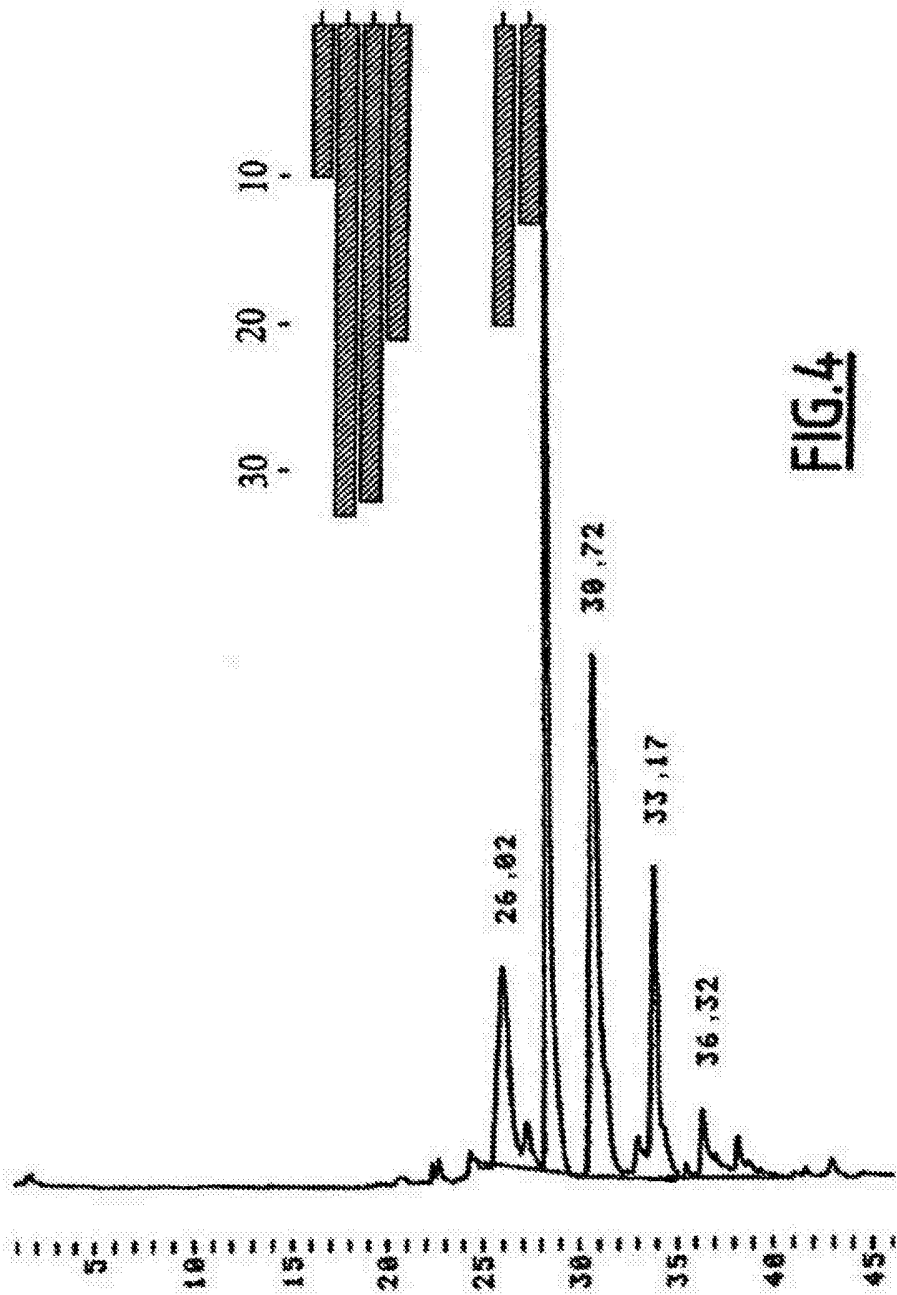
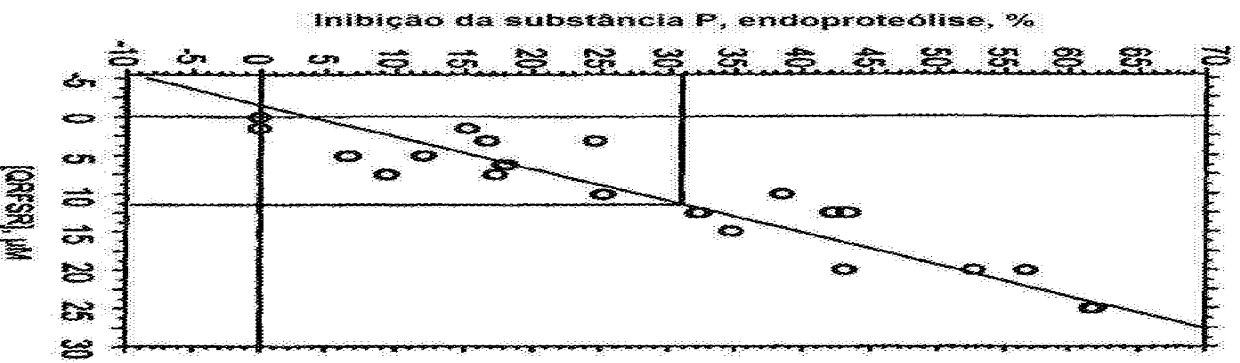


