

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intellectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
29 de Enero de 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/009620 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
C07K 14/215, A61K 38/16, A61P 9/10

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2003/000364

(22) Fecha de presentación internacional:
15 de Julio de 2003 (15.07.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200201664 16 de Julio de 2002 (16.07.2002) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/Serrano, 117, 28006 MADRID (ES). **UNIVERSIDAD DE VALENCIA** [ES/ES]; Avda. Blasco Ibañez, 13, 46010 VALENCIA (ES). **UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ** [ES/ES]; Avda. del Ferrocarril S/N, 03202 ELCHE (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **TORRE-BLANCA CALVO, Marina** [ES/ES]; UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ, Avda. del Ferrocarril S/N, 03202 ELCHE (ES). **LEQUERICA LLOPIS, Juan, Luis** [ES/ES]; INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

c/Jaime Roig, 11, 46010 VALENCIA (ES). **O'CONNOR BLASCO, Enrique** [ES/ES]; UNIVERSIDAD DE VALENCIA, Avda. Blasco Ibañez, 13, 46010 VALENCIA (ES). **MESEGUER SORIA, Inmaculada** [ES/ES]; UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ, Avda. del Ferrocarril S/N, 03202 ELCHE (ES). **DOLZ IZQUIERDO, María, del Carmen** [ES/ES]; INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, c/Jaime Roig, 11, 46010 VALENCIA (ES). **SUCH BELENGUER, Luis** [ES/ES]; UNIVERSIDAD DE VALENCIA, Avda. Blasco Ibañez, 13, 46010 VALENCIA (ES). **SANCHEZ ANGULO, Manuel** [ES/ES]; UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ, Avda. del Ferrocarril S/N, 03202 ELCHE (ES). **ALBEROLA AGUILAR, Antonio** [ES/ES]; UNIVERSIDAD DE VALENCIA, Avda. Blasco Ibañez, 13, 46010 VALENCIA (ES).

(74) Mandatario: **REPRESA SÁNCHEZ, Domingo**; CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, OFICINA DE TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA, C/Serrano, 113, 28006 MADRID (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: NOVEL Na⁺/H⁺ EXCHANGER INHIBITOR PEPTIDE (PINHE) AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Título: NUEVO PEPTIDO INHIBIDOR DEL INTERCAMBIADOR Na⁺/H⁺ (PINHE), Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to a peptide (PINHE) comprising 28 amino acids, which is obtained by fractionation and purification of the supernatant of the culture of *Haloferax gibbonsii alicante SPH7*. PINHE acts as a natural physiological inhibitor of the Na⁺/H⁺ exchanger in eukaryotes. Moreover, PINHE is active in wide ranges of saline concentrations, temperature and pH as well as being trypsin resistant and pronase sensitive. Owing to the reversible action of said peptide on the Na⁺/H⁺ exchanger, it can be used (1) for the treatment or prophylaxis of pathologies such as cardiovascular, renal, cerebral and metabolic diseases, pathological proliferative processes, hyperproduction of hydrochloric acid, etc. and (2) for other diseases or pathologies associated with a post-ischemic reperfusion lesion and ischemia caused by hyperactivity of the NHE, such as ischemias caused by primary or secondary vascular alterations in different tissues, by post-infarction reperfusion, by an organ or tissue transplant, etc. The inventive peptide can also be used as a contraceptive (in male mammals), an antibiotic or an immunoregulatory agent and in plants as a saline stress modulator.

(57) Resumen: La presente invención describe un péptido (PINHE) constituido por 28 aminoácidos obtenido por fraccionamiento y purificación del sobrenadante del cultivo de *Haloferax gibbonsii alicante SPH7*. El PINHE actúa como inhibidor fisiológico natural del intercambiador Na⁺/H⁺ en eucariotas. Es activo en rangos amplios de concentraciones salinas, temperatura y pH, resistente a tripsina y sensible a pronasa. De su acción reversible sobre el intercambiador Na⁺/H⁺ se deriva: (1) su uso para el tratamiento o profilaxis de patologías como enfermedades cardiovasculares, renales, cerebrales, metabólicas, procesos proliferativos patológicos, hiperproducción de ácido clorhídrico, etc., (2) en otras enfermedades o patologías que cursen con isquemia y lesión por reperusión post-isquémica debida a la hiperactividad del NHE como isquemias por alteraciones vasculares primarias o secundarias en diversos tejidos, por reperusión post-infarto, por trasplante de órganos o tejidos, etc. También como contraceptivo (en mamíferos macho), antibiótico o agente inmunorregulador, y en plantas como modulador del estrés salino.

WO 2004/009620 A1



RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional*

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

TITULO**NUEVO PEPTIDO INHIBIDOR DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ (PINHE), Y SUS APLICACIONES****5 SECTOR DE LA TECNICA**

La presente invención se encuadra en varios sectores, siendo el más importante el Farmacéutico donde tendría aplicaciones como tratamiento protector de diversos procesos patológicos de gran trascendencia tales como la patología isquémica y por reperusión (independientemente del mecanismo de producción), arritmias, hipertensión, etc. También podría aplicarse como contraceptivo (en mamíferos macho), como antibiótico y como agente inmunorregulador. En el sector Químico, como reactivo regulador de la actividad del intercambiador de Na^+/H^+ . Y potencialmente en el Agrícola, como modulador frente al estrés salino.

15 ESTADO DE LA TECNICA

El intercambiador sodio-protón (Na^+/H^+) (sodium-proton exchanger ó NHE), es un mecanismo que está presente en las membranas de todos los tipos celulares, tanto procariotas como eucariotas, y cataliza un intercambio electroneutro de H^+ intracelular por Na^+ extracelular (Putney et al. 2002, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**: 527-552; Counillon and Pouyssegur, 2000, *J. Biol. Chem.* **275**: 1-4, Orlowsky and Grinstein, 1997, *J. Biol. Chem.* **272**: 22373-76; Grinstein et al, 1989, *Biochim. Biophys. Acta*, **988**: 73-97,). Se sabe desde hace años que participa a nivel celular en procesos vitales que dependen del intercambio iónico transmembranal tales como homeostasis, pH intracelular, volumen celular, adhesión, determinación de la forma, migración y proliferación (Motaïs et al. 1991. *Biochim Biophys Acta*, **1075** (2) : 169-180; Maidurna et al, 1993, *Br J Cancer*, **67** (2): 297-303; Harguindey y Craoge 1992. *Med Hypotheses*, **39** (3): 229-237; Putney et al. 2002, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**: 527-552).

La familia de los intercambiadores NHE incluye seis isoformas (NHE1-NHE6). La isoforma NHE1, que se localiza en la membrana citoplasmática se expresa ubicuamente y juega un papel central en los procesos reguladores del pH intracelular, volumen celular y homeostasis (Orlowski J, Grinstein S. 1997. *J. Biol. Chem.* **272**: 22373-76; Counillon L, Pouyssegur J. 2000. *J. Biol. Chem.* **275**: 1-4). En contraste, los intercambiadores NHE2, 3, 4 y 5 muestran una distribución tisular limitada y una

función más especializada. Así NHE2, 3 y 4 se expresan predominantemente en el riñón y en el tracto intestinal. En esos lugares, la localización celular de NHE2 es apical, e interviene principalmente en la reabsorción de iones Na^+ (Tse CM, Levine SA *et al.* 1993. *J. Biol. Chem.* **268**: 11917-24). NHE2 puede actuar en colaboración con NHE4 que tiene una localización basolateral (Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**: 9331-39; Pizzonia JH, Biemesderfer D, Abu-Alfa AK *et al.* 1998. *Am J. Physiol.* **275**: F510-17; Bookstein C, Xie Y *et al.* 1997. *Am J. Physiol.* **273**: C1496-505; Bai L, Collins JF, Muller YL, Xu H, Kiela PR, Ghishan FK, . 1999. *Am J. Physiol* **277**: R1112-19) para promover la osmoregulación de las células medulares internas renales. El intercambiador NHE3 se ha identificado en la membrana apical del epitelio del túbulo renal proximal (Biemesderfer D, Pizzonia J, *et al.* 1993. *Am J. Physiol.* **265**: F736-42) y en las microvellosidades del epitelio intestinal maduro (Hoogerwerf WA, Tsa SC *et al.* 1996. *Am J. Physiol.* **270**: G29-41; Bookstein C, DePaoli AM, *et al.* 1994. *J. Clin. Investig.* **93**: 106-13). En el riñón, el NHE3 es importante en la reabsorción de Na^+ y HCO_3^- , contribuyendo significativamente al mantenimiento de la osmolaridad sanguínea y el balance ácido-base (Moe OW. 1999. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: 2412-25). El intercambiador NHE5 se expresa predominantemente en el cerebro (Klanke CA, Su YR *et al.* 1995. *Genomics* **25**: 615-22; Baird NR, Orlowski J *et al.* 1999. *J. Biol. Chem.* **274**: 4377-82) y se piensa que regula el pH intracelular en neuronas (Raley-Susman KM, Cragoe EJ, Saplosky RM, Kopito RR. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**: 2739-45). NHE6 es el miembro más reciente de la familia NHE. Esta molécula presenta la secuencia más divergente mostrando únicamente un 20 % de identidad con las otras isoformas. NHE6 se localiza exclusivamente en las mitocondrias, dándose la mayor expresión en los tejidos y órganos que presentan un metabolismo elevado, como son el corazón, cerebro y el músculo esquelético (Numata M, Petrecca K, Lake N, Orloski J. 1998. *J. Biol. Chem.* **273**: 6951-59).