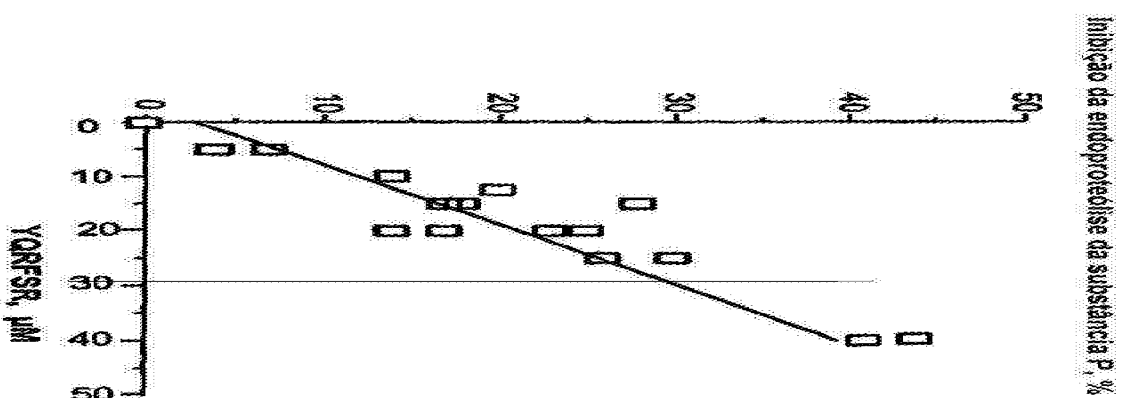
FIG.3



**FIG.4**

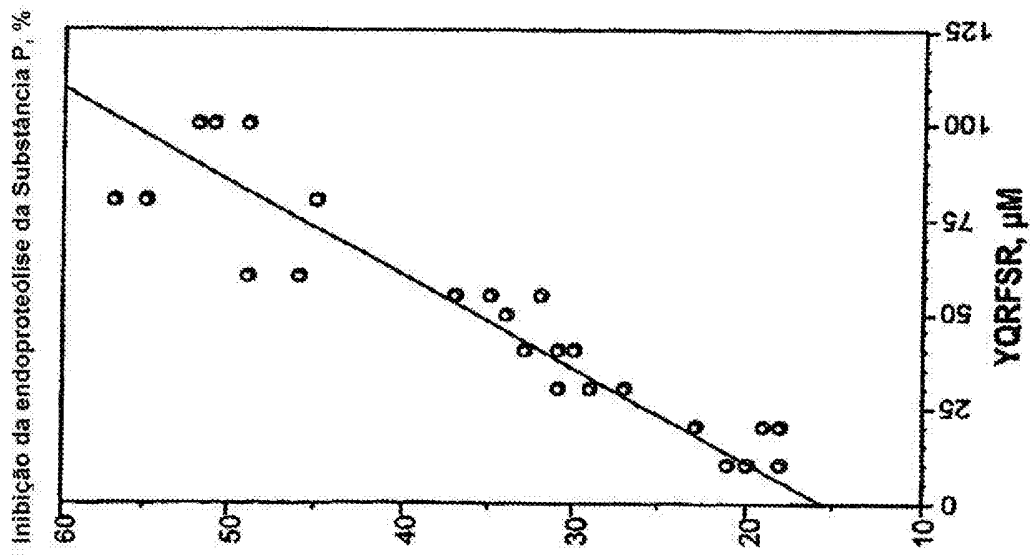


**FIG.5**

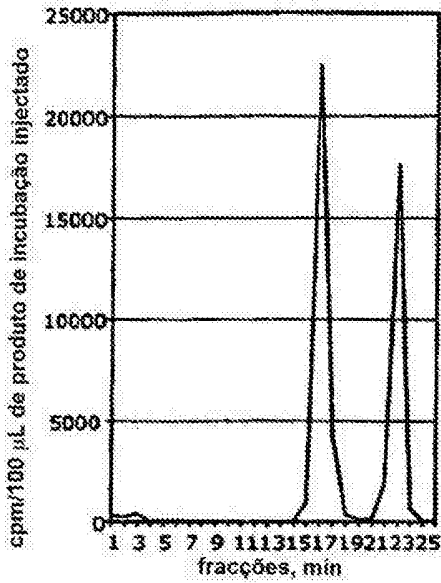


**FIG.6**

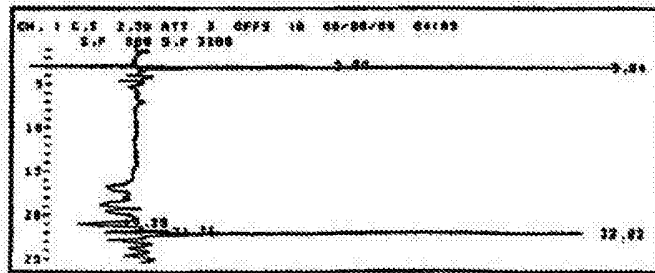
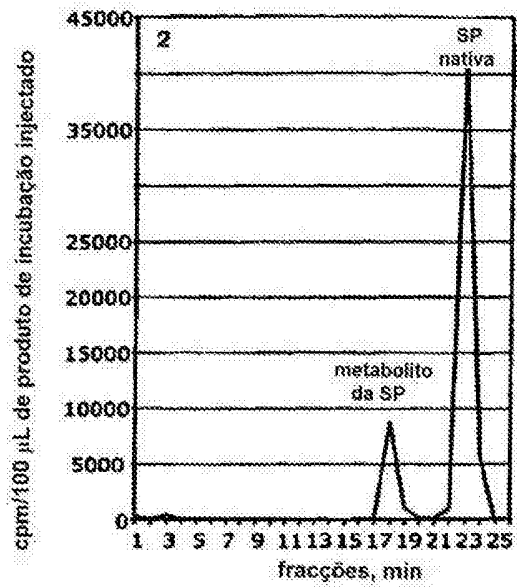
**FIG. 7**



Endoproteólise da substância P (100 nM)  
pelas membranas de células humanas LNCaP  
(17 µg de prot.)

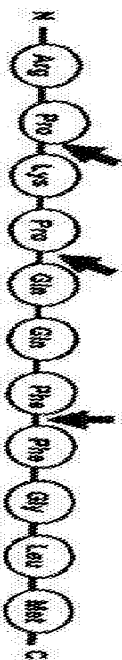


Endoproteólise da substância P (100 nM)  
pelas membranas de células humanas (17 µg de prot.)  
na presença de YQRFSR (175 µM)



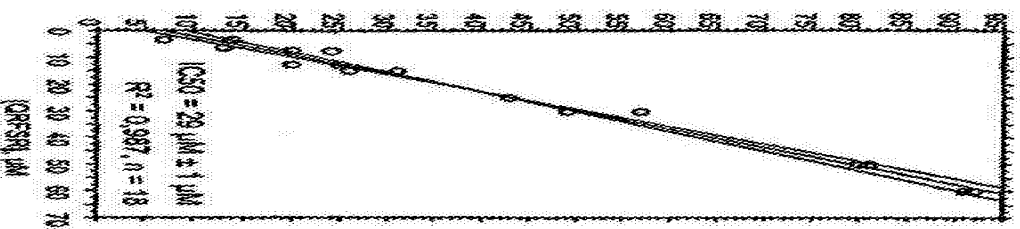
**FIG.8**



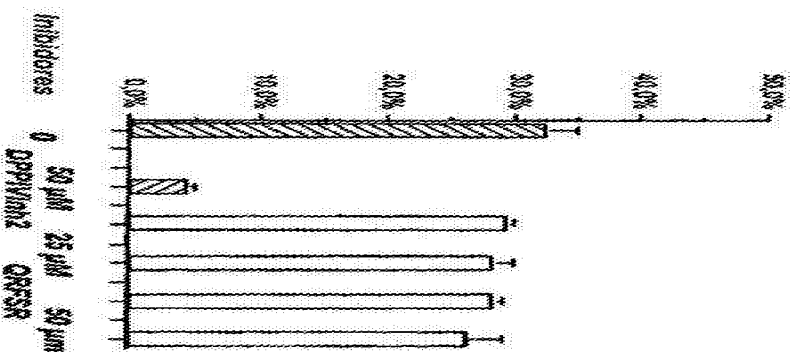


Catabolismo da substância P (SP) Site de dissociação pela NEP Site de dissociação pela DPPIV