La familia de genes NHE se ha conservado evolutivamente. Se han identificado genes que codifican para NHEs en toda clase de organismos vivos. En organismos procariotas desde arqueas como *Halobacterium salinarum* (Ng WV, Kennedy SP, *et al.* 2000. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **97**: 12176-181) a las bacterias como *Streptococcus faecalis* (Harold FM, Papineau D. 1972. *J. Membr. Biol.* **8**: 45-62) y *Escherichia coli*

- (genes *nhaA* y *nhaB*. Padan E, Maisler N, Taglicht D, Karpel R, Schuldiner S. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**: 20297-302), donde estos intercambiadores son electrogénicos y muestran muy poca homología con los NHE de organismos superiores. También se han identificado genes NHE en plantas, en concreto un homólogo de NHE5 en *Arabidopsis thaliana* (Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. 1999. *Science*. **285**: 1256-58) y en las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* (gen *sod2*, Jia ZP, McCulloch N, Martel R, Hemingsen S, Young PG, 1992. *EMBO J.* **11**: 1631-40) y *Saccharomyces cerevisiae* (genes *nhx1*, *nha2*, Nass R, Cunningham KW, Rao R. 1997. *J. Biol. Chem.* **272**: 26145-52; Numata M, Petrecca K, Lake N, Orloski J. 1998. *J. Biol. Chem.* **273**: 6951-59). El producto del gen *nhx1*, la proteína Nhx1p, se localiza predominantemente en un compartimento prevacuolar y es importante en el proceso de tráfico endocítico (Bowers K, Levi BP, Patel FI, Stevens TH. 2000. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 4277-94). También se han identificado genes de la familia NHE en *Caenorhabditis elegans* (Marra MA, Prasad SS, Baillie DL. 1993. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 289-98) y en *Drosophila melanogaster* (Adams MD, Cleniker SE et al. 2000. *Science* **287**: 2185-95), aunque no se han identificado las isoformas específicas ni se han caracterizado sus funciones. Finalmente, se han identificado genes NHE en un número de organismos superiores tales como diversos vertebrados incluyendo a los humanos (Klanke CA, Su YR et al. 1995. *Genomics* **25**: 615-22; y 24), rata (Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**: 9331-39; Collins JF, Honda T, et al. 1993. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**: 3938-42), ratón (Praetorius J, Andreasen D, Jensen BL, Ainsworth MA, Friis UG, Johansen T. 2000. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **278**: G197-206), cerdo (Reilly RF, Hildebrandt F, et al. 1991. *Am J. Physiol.* **261**: F1088-94), *Xenopus laevis* (Busch S, Rosskopf D, Lang H-J, Weichert A, Siffert W. 1998. *Pflugers Arch-Eur. J. Physiol.* **436**: 828-33), y en trucha (Borgese F, Sardet C, Cappadoro M, Pouyssegur J., Motays R. 1992. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* **89**: 6765-69).

Recientemente, se ha determinado que el NHE también funciona como un anclaje de membrana para el citoesqueleto a través de actina y que esta función es independiente de la translocación de iones (Putney et al. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**: 527-552, 2002). Este carácter del NHE junto con los efectos sobre la regulación del pH intracelular, la homeostasis y el volumen celular, indican que el NHE regula un gran número de actividades celulares que incluyen adhesión, determinación

de la forma, migración y proliferación. La actividad normal del NHE es por tanto de importancia vital para la célula (Pouyssegur et al. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 4833-37; Kapus et al, 1994 *J. Biol. Chem.* **269**: 23544-52; Delvaux et al 1990, *Am. J. Physiol.* **259**: G842-49. Horvat et al. 1992, *Eur. J. Cancer* **29^a**: 132-37; Ritter et al, 5 1998. *Br. J. Pharmacol.* **124**: 627-38).

Sin embargo, hay situaciones en las que existe un proceso anormal de hiperactividad del NHE que conducen a un proceso patológico. Desde el punto de vista tisular el NHE está implicado en diversos procesos fisiológicos y patológicos de vital importancia como la isquemia y por reperfusión, la diuresis, la hipertensión arterial, la 10 división de las células tumorales, la acidez gástrica, el transporte epitelial, la activación de los macrófagos, etc (Rodríguez-Soriano 2000, *Pediatr. Nephrol.*, **14**: 1121-36; Sastrasinh et al 1995, *Am. J. Physiol.* **268**: C1227-34; Szabó et al, 2000 *J. Biol. Chem.* **275**: 6302-7; Cournillon et al, 1993, *Mol. Pharmacol.* **44**: 1041-45; Scholz et al, 1995, *Cardiovasc. Res.* **29**: 260-68; Scholz et al. 1999, *J. Thromb. Thrombolysis*, **8**: 61-70,. 15 Rolfe et al. 1992. *Am J Respir. Cell. Mol. Biol.* **6** (6): 576-582) han señalado que el NHE participa en la liberación de citokinas por parte de los macrófagos que tiene lugar en los procesos de activación inmunitaria. Asimismo, la actividad del NHE está aumentada en la hipertensión esencial en el humano y en los modelos animales de hipertensión (Canessa et al, 1991, *Hypertension*. **17** (3): 340-348; Roskopf et al. 1993. 20 *Hypertension*, **21** (5): 607-617). En patologías asociadas a la colesterolemia se describe un incremento de actividad del intercambiador NHE o un aumento del número de ellos en las células (Scholz W.; Albus U.; Linz W.; Schölkens B.A. 1991. Effect of Na⁺/H⁺ exchance inhibition in cardiac ischaemia. *Eur Herat J.* **12** (Suppl.), 124 (Abstr.)). La asociación frecuente diabetes-hipertensión tendría como mecanismo común el aumento 25 de la actividad de dicho intercambiador. La inhibición del intercambiador puede mejorar la resistencia a la insulina (Dudeya et al. 1992 *Kidney Int.* **42** (5): 1184-1190; Dudeja PK et al. 1991 *J. Clin. Invest.* **87** (5): 1755-1762; Dusing et al. 1993 *Clin. Invest.* **71** (2): 119-125). Por último, el NHE participaría en los procesos de reperfusión tras un periodo de isquemia. Durante la reperfusión del miocardio se produce un gradiente de 30 H⁺ debido al aumento de pH extracelular frente al intracelular por efecto de lavado. Como consecuencia, se produce una acumulación de Na⁺ intracelular, que fuerza al intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺ a operar en sentido inverso, y se produce un aumento del Ca⁺⁺

citosólico hasta niveles tóxicos que conducen a la muerte celular. La utilización de un buen bloqueador del intercambiador Na^+/H^+ puede mejorar dicho cuadro.

El tratamiento de todos estos procesos patológicos mencionados anteriormente podría verse mejorado en caso de disponer de un buen inhibidor del NHE.

- 5 En la actualidad no se dispone de inhibidores fisiológicos de origen natural específicos del intercambiador NHE. Los NHE son inhibidos por compuestos sintéticos como el amiloride (Cragoe EJ Jr, Woltersdorf OW Jr, Bicking JB, Kwong SF, Jones JH. 1967 *J Med Chem.* Jan; **10** (1):66-75) y sus análogos como el EIPA (Vigne P, Frelin C, Cragoe EJ Jr, Lazdunski M. 1983 *Biochem Biophys Res Commun.* **14**;116(1):86-90) y
- 10 los derivados de la benzoil guanidina como el cariporide (HOE 642) (Scholz, W., Albus, U., Counillon, L., Gögelein, H., Lang, H.J., Linz, W., Weichert, A. y Schölkens 1995 *B.A. Cardiovas. Res.*; **29**: 260-268; Hoechst AG, *Cardiovascular Research* H 821, 65926 Frankfurt/Main, Germany: Scholz, W., Albus, U., Gögelein, H., Lang, H.J., Linz, W., Weichert, A. y Schölkens, B.A.; Centre de Biochimie, Université de Nice – Sophia
- 15 Antipolis, Parc Valrose, Nice, France: L Counillon), el HOE 694 (Counillon, L., Scholz, W., Lang, H.J., Pouyssegur, 1993. *J. Mol Pharmacol.* Nov; **44**(5):1041-5; Scholz, W., Albus, U., Lang, H.J., Linz, W., Martorana, P.A., Englert, H.C. y Schölkens, B.A. 1.993. *Br. J. Pharmacol.* **109**(2): 562-568; Hoechst AG, *Cardiovasc Research* H 821, 65926 Frankfurt/Main, Germany: Scholz, W., Albus, U., Gögelein, H., Lang, H.J., Linz,
- 20 W., Weichert, A. y Schölkens, B.A), *EMD 85131* (Baumgarth, M., Beier, N. y Gericke, R. 1.997. *J. Med. Chem.* **40**: 2017-2034) y otros como el zoniporide (Guzman-Perez, A., Wester, R.T., Allen, M.C., Brown, J.A., Buchholz, A.R., Cook, E.R., Day, W.W., Hamanaka, E.S., Kennedy, S.P., Knight, D.R., Kowalczyk, P.J., Marala, R.B., Mularski, C.J., Novomisle, W.A., Ruggeri, R.B., Tracey, W.R. y Hill, R.J. 2001. *Bioorg Med*
- 25 *Chem Lett.* Mar 26; **11**(6):803-7).

Algunas de estas sustancias como el amiloride, inhiben el intercambiador NHE pero no lo hacen de forma específica, inhibiendo a la vez otros intercambiadores, como el $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ y los canales inespecíficos de Na^+ . A pesar de estas limitaciones el amiloride se está utilizando en terapéutica como diurético. No obstante, es grande el

30 número de sus efectos secundarios. Por otra parte, algunos derivados de amiloride que han mostrado un efecto más específico sobre el intercambiador NHE, salvo alguna excepción, tienen el grave inconveniente de ser difíciles de revertir. Mayor

especificidad han mostrado el cariporide y el zoniporide, siendo éste último además de mayor potencia.

La sensibilidad a todos estos fármacos varía enormemente entre las isoformas del NHE (Yu et al, 1993. *J. Biol. Chem.*, **268**: 25536-41; Cournillon et al, 1993, *Mol. Pharmacol.* **44**: 1041-45; Cournillon et al, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 4508-12; Scholz et al, 1995, *Cardiovasc. Res.* **29**: 260-68; Scholz et al, 1999, *J. Thromb. Thrombolysis*, **8**: 61-70; Baumgarth et al, 1997, *J. Medicinal Chem.* **40**: 2017-34). Las afinidades aparentes de las isoformas de la membrana plasmática por un inhibidor puede variar en un rango de cuatro ordenes de magnitud, generalmente siguiendo el orden: NHE1 > NHE 2 >> NHE 3 > NHE 4 (Putney et al, 2002, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**: 527-552). En contraste, el NHE mitocondrial es relativamente insensible al amiloride, pero es inhibido muy efectivamente por su análogo benzamil (Sastrasinh et al, 1995, *Am. J. Physiol.* **268**: C1227-34; Brierley et al, *Biochemistry*, **28**: 4347-54; Kapus et al, 1988, *Biochim Biophys Acta*, **944**: 383-90).