Hidrólise de SP por 100 ng de NEP, %

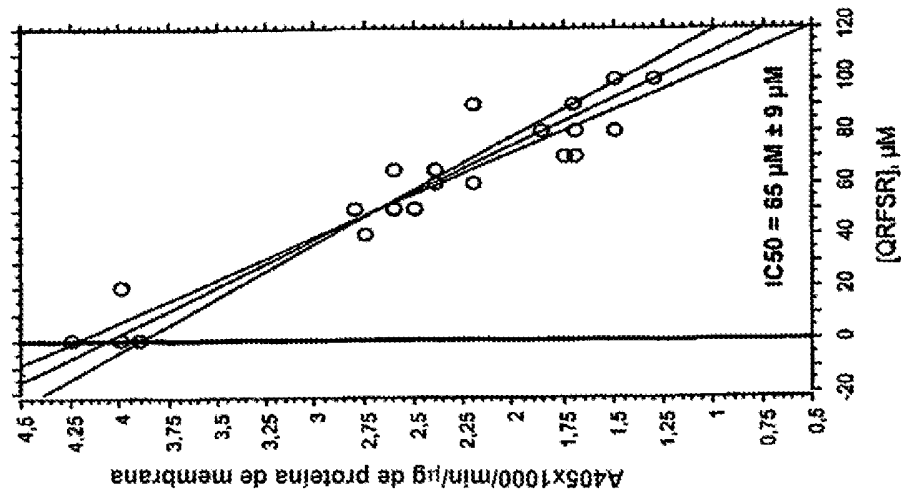


Hidrólise de SP por 100 ng de DPPIV solúvel, %



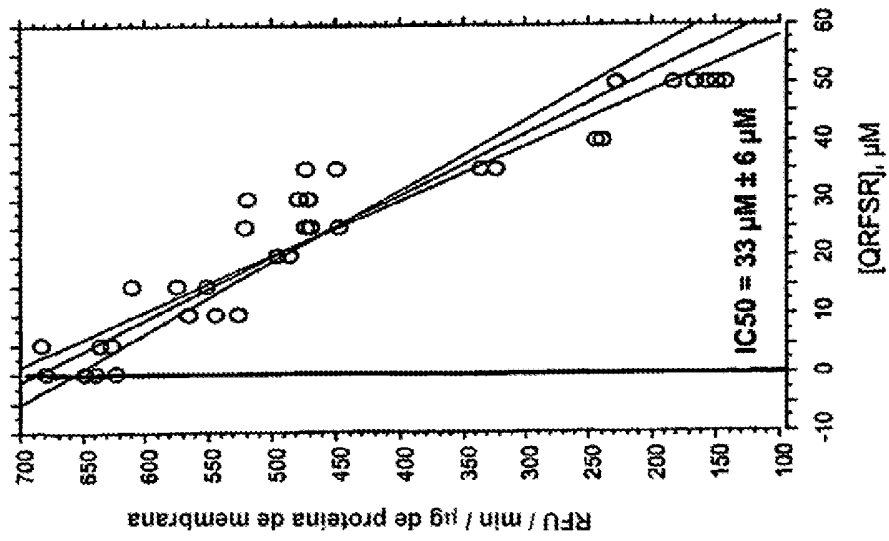
**FIG. 9**

**FIG.10**



A405x1000/min/µg de proteína de membrana = 4,066 · [QRFSR], µM; R<sup>2</sup> = 0,926, n = 22

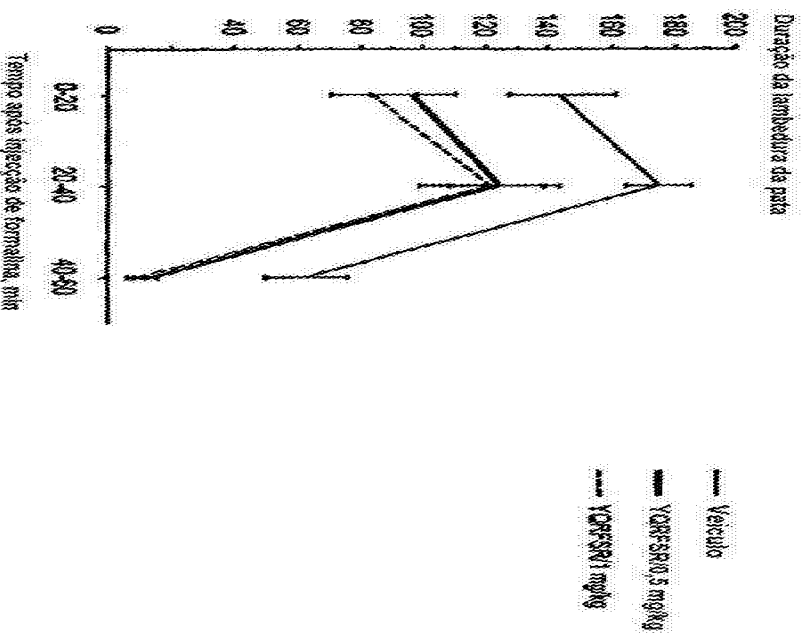
**FIG.11**



RFU / min / µg de proteína de membrana = 686,972 - 9,404 \* [QRFSR], µM; R<sup>2</sup> = 0,884, n = 29

Comportamento de dor: Duração da lambedura da pata	Veículo (n = 8)	0,5 mg/kg IV, (n = 8)	1 mg/kg IV, (n = 8)
durante a fase de 0-20 min do teste de formalina			
F(2,21) = 4,42; p = 0,025	144,13 ± 17,42	97,13 ± 13,70* t = 2,12; p = 0,052	84,25 ± 13,53* t = 2,71; p = 0,017
fase 20-40 min			
F(2,21) = 3,36; p = 0,054	175,13 ± 10,45	124,50 ± 15,04* t = 2,82; p = 0,014	121,13 ± 22,28* t = 2,20; p = 0,045
fase 40-60 min			
F(2,21) = 15,37; p = 0,0001	63,00 ± 12,65	12,13 ± 3,44* t = 3,88; p = 0,002	8,75 ± 2,89* t = 4,18; p = 0,001

(\*) teste t de Dunnett vs veículo



Comportamento de dor: Número de espasmos	Veículo (n = 8)	0,5 mg/kg (n = 8)	1 mg/kg (n = 8)
durante a fase de 0-20 min do teste de formilina $F(2,21) = 1,07$ ; $p = 0,361$	$23,75 \pm 5,15$	$33,13 \pm 11,25$	$18,13 \pm 2,77$
fase de 20-40 min. $F(2,21) = 4,39$ ; $p = 0,028$	$81,50 \pm 18,87$	$79,75 \pm 9,59$	$36,13 \pm 8,67^*$ $t = 2,54$ ; $p = 0,023$
fase de 40-60 min. $F(2,21) = 8,29$ ; $p = 0,002$	$129,38 \pm 13,69$	$103,75 \pm 13,86$	$60,88 \pm 4,67^*$ $t = 4,54$ ; $p = 0,005$

(\*) teste t de Dunnett vs veículo

Número de espasmos

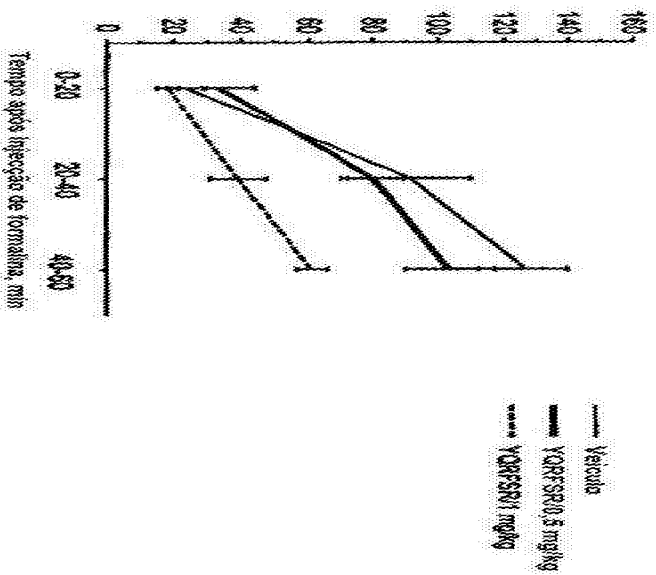
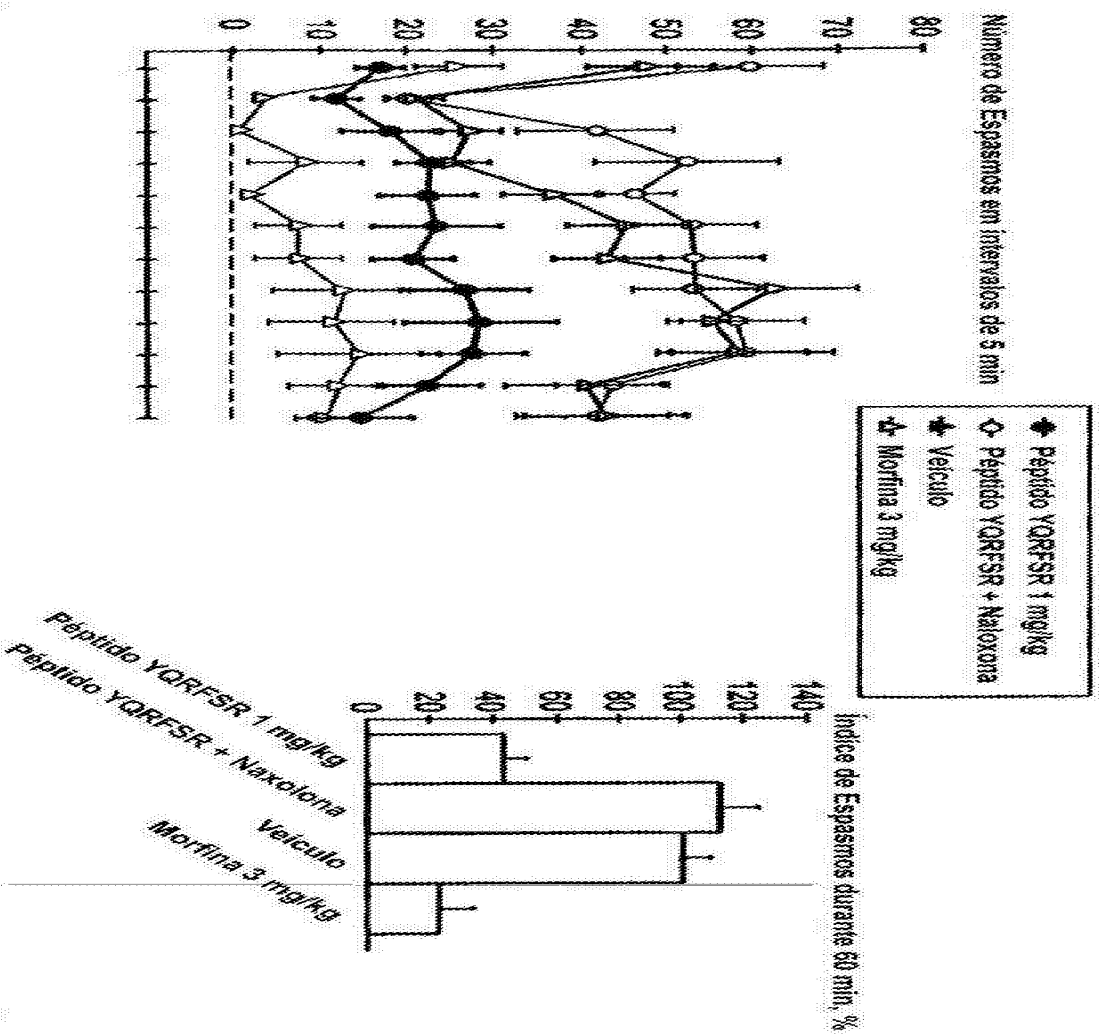