Otros agentes farmacológicos como la **cimetidina**, **clonidina**, y **harmalina** también exhiben diferentes afinidades por las isoformas del NHE. Sin embargo, estos compuestos, que no están relacionados químicamente con el amiloride o el cariporide, poseen una parte imidazólica o guanidínica que puede explicar alguna similitud estructural (Orlowski and Grinstein. 1997. *J. Biol. Chem.* **272**: 22373-22376,).

Algunos de los inhibidores del NHE han mostrado ser efectivos en la disminución del tamaño de la zona de necrosis en el infarto de miocardio experimental (Gumina et al. 1998 *J. Pharm. Experim. Therapeutics* , **286**: 175-183; Miura et al. 1997. *J. Am. Coll. Cardiol.* **29**: 693-701; Munch-Ellingsen et al. 1998. *Mol. Cell Biochem.* **186**: 13-18; Otani et al. 2000. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**: 387-393).

Algunos de ellos son objeto de patentes internacionales (p.e. WO0183470 "Sodium-hydrogen exchanger type 1 inhibitor", publicada el 8 de Noviembre de 2001, titulares: Chen Weichao George, Cox Eric David, PFIZER PROD INC, Guzmán Perez Angel; Patente US6348476 "Pharmaceutical combination preparation of an inhibitor of the sodium/hydrogen exchanger and a medicament for the treatment of cardiovascular diseases").

Frente a estas sustancias de origen sintético, hasta la fecha, halocina H7 (antes H6), es la única sustancia conocida de origen biológico que muestra un efecto inhibidor

específico del NHE. La halocina H7 es una sustancia proteica que ha sido objeto de dos patentes previas (*inventores: I Meseguer Soria, M Torreblanca Calvo, B Soria Escoms, F Colom Valiente e I Alba Carballo* . N° de patentes: ES 2 094 695 y ES 2 094 696 publicadas ambas el 16 de enero de 1997, titular: Universidad de Alicante). Dicha

5 halocina tiene un peso molecular de 30.500 ± 500 D y se obtiene a partir del cultivo de la cepa CECT 4547 (*protegida en la patente: ES 2 094 695*) y se extrae utilizando procedimientos de purificación de proteínas tales como la cromatografía en columna con concanavalina A y la cromatografía de alta presión con columna de intercambio iónico. El proceso completo de purificación es largo, costoso y complejo.

10 Las ventajas más destacables de la halocina H7 frente al resto de inhibidores del NHE son (como se describen en la patente ES 2 094 696):

- Al ser un producto de naturaleza peptídica tiene reversibilidad de acción terapéutica y la facilidad para metabolizarse propia de las sustancias
- 15 - Es una sustancia natural de tipo antibiótico, su poder microbicida está basado en su acción inhibidora del intercambiador sodio-protón.
- Es un inhibidor específico, activo a concentraciones muy bajas lo que disminuye los efectos secundarios.
- Puede operar en un gran rango de concentraciones de sales, temperatura y
- 20 pH, lo que le convierte en el fármaco de elección en determinados procesos.
- Es resistente a la acción de la tripsina, lo que permite su utilización en el tracto intestinal.
- Al tratarse de un péptido sensible a pronasa su efecto puede terminarse
- 25 cuando se desee.

La importancia de disponer de inhibidores del intercambiador sodio-protón (NHE), reside en las consecuencias que se derivan de la actividad de este mecanismo en diversos procesos patológicos. A excepción de la halocina H7, no se conoce ningún producto natural y/o de naturaleza peptídica capaz de inhibir el NHE. A pesar de que la

30 halocina H7 ya presentaba una serie de ventajas respecto a los inhibidores de tipo sintético, la gran desventaja que podríamos destacar frente a ellos es que el proceso de

obtención y purificación es demasiado largo, complejo y caro, y, además, que al tratarse de una proteína de 30.5 kD, podría inducir respuesta inmunitaria.

El PINHE, objeto de esta patente, además de poseer todas las ventajas mencionadas anteriormente para la halocina H7 respecto al resto de inhibidores del NHE conocidos, presenta nuevas ventajas que permiten asegurar que nos encontramos
5 ante una sustancia de elección y con mayor potencial desde el punto de vista aplicado.

Las principales ventajas que ofrece el PINHE respecto a la halocina H7 son:

- Es un péptido de pequeño tamaño, con un peso molecular 11 veces menor que el de la Halocina H7, lo que podría implicar un menor riesgo de
10 capacidad antigénica.
- Mayor facilidad de manipulación.
- Aunque se obtiene a partir del cultivo del mismo microorganismo, tiene un proceso de purificación mucho más rápido, fácil y económico.

Por lo que respecta a la actividad del PINHE, al igual que la halocina H7, inhibe de
15 forma específica el NHE.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Descripción breve

La presente invención describe un péptido (PINHE), derivado de la halocina H7,
20 de pequeño peso molecular y definido por su secuencia de aminoácidos u otra análoga que actúa como inhibidor fisiológico natural del intercambiador Na^+/H^+ (NHE) en eucariotas. El PINHE se obtiene por fraccionamiento (que incluye una precipitación con acetona en frío) y purificación del sobrenadante del cultivo de la haloarquea *Haloferax gibbonsii alicante SPH7* que lo produce de forma natural o bien, sobre la base de su
25 secuencia de aminoácidos, puede sintetizarse o modificarse y expresarse por técnicas moleculares o de ingeniería genética. El PINHE es estable y activo en rangos amplios de concentraciones salinas, temperatura y pH, resistente a tripsina y sensible a pronasa y también puede ser liofilizado y reconstituido sin pérdida de actividad. El empleo de dicho péptido inhibidor de NHE, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la
30 elaboración de una composición farmacéutica constituye otro objeto adicional de esta invención. De su acción reversible como inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ de eucariotas tanto del péptido como de sus sales se deriva sus usos: (1) para el

tratamiento o profilaxis de patologías en mamíferos, preferente humanos, ocasionados por una hiperactividad o una actividad indeseada del NHE, tales como enfermedades cardiovasculares (p.e. hipertensión, infarto de miocardio, arritmias, angina de pecho, etc.), enfermedades cerebrales (p.e. infarto cerebral, edema cerebral, embolias, etc.), enfermedades renales (p.e. fallo renal), enfermedades metabólicas (p.e. diabetes mellitus, hiperlipidemias, etc.), enfermedades con hiperproducción de ácido clorhídrico de la mucosa gástrica, enfermedades con alteraciones en el transporte epitelial, enfermedades con alteraciones del volumen celular, procesos proliferativos patológicos (p.e. cáncer, tumores, fibrosis, etc.), y alteraciones asociadas a una actividad excesiva de células del sistema inmunitario (p.e. inflamación, hipersensibilidad) y también su uso en (2) otras enfermedades o patologías que cursen con isquemia y lesión por reperfusión post-isquémica debida a la hiperactividad del NHE, entre otros: isquemias por alteraciones vasculares primarias o secundarias en diversos tejidos y órganos anexos, por reperfusión post-infarto, por transplante de órganos o tejidos, por cirugía cardíaca y vascular, por isquemia en situaciones fisiológicas tales como ejercicio físico, embarazo, parto, menstruación, etc., por traumatismos, o cualquier patología que implique hipoperfusión tisular (choque hemorrágico, térmico, neurogénico, etc.) y en cualquier proceso quirúrgico en general. Otros usos, derivados de su actividad, son como contraceptivo (en mamíferos macho), antibiótico o agente inmunorregulador y en otro campo como modulador del estrés salino en plantas.

Descripción detallada

La invención proporciona un péptido de pequeño tamaño inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ , en adelante péptido inhibidor de NHE o PINHE, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

- a) la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO 1 (PINHE) o un fragmento de la misma; y
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia definida en a)

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "NHE" se refiere a las distintas formas de NHE presentes en distintos organismos procariotas o eucariotas.

En el sentido utilizado en esta invención, el término "análoga" pretende incluir a cualquier secuencia de aminoácidos (aás.) que pueda ser aislada o construida en base a

la secuencia de aás. mostrada en la SEQ ID NO 1, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de aás., incluyendo la inserción de uno o más aás., la adición de uno o más aás. en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más aás. en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

5 En general, una secuencia de aás. análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aás. identificada como la SEQ ID NO 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aás. en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de aa., de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

10 El péptido PINHE de la presente invención es sintetizado por un microorganismo halófilo extremo perteneciente al Dominio Archaea también conocidos como haloarqueas. En concreto, el PINHE es producido por la cepa “alicante SPH7” de la haloarquea *Haloferax gibbonsii*, que fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot, Valencia, España, correspondiéndole el número de depósito CECT 4547.

 . La práctica totalidad de las haloarqueas producen sustancias peptídicas con actividad antagónica frente a otros miembros del grupo. Estas sustancias son denominadas genéricamente como halocinas (Rodríguez-Valera F, Juez G, Kushner DJ, 20 1982, *Can. J. Microbiol.* **28**: 151-154) y hasta el momento solo se han estudiado un reducido número de ellas (O'Connor EM, Shand RF. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2002 **28**:23-31). Sólo se conoce la secuencia completa de la halocina H4 (Cheung J, Danna KJ, O'Connor EM, Price LB, Shand RF. 1997 *J. Bacteriol.* **179**: 548-51) y de la halocina S8 (Price LB, Shand RF. 2000. *J. Bacteriol.* **182**: 4951-8). Con relación al 25 mecanismo de acción, únicamente se conoce el de la halocina H7 (antes H6, Meseguer I, Torreblanca M, Konishi T. 1995. *J. Biol. Chem.* **270**: 6450-5) de la que deriva el PINHE objeto de esta invención.

 Dada la amplia actividad antagónica de las haloarqueas y la fragilidad de estos microorganismos ante una inhibición de su intercambiador NHE, este constituye una 30 diana perfecta para un mecanismo de competencia o antagonismo en la lucha por la supervivencia poblacional. Es por tanto más que probable que, entre la amplia gama de

halocinas, puedan encontrarse péptidos homólogos al PINHE que pueden estar o no, de forma natural.

En una realización particular, la molécula de aás. de la invención es una molécula de aás. de la cepa “alicante SPH7” de *Haloferax gibbonsii* de SEQ ID NO 1 (péptido PINHE). El PINHE es un péptido derivado de la halocina H7 que posee toda su actividad, por ello un aspecto importante de la invención es la relación existente entre la halocina H7 y el PINHE, y cómo se llega a obtener éste partiendo de la halocina. En la actualidad no existen más estudios sobre la halocina H7 o el PINHE que los realizados por los inventores y por el momento se desconoce la secuencia peptídica de la halocina H7, de la que únicamente se conoce el extremo amino terminal. También sabemos que las células excretan al medio una sustancia inhibidora del NHE en forma de halocina H7 y que el PINHE, como tal, no se detecta en el medio. Se sabe que el PINHE de algún modo forma parte de la halocina H7, sin embargo, se desconoce si la halocina H7 es un monómero con una secuencia peptídica única que incluye la secuencia del PINHE o si se trata realmente de un dímero formado por dos péptidos, uno pequeño e hidrofóbico responsable de la actividad inhibidora del NHE, y otro de mayor tamaño e hidrofílico que actuaría como medio de transporte para el PINHE. Esta segunda opción sería la mas lógica teniendo en cuenta que el tratamiento para separar el PINHE, con acetona en frío, no es demasiado agresivo como para romper enlaces peptídicos. Cualquiera que sea el caso, la forma de obtención de la halocina o el PINHE tiene una serie de pasos en común (producción, obtención de la solución sin células, clarificación y concentración) hasta obtener un concentrado protéico que contiene la halocina H7 y luego en función del procedimiento de purificación empleado, se obtiene la halocina o el PINHE. El paso clave para la obtención de uno u otro, como ya se ha mencionado, es la precipitación con acetona. La separación del PINHE del resto de la molécula de halocina, requiere que la precipitación con acetona se haga en frío y durante un tiempo más o menos prolongado, preferiblemente varias horas. Sin el tratamiento de la acetona, u otro que permita la separación del PINHE, se puede llegar a purificar la halocina H7 utilizando los procedimientos ya descritos (Torreblanca M, Meseguer I, Rodriguez-Valera F. 1989, J. Gen. Microbiol. **135**: 2655-2661).

El PINHE es un péptido derivado de la halocina H7 que posee toda su actividad, por lo que se deduce que el PINHE se corresponde con la fracción peptídica en donde reside la actividad de la halocina H7.

El péptido PINHE de la invención procede de la cepa “alicante SPH7” de *Haloferax gibbonsii* y puede encontrarse en formas parecidas en otras especies de microorganismos, donde pueden estar de forma natural o en otro caso, también podrían estar como resultado de un proceso de transformación génica por el que el organismo transformado exprese dichos péptidos inhibidores de NHE. La molécula aminoacídica de la presente invención puede ser aislada, entre otros, mediante técnicas convencionales, a partir de extractos proteicos de microorganismos que la contengan, o mediante el empleo de anticuerpos mono- o policlonales, preparados gracias a la información de la secuencia de aás. proporcionada en esta invención.

El péptido inhibidor del NHE de la invención incluye los fragmentos del mismo que presentan dicha actividad inhibidora del intercambiador Na^+/H^+ y que pueden ser fácilmente identificados a partir de los conocimientos existentes en el sector de la técnica.

La molécula de aás. de la presente invención puede ser expresada, en general, mediante técnicas de ingeniería genética que permitan la expresión recombinante del péptido inhibidor de la presente invención mediante la utilización de un vector de expresión, que contenga una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia SEQ ID NO 1, en una amplia gama de células huésped. En general, dicho vector de expresión comprende, al menos, una secuencia de ADN codificante del péptido inhibidor de la presente invención y, al menos, un promotor que dirige la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos o virus, que pueden contener, además, un origen

bacteriano o de levadura de replicación para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Este vector puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook, J., Russell DW
5 2001 *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY.).

La “síntesis artificial” significa la utilización de técnicas físico-químicas de síntesis que no impliquen la utilización de microorganismos u otros seres vivos para la obtención de un compuesto que contenga total o parcialmente la secuencia del péptido
10 inhibidor de la presente invención y que tenga actividad inhibitoria sobre el NHE.

El término “procedimientos mixtos” tal como se utiliza en la presente invención significa la utilización conjunta de procedimientos de manipulación biológica y síntesis artificial para la obtención de un compuesto que contenga total o parcialmente la secuencia del péptido inhibidor de NHE de la presente invención y que tenga actividad
15 inhibitoria sobre el NHE.

Dentro del alcance de esta invención se encuentran las sales farmacéuticamente aceptables del péptido inhibidor de NHE proporcionado por esta invención. El término “sales farmacéuticamente aceptables” incluye las sales habitualmente utilizadas para formar sales metálicas o sales de adición de ácidos. La naturaleza de la sal no es crítica,
20 siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Dichas sales pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos por los técnicos en la materia haciendo reaccionar el ácido o la base apropiados con el péptido inhibidor de NHE.

El péptido inhibidor de NHE de la presente invención, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden formar parte de diversos tipos de composiciones para su aplicación en el cuerpo de un mamífero, preferiblemente el ser humano. En una
25 realización particular, dicha composición es una composición farmacéutica. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido inhibidor de NHE junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 El empleo de dicho péptido inhibidor de NHE, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, en la elaboración de dicha composición farmacéutica constituye otro objeto adicional de esta invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el péptido inhibidor de NHE pueden presentarse en cualquier forma de administración, por ejemplo, sólida o líquida, y pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, rectal o tópica, para lo cual incluirán los excipientes farmacéuticamente
5 aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada.

Un objeto adicional de la presente invención es el empleo de dichas composiciones farmacéuticas en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de procesos patológicos de mamíferos, preferiblemente humanos, ocasionados por una hiperactividad o una actividad indeseada del NHE, tales como,
10 entre otros, enfermedades cardiovasculares (p.e. hipertensión, infarto de miocardio, arritmias, angina de pecho, etc.), enfermedades cerebrales (p.e. infarto cerebral, edema cerebral, embolias, etc), enfermedades renales (p.e. fallo renal, nefropatía diabética, etc), enfermedades metabólicas (diabetes mellitus, hiperlipidemias, etc), enfermedades con hipersecreción de ácido clorhídrico en la mucosa intestinal, enfermedades con
15 alteraciones en el transporte epitelial, enfermedades con alteraciones del volumen celular, procesos proliferativos patológicos (p.e. cáncer, tumores, fibrosis, etc.), y alteraciones asociadas a una actividad excesiva de células del sistema inmunitario (p.e. inflamación, hipersensibilidad).

Un objeto particular de la presente invención es el empleo de dichas
20 composiciones farmacéuticas en la elaboración de medicamentos para el tratamiento o profilaxis de procesos patológicos de mamíferos, preferiblemente humanos, que cursen con isquemia y lesión por reperfusión post-isquémica debida a la hiperactividad del NHE. Entre estos procesos patológicos se incluyen como destacables las lesiones isquémicas producidas por alteraciones vasculares (tanto primarias como secundarias)
25 en tejidos pertenecientes a los sistemas cardiocirculatorio (corazón y vasos sanguíneos y linfáticos), respiratorio, digestivo, genito-urinario, nervioso (central y periférico), musculoesquelético, hemático, endocrino y piel, y en general todos los órganos anexos a los sistemas anteriormente mencionados, procesos isquémicos por reperfusión post-infarto, procesos isquémicos tras trasplante de órganos y/o tejidos y procesos
30 isquémicos en situaciones fisiológicas tales como ejercicio físico, embarazo, parto, menstruación, etc. Por otro lado, estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse como profilaxis de la isquemia o hipoxia que tiene lugar durante la cirugía

cardíaca y vascular (durante y posteriormente a dichas cirugías) y también como consecuencia de traumatismos incluyendo síndrome de aplastamiento y destrucción de miembros, así como en cualquier patología que implique hipoperfusión tisular (choque hemorrágico, cardíaco, térmico, neurogénico, anafiláctico, etc)

5 Otro objeto particular y adicional de la presente invención es el empleo de la composición farmacéutica de la presente invención en la contracepció. El receptor alpha estrogénico es esencial para una adecuada función fértil en individuos del sexo masculino ya que su actividad es necesaria para el mantenimiento de la citoarquitectura en los conductos eferentes y para la concentración de esperma en la cabeza del
10 epidídimo. Zhou et al. (*PNAS* 2001;98(24):14132-14137) han mostrado que el receptor alpha estrogénico es responsable de la expresión de una isoforma del intercambiador sodio-protón (Na^+/H^+) en los túbulos eferentes del sistema reproductor en ratones machos, y por tanto, influye en la reabsorción de sodio y transporte pasivo de agua, efectos éstos, necesarios para la concentración de esperma. Asimismo, estos autores
15 sugieren que la interferencia en la función de este sistema intercambiador sodio-protón (Na^+/H^+), sería capaz de producir infertilidad en los machos, sin alterar la síntesis de testosterona y por tanto los efectos fisiológicos de ésta, tales como el mantenimiento de la libido. Así pues, la aplicación a la contracepció resultaría de excepcional importancia, entre otras situaciones, por la reversibilidad de efectos del citado
20 compuesto.

Otro objeto particular de la presente invención es el empleo de la composición farmacéutica de la presente invención por su actividad antibiótica en la elaboración de un antibiótico para el tratamiento de enfermedades infecciosas, entre otras, las enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos (p.e. *Helicobacter pylori*).