FIG. 13



**FIG. 14**

08/04/2005

## 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 0100221 A
- WO 9837100 A
- EP 1216707 A
- EP 1343519 A, Rougeot
- 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, 1035-1038, 1570-1580
- BEAUMONT et al. *zinc metallopeptidases in health and disease*, 1996, 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*, 1997, vol. 121 (6), 1025-1030
- ISEMURA, S. Nucleotide sequence of gene PBII encoding salivary proline-rich protein P-B. *J Biochem*, 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*, 1982, vol. 91 (8), 2067-2075
- JONES E. et al. Drug discovery technology. Start-up shourcase and structure-based drug design. *Drugs*, September 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 HCMY proteases*
- 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*, vol. 350, 178-180
- OEFNER C. et al. Structure of human Neutral Endopeptidase (Neprilysin) complexed with Phosphonamidon. *J. Mol. Biol.*, vol. 296, 341-349
- 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. *Spinger Handbook Exp. Pharm.* 140, vol. 99, 155-188
- ROQUES et al. *Pharmacological Reviews*, 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 USA.*, vol. 85 (22), 8553-8557
- ROUGEOT, C. ; MESSAOUDI, M. ; HERMITTE, V. ; RIGAULT, A. G. ; BLISNICK, T. ; DUGAVE, C. ; DESOR, D. ; ROUGEON, F. Stalorphin, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* vol. 100 (14), 8549-8554
- ROUGEOT, C. ; ROSINSKI-CHUPIN, I. ; NJAMKEPO, E. ; ROUGEON, F. Selective processing of submandibular rat 1 protein at dibasic cleavage sites. Salivary and bloodstream secretion products. *Eur J Biochem.*, 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.*, vol. 273, R1309-1320
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- SEEBACH et al. *Helv. Chim. Acta*, 1986, vol. 79, 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