25 Otro objeto particular de la presente invención es el empleo de cantidades efectivas del compuesto de la presente invención como modulador de la expresión del intercambiador Na^+/H^+ en plantas que tuvieran una sobreexpresión incrementada (constitutiva o no) del intercambiador Na^+/H^+ u otros similares. En los esfuerzos que se realizan para disponer de plantas tolerantes a la sal, podría servir para modular la
30 expresión del intercambiador vacuolar Na^+/H^+ de plantas como el patentado por Eduardo Blumwald (Overexpression of a Vacuolar Na^+/H^+ Antiport in *Arabidopsis*. Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. Science. 1999 Aug

20;285(5431):1256-8.), o cualquier otro, que realizando la misma función, fuera inhibido por el péptido objeto de la presente invención. En este sentido, la aplicación o no de este inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ podría modular la expresión de dicho gen permitiendo una mayor o menor actividad enzimática de la proteína codificada por el mismo. Ello significaría que en condiciones en las que no existiera un exceso de ClNa , la planta que sobreexpresara el transportador podría tener menores efectos indeseables (o carecer de ellos). Tales efectos indeseables se podrían producir, por ejemplo, por una excesiva acidificación del citoplasma. Aunque el intercambiador Na^+/H^+ utiliza Na^+ , no se puede descartar que una presencia elevada de este enzima pueda utilizar otros cationes, extruyendo protones al citoplasma. La utilización comercial podría residir en la adición de este inhibidor en cantidades controladas a plantas que tuvieran una expresión incrementada (constitutiva o no) del intercambiador de Na^+/H^+ vacuolar arriba mencionado o enzimas similares.

15 DESCRIPCIONES DE LAS FIGURAS

Figura 1A - Electroforésis en SDS poliacrilamida (12%) de una muestra conteniendo el PINHE tras su purificación con acetona. Calle 1 y 2: Proteínas patrón. Calle 3: Muestra conteniendo el PINHE. Tinción con nitrato de plata.

Figura 1B - Electroforésis en SDS-poliacrilamida (12%) de una muestra conteniendo H7 semipurificada en primer lugar por Hidroxiapatito y en segundo lugar por Sephadex G50. Calle 1: proteínas patrón. Calle 2: Muestra conteniendo H7. Tinción con nitrato de plata.

Figura 1C - Purificación de H7 (antes H6) (figura publicada en Torreblanca M, Meseguer I, Rodriguez-Valera F. 1989, *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2655-2661) Tinción con azul Comassie.

Figura 2. Halos de inhibición mostrando la actividad inhibitoria del PINHE sobre la cepa indicadora en doble capa.

Figura 3A. Microfotografía óptica de células de *Halobacterium salinarum* sin tratar (X 2000).

Figura 3B. Microfotografía óptica de células de *Halobacterium salinarum* tratadas con PINHE (X 2000).

Figura 4.- Relación entre la medida citométrica de la acidez citoplasmática de células 293HEK (Ratio) y su pH intracelular. El ratio es la medida de la fluorescencia de BCECF en el citoplasma expresada como cociente entre la fluorescencia naranja (FL3) y verde (LF1) detectadas por el citómetro. El pH intracelular es el pH del medio donde se suspenden las células permeabilizadas con nigericina. Para ello las células (1×10^5 células por ml) se incubaron a 37 °C durante 15 minutos con medio DMEM con glucosa y sin bicarbonato que contenía a su vez FBS 10%, HEPES 25 mM y BCECF 2 µg/ml y cuyo pH se ajustó con HCl. El pH intracelular se equilibró con el externo mediante la presencia en el medio de 2 µg/ml de nigericina. Después de la incubación la fluorescencia se midió en el citómetro.

Figura 5.- Recuperación del pH intracelular de células 293HEK después de una acidificación con propionato sódico. El ensayo se realizó en presencia (derecha) y ausencia (izquierda) de 1000 U/ml del péptido inhibidor de NHE como se ha descrito en la Figura 4 pero sin la presencia de nigericina. En el eje de abscisas se representa el ratio y en ordenadas el tiempo transcurrido en el ensayo (el tiempo máximo reseñado en la figura, (1023, equivale a 300 segundos).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Ejemplo 1: Procedimiento de obtención y purificación del PINHE. Comparación con la obtención y purificación de la halocina H7.

El PINHE al igual que la halocina H7 se obtiene a partir de la cepa CECT 4547 y siguiendo las mismas condiciones de cultivo que se describen en la patente *ES 2 094 695*. A continuación se eliminan las células, se concentra el sobrenadante y se dializa con agua destilada mediante técnicas de filtración y ultrafiltración tangencial siguiendo también el protocolo que allí se indica. Llegados a este punto, se tropezaba con el principal inconveniente que mostraba la halocina H7 que era el proceso de purificación, que constaba de varias etapas en las que se requerían técnicas lentas y costosas de purificación de proteínas.

A) Obtención del PINHE:

Se prepara un cultivo de la cepa productora SPH7 (CECT 4547) en un medio que contenga 2,66 M ClNa, 0,13 M Cl₂Mg x 6H₂O, 0,16 M SO₄Mg x 7H₂O, 6,64 mM Cl₂Ca, 53,3 mM ClK, 1,6 mM CO₃HNa, 4,48 mM BrNa, suplementado con 0.5% de

extracto de levadura y pH de 7,2. Se incubaba a 37°C con aireación hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,9 y 1 a 600 nm. A continuación se separan las células mediante la utilización de un sistema de filtración tangencial con filtros de tamaño de poro de 0,45 μ m. Posteriormente se eliminan grandes macromoléculas mediante ultrafiltros de 100.000 Daltons. A continuación, el filtrado se concentra utilizando ultrafiltros de 1000 Daltons. El concentrado se dializa frente a agua destilada y se procede como sigue:

Precipitación con tres o más volúmenes de acetona en frío durante 18-24 horas.

El PINHE queda en el sobrenadante y se elimina el precipitado que contiene las impurezas por centrifugación.

- 10 Se toma el sobrenadante y se elimina la acetona (p.e. mediante un rotavapor).

Se comprueba el grado de pureza del PINHE.

Si no se ha alcanzado un grado de pureza satisfactorio (aproximadamente del 90%) se repite de nuevo el proceso.

- 15 La determinación del grado de pureza de las muestras que contienen PINHE se realizó mediante análisis en geles de poliacrilamida en SDS (figura 1A) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli UK, 1973. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599). El PINHE así obtenido es susceptible de ser tratado para obtener su secuencia peptídica que se indica en la SEQ ID NO 1.

- 20 B) Obtención de la halocina H7:

A partir del concentrado dializado, podemos obtener halocina H7 siguiendo otro procedimiento que no incluya la precipitación con acetona. Así una muestra del concentrado se aplicó en una columna de hidroxipatito en tampón conteniendo fosfato potásico 10 mM, 2'5 M NaCl, pH 7'2 y eluido utilizando un gradiente lineal de tampón fosfato potásico 10 – 400 mM, 2'5 M NaCl, pH 7'2. Se colectaron fracciones de 10 ml y de cada una se realizó un test para determinar su actividad inhibitoria.

Las fracciones que contenían la mayor actividad inhibitoria fueron concentradas hasta un volumen final de 3 ml. Posteriormente se dializaron frente a agua destilada y se filtraron utilizando una columna de Sephadex G-50 previamente equilibrada en tampón 0'05 M TRIS / HCl, pH 6'7. Las fracciones de 1 ml se eluyeron en el mismo tampón. Aquellas que contenían la máxima actividad se juntaron y concentraron hasta un volumen de 1'5 ml. En este punto el grado de la pureza de la muestra se determinó

mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (figura 1B) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli UK, 1973. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599).

Si se desea mayor grado de pureza hay que continuar el proceso utilizando otros métodos adicionales de purificación de proteínas. Utilizando cromatografía de alta
5 presión, como se describe por ejemplo en Torreblanca y colaboradores (Torreblanca et al 1989, *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2655-2661), se puede alcanzar un buen grado de pureza, si bien el rendimiento del proceso es bajo (la figura 1C se muestra el resultado de este procedimiento de purificación).

10 *Características físico-químicas del PINHE:*

Tiene un peso molecular de 2733.8 Daltons calculado por espectrometría de masas que se corresponde con el peso calculado como la suma de los pesos de los aminoácidos que lo componen.

A partir de su secuencia, se deduce que el PINHE es un péptido con carácter
15 hidrofóbico. Esto está en concordancia con la dificultad que ha mostrado para disolverse en agua después de haber sido liofilizado.

Para estudiar otras propiedades físico-químicas, se tomaron muestras de PINHE, se determinó su actividad y se sometió a diversos tratamientos tras los cuales se determinó nuevamente la actividad remanente. Como resultado de ello se determinó lo siguiente:

20 El PINHE es resistente a la desnaturalización térmica, siendo capaz de soportar 100°C durante varios minutos y es necesario un tratamiento de 10 min. a 121°C para destruir totalmente su actividad por calor.

El PINHE mantiene toda su actividad en un amplio rango de soluciones salinas que va desde el agua destilada hasta soluciones saturadas de sales. Asimismo mantiene su
25 actividad en una gran diversidad de soluciones acuosas, no habiéndose encontrado hasta el momento pérdida de actividad por estos motivos en ningún caso.

El PINHE soporta un amplio rango de pH del disolvente, siendo activa al menos, a valores de pH comprendidos entre 5 y 9.

Proteasas como la tripsina no le afectan, sin embargo es sensible a otras enzimas tales
30 como la pronasa.

Es susceptible de liofilización sin pérdida de actividad aunque para la rehidratación posterior requiere previamente disolución en un solvente como el DMSO.

Se trata además de una sustancia muy estable, capaz de conservar toda su actividad en soluciones acuosas estériles durante largos períodos de tiempo. De igual modo soporta bien las bajas temperaturas, incluso la congelación, aunque se ha observado una disminución parcial de su actividad tras sucesivas congelaciones y descongelaciones.

5

Ejemplo 2: Determinación de la actividad del PINHE.

La actividad del PINHE se determina del mismo modo que la de la halocina H7, utilizando el sistema denominado de dobles capas conteniendo la cepa indicadora.

Se prepara un medio de cultivo sólido tal que contiene los mismos componentes que el medio líquido indicado en el ejemplo 1 añadiendo un 2% de agar-agar. Se distribuye en placas Petri a razón de 10 ml por placa y se deja solidificar. Se preparan tubos con 5 ml del mismo medio que se mantienen a 50°C para evitar la solidificación. A estos tubos se les añade una suspensión microbiana conteniendo aproximadamente 10^6 células de la cepa indicadora de *Halobacterium salinarum* y rápidamente se vierte sobre las placas antes preparadas y se deja también solidificar, generando así la doble capa. Se preparan diluciones seriadas de la muestra de PINHE a ensayar. De estas diluciones se depositan 10 μ l sobre la doble capa y se deja a temperatura ambiente hasta su completa absorción. Posteriormente se incuban las placas a 37°C durante cuatro días. La máxima dilución del PINHE que muestra un halo de inhibición detectable se considera que contiene 1 unidad arbitraria, es decir 100 unidades arbitrarias (UA) por mililitro (Figura 2).

15
20**Ejemplo 3: Efecto antibiótico sobre *Halobacterium salinarum*.**

Se ha comprobado que el PINHE al igual que la halocina H7, tiene actividad antibiótica frente a microorganismos del grupo de las haloarchaeas. Estos microorganismos que habitan en ambientes hipersalinos (aprox. 4 M de Na^+ en el medio externo frente a 2 M de Na^+ intracelular), poseen un NHE unidireccional muy eficiente para sacar este ión del medio intracelular aprovechando la fuerza protón motriz. La inhibición del NHE es letal para estos microorganismos, ya que en un medio donde la concentración de Na^+ es tan elevada, si no funciona el NHE, este ión se acumula intracelularmente provocando un desequilibrio osmótico. El agua entra al interior celular, la célula se hincha y finalmente se lisa y muere. Una forma de detectar este

25
30

efecto letal es por observación al microscopio de las células antes y después del tratamiento.

Para ello se prepara un cultivo de la cepa indicadora de *Halobacterium salinarum*, se centrifuga y se resuspende en una solución conteniendo la misma
5 concentración de sales del ejemplo 1. Se cuantifican las proteínas y se ajusta hasta alcanzar la concentración de 1 mg de proteínas por mililitro. Se toman fotos de las células utilizando un microscopio de contraste de fases (figura 3A). Se añade PINHE purificado a una concentración final de 640 UA por miligramo de proteína. A distintos
10 intervalos de tiempo se toman muestras para ser fotografiadas al microscopio. A partir de los diez minutos se observa una deformación e hinchazón de las células que aumenta progresivamente con el tiempo hasta producirse la lisis celular. Al cabo de 24 horas solo pueden observarse restos de envolturas celulares, denominados fantasmas (figura 3B).

Ejemplo 4: Efecto diurético y natriurético del PINHE en ratas.

15 Un grupo de 6 ratas *wistar* se dividió en dos, tres para el grupo control y otras tres para ser tratadas. A este grupo le sería administrada intraperitonealmente una inyección única de PINHE purificado a una concentración de 125 UA por gramo de peso del animal. El grupo control fue tratado con suero salino. Los animales se introdujeron en jaulas metabólicas individuales. Tras la administración del PINHE se
20 controló el peso del animal y la ingesta de alimento y de agua a las 24, 48 y 72 horas de la administración. Asimismo se recogía y medía el volumen de orina. Para controlar el efecto del PINHE sobre la natriuresis se determinó la concentración de sodio en la orina de las ratas. A las 24 horas se observó un incremento del volumen de la orina del orden del 89-98% y un aumento de la concentración de sodio en la orina del orden del 39-43%
25 de las ratas tratadas con PINHE respecto a las ratas control, lo cual indica un efecto claramente diurético y natriurético del PINHE. Estos efectos son compatibles con una actividad inhibidora del PINHE sobre el NHE. El mecanismo podría ser una disminución de la tasa de reabsorción tubular. Los efectos indicados revierten de forma espontánea a las 48-72 horas del tratamiento.

30

Ejemplo 5.- Inhibición del NHE de células 293HEK (línea primaria de células de riñón de embriones humanos).

Las células 293HEK se cultivaron en medio de cultivo constituido por DMEM conteniendo 4 g/l de glucosa y 3.7 g/l de bicarbonato sódico y suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, penicilina 1000 U/ml, estreptomicina 1000 µg/ml, anfotericina 2.5 µg/ml y gentamicina 50µg/ml. El cultivo se realizó a 37°C y en atmósfera de 5% de CO². Las células se cultivaron hasta EL 80% de confluencia, entonces se recolectaron mediante incubación con tripsina 0.25-0.12% y EDTA 0.01-0.03% y centrifugación a 300g durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió en medio DMEM sin bicarbonato, conteniendo 10% de suero fetal bovino (FBS) y 25 mM de Hepes. Se realizó un recuento del número de células vivas utilizando un hemocitómetro y un colorante vital (trypan blue dye). La suspensión celular se conservó en hielo hasta el ensayo. El efecto inhibidor del PINHE sobre NHE de las células 293HEK se realizó mediante un ensayo con un citómetro de flujo, midiendo la recuperación del pH intracelular después de una acidificación con ácido propiónico 1M (pH 7-7.5) en presencia o ausencia (control) de PINHE. El ensayo contenía: 1x10⁵ células/ml, 10% de FBS, 2 µg/ml de BCECF (2',7'-bis(carboxyethyl)-5,6-carboxyfluoresceína) y hasta 1-2 ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con glucosa y sin bicarbonato, 10% FBS y 25mM de Hepes. Se incubó a 37°C durante 10 minutos y a los tubos correspondientes se les añadió PINHE a las concentraciones deseadas entre 0 y 3000 U/ml y se incubó hasta la estabilización del pH intracelular (5 – 30 minutos).

Se midió en un citómetro (EPICS XL-MCL de Beckman-Coulter) la fluorescencia de BCECF – medida como cociente entre las emisiones de fluorescencia verde (FL1) y naranja (FL3) - y a continuación se acidificó añadiendo ácido propiónico neutralizado con NaOH hasta pH 7 – 7.5 de una solución stock hasta conseguir una acidificación intracelular deseada desde 7.2 hasta 6.4, continuándose entonces la medida de fluorescencia de BCECF. La relación entre la fluorescencia de BCECF y pH interno de las células 293HEK se realizó en experimentos paralelos equilibrando el pH externo (utilizando distintos pH en la solución del ensayo) con el pH interno, para lo que se añadió a la solución de ensayo 2 µg/ml de nigericina para permeabilizar las células a los protones del medio extracelular. Un ejemplo de la relación entre la fluorescencia de BCECF – cociente FL3/FL1 - de las células y su pH interno se muestra en la Figura 4. Al producirse la acidificación con propiónico tiene lugar un descenso brusco del pH

interno de las células desde valores de equilibrio 7.3-7.6 hasta 7.1-6.4. En este momento la célula pone en marcha sus mecanismos de regulación de pH intracelular para restaurar el pH de equilibrio. Sin embargo, la ausencia de bicarbonato en el medio de ensayo inhabilita al intercambiador bicarbonato/cloruro ($\text{CO}_3\text{H}^-/\text{Cl}^-$) y además la presencia de Hepes en el medio inhibe el cotransportador NBS por lo que la recuperación del pH intracelular que tiene lugar después de la acidificación se debería casi exclusivamente al intercambiador NHE. En la Figura 5 se muestra un ejemplo de acidificación de células 293HEK en ausencia (control) y en presencia de PINHE (1000 U/ml). La acidificación con propionato sódico produjo una acidificación del citosol de las células desde un pH en el equilibrio de 7.4 hasta un valor de 7.04. Inmediatamente la célula comienza a restablecer el pH intracelular como se pone de manifiesto en la Figura 5, tanto en el caso control como en presencia de PINHE. A partir de los valores experimentales se realizó una estimación de la velocidad inicial de recuperación del pH intracelular sobre la base de un ajuste matemático de los datos experimentales a una curva y la obtención de su derivada a tiempo cero, lo que permite estimar valores iniciales de velocidades de recuperación del pH intracelular de $0.37\text{exp}(-2) \Delta\text{pH/s}$ para el control y de $0.11\text{exp}(-2) \Delta\text{pH/s}$ en el caso de la presencia de PINHE. Los resultados demuestran que el PINHE, tras la acidificación del citosol, inhibe la recuperación del pH intracelular debida al intercambiador de Na^+/H^+ .

REIVINDICACIONES

- 1.- Un péptido inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ caracterizado por una secuencia de aminoácidos perteneciente al siguiente grupo:
 - 5 la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO 1 o un fragmento de la misma; y
 - una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia definida en a)
- 2.- Un péptido según la reivindicación 1 caracterizado porque se obtiene, entre otros microorganismos, a partir de la cepa "alicante SPH7" de la haloarquea *Haloferax*
 - 10 *gibbonsii* (CECT 4547).
- 3.- Un péptido según la reivindicación 1 caracterizado porque se obtiene por procedimientos de ingeniería genética que permiten la expresión de dicho péptido, por síntesis artificial o por procedimientos mixtos.
- 4.- Una composición caracterizada porque comprende un péptido según una cualquiera
 - 15 de las reivindicaciones 1 a la 3.
- 5.- Una composición según la reivindicación 4, caracterizada porque es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 y, al menos, un excipiente farmaceuticamente aceptable.
- 6.- Empleo de una composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 a la 5 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de enfermedades y alteraciones patológicas en mamíferos, preferentemente humanos, ocasionados por una hiperactividad o una actividad indeseada del NHE, tales como, entre otros, enfermedades cardiovasculares (p.e. hipertensión, infarto de miocardio, arritmias,
 - 25 angina de pecho, etc.), enfermedades cerebrales (p.e. infarto cerebral, edema cerebral, embolias, etc), enfermedades renales (p.e. fallo renal), enfermedades metabólicas (diabetes mellitus, hiperlipidemias, etc), enfermedades con hiperproducción de ácido clorhídrico de la mucosa gástrica, enfermedades con alteraciones en el transporte epitelial, enfermedades con alteraciones del volumen celular, procesos proliferativos patológicos (p.e. cáncer, tumores, fibrosis, etc.), y alteraciones asociadas a una actividad
 - 30 excesiva de células del sistema inmunitario (p.e. inflamación, hipersensibilidad).

- 7.- Empleo de una composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 a la 5 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de enfermedades y alteraciones patológicas en mamíferos, preferentemente humanos, que cursen con isquemia y lesión por reperfusión post-isquémica debida a la hiperactividad del NHE, entre otros,
- 5 lesiones isquémicas producidas por alteraciones vasculares (tanto primarias como secundarias) en tejidos pertenecientes a los sistemas cardiocirculatorio (corazón y vasos sanguíneos y linfáticos), respiratorio, digestivo, genito-urinario, nervioso (central y periférico), musculoesquelético, hemático, endocrino y piel; así como en general todos
- 10 los órganos anexos a los sistemas anteriormente mencionados.
- procesos isquémicos por reperfusión post-infarto,
- procesos isquémicos tras trasplante de órganos y/o tejidos,
- isquemia o hipoxia que tiene lugar durante la cirugía cardíaca y vascular,
- lesiones de tejidos causadas por isquemia en situaciones fisiológicas tales como
- 15 ejercicio físico, embarazo, parto, menstruación, etc.
- isquemia o hipoxia como consecuencia de traumatismos incluyendo síndrome de aplastamiento y destrucción de miembros.
- Cualquier patología que implique hipo-perfusión tisular (choque hemorrágico, cardíaco, térmico, neurogénico, anafiláctico, etc)
- 20 8.- Empleo de una composición farmacéutica según la reivindicación 7 caracterizado porque la composición farmacéutica se administra previamente, durante y posteriormente a cualquier proceso quirúrgico.
9. - Empleo de una composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 a la 5 en la elaboración de un medicamento que pueda ser utilizado como contraceptivo en
- 25 mamíferos machos, incluyendo humanos.
- 10.- Empleo de una composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 a la 5 en la elaboración de un antibiótico para el tratamiento de infecciones en mamíferos, preferentemente humanos, entre otras, provocadas por microorganismos como *Helicobacter pylori*.
- 30 11.- Empleo de cantidades efectivas del péptido inhibidor según una de las reivindicaciones 1 a la 3 para modular la expresión del intercambiador Na^+/H^+ en

plantas que tuvieran una sobreexpresión incrementada (constitutiva o no) del intercambiador Na^+/H^+ u otros similares.

1/6

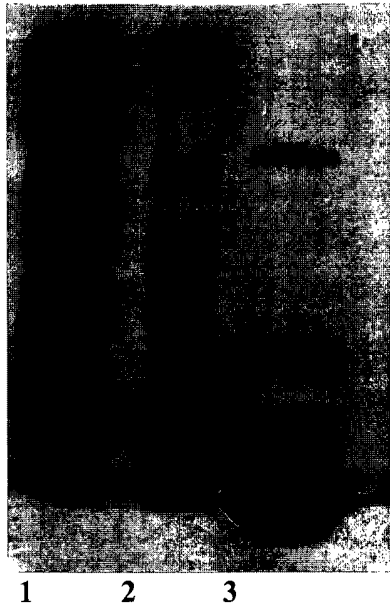


FIGURA 1A

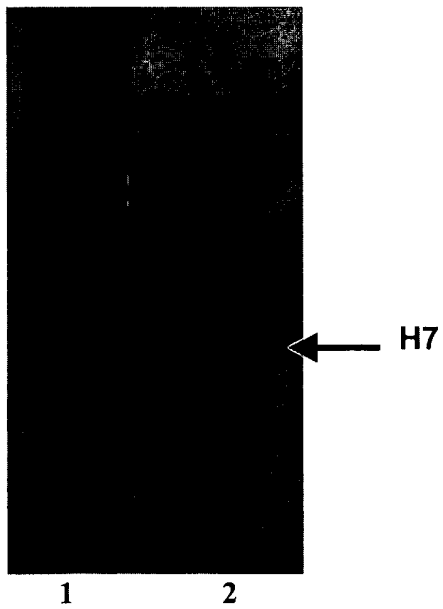


FIGURA 1B

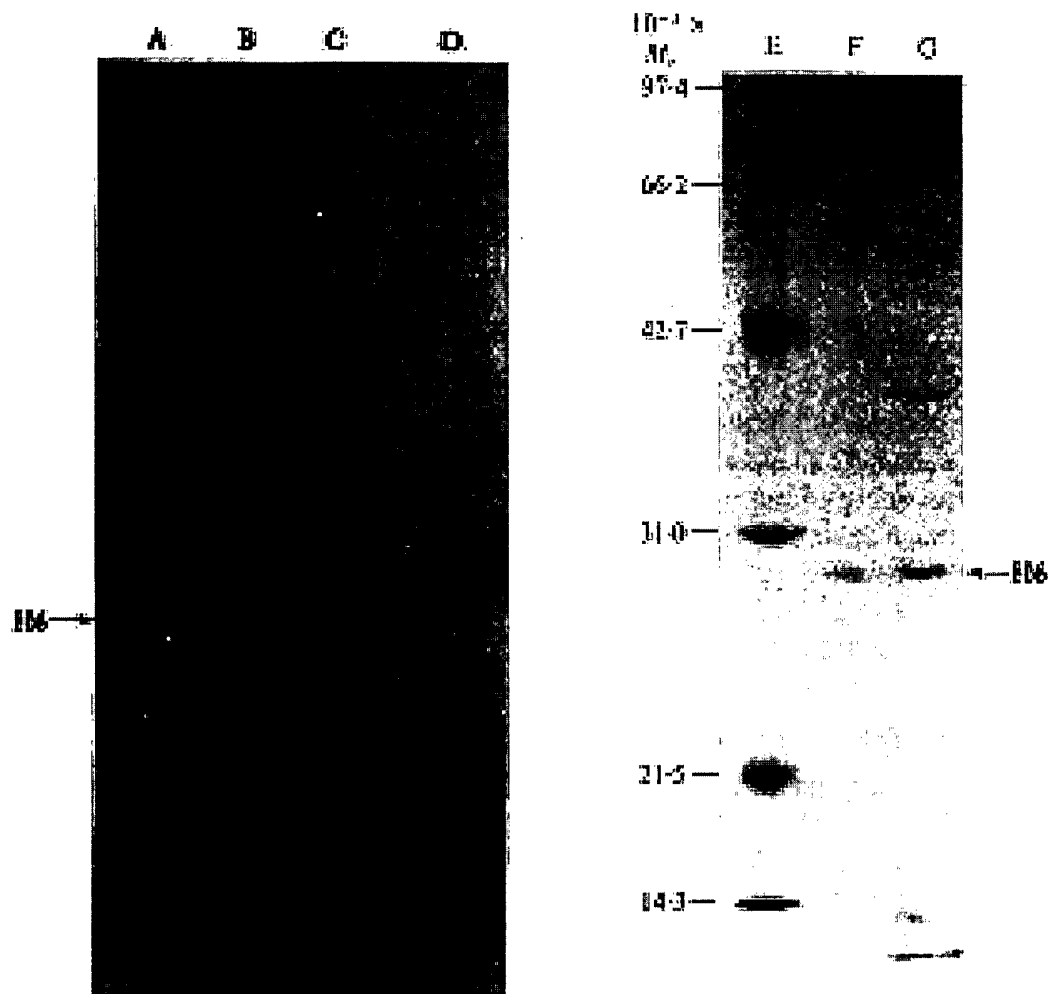


FIGURA 1C

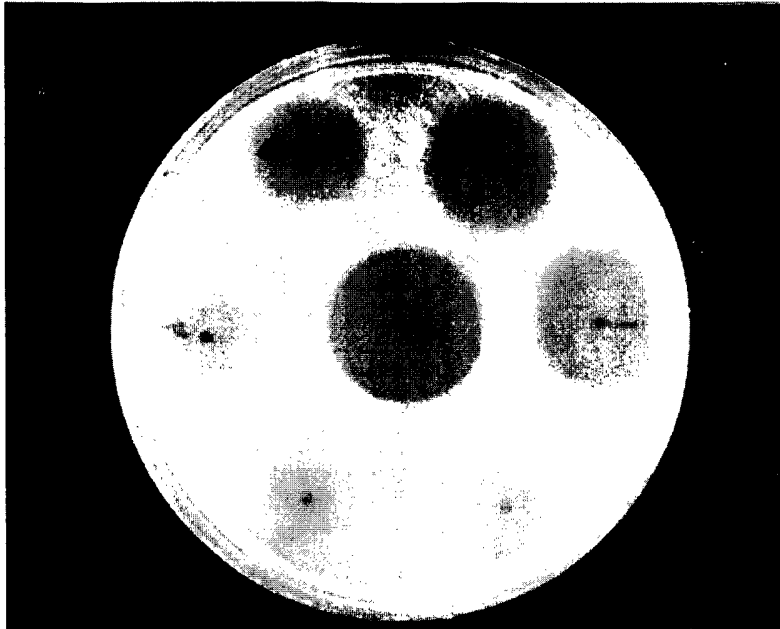


FIGURA 2

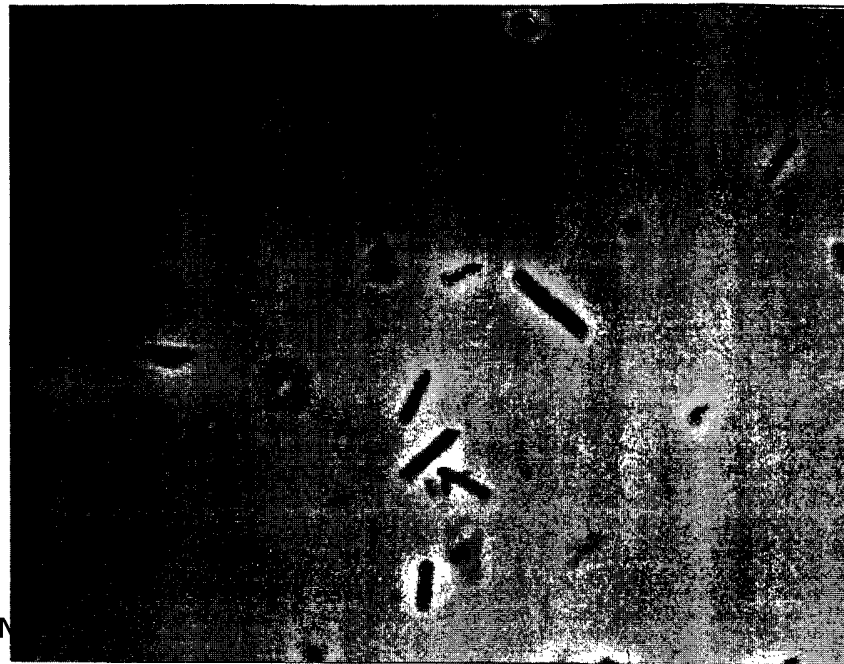


FIGURA 3A

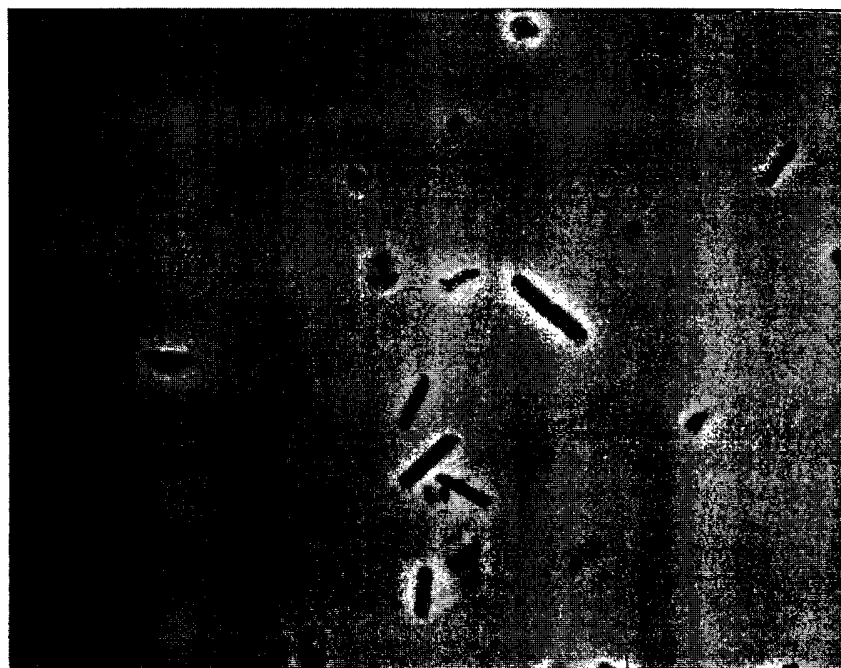
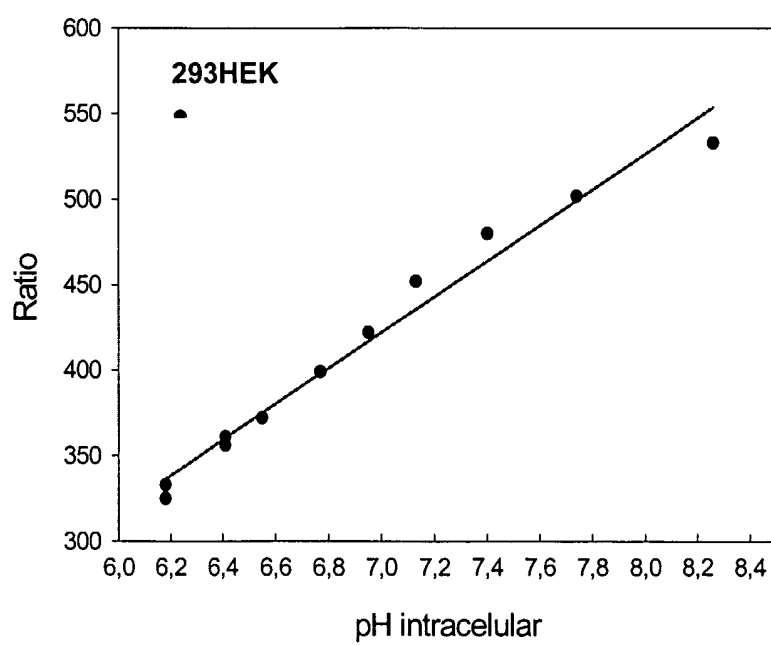
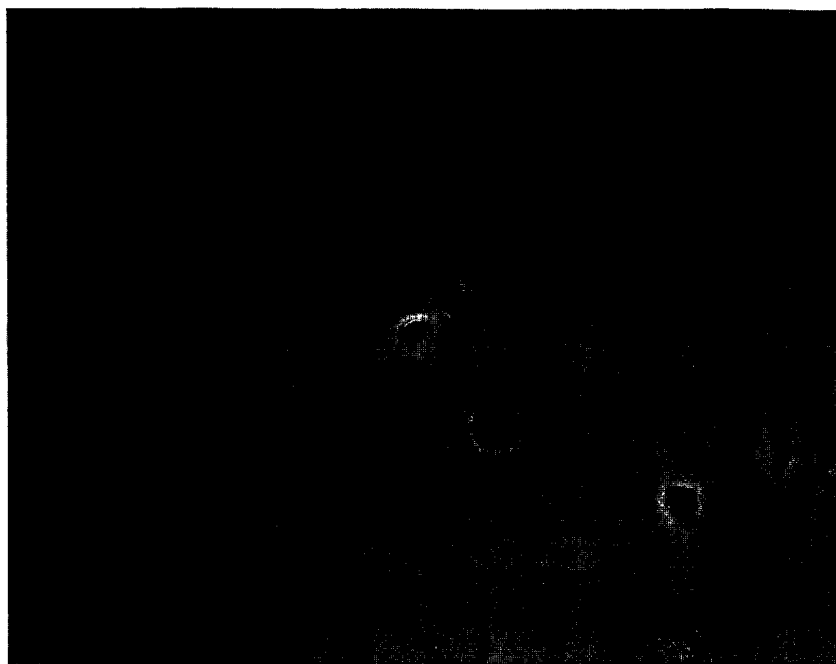
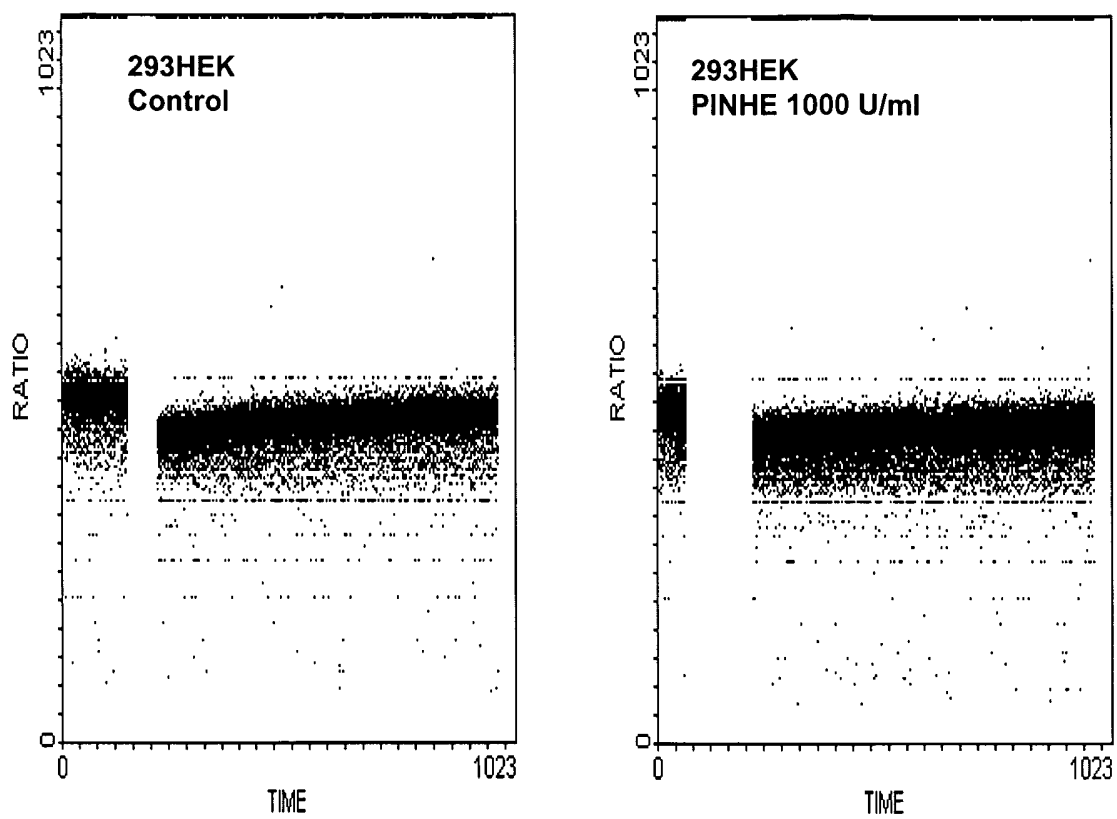


FIGURA 3B

5/6

**FIGURA 4**

6/6

**FIGURA 5**

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
<120> NUEVO PEPTIDO INHIBIDOR DEL INTERCAMBIADOR DE Na⁺/H⁺
(PINHE) Y SUS APLICACIONES
10 <130> PINHE
<160> 1
15 <170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 28
20 <212> PRT
<213> *Haloferax gibbonsii* alicante SPH7
25 <400> 1
Ser Trp Ile Asp Ser Ala Ser Thr Ala Ala Leu Gly Thr Asn Pro
1 5 10 15
30 Val Thr Met Ser Ala Pro Gly Gly Thr Val Asn Ile Asp
20 25
35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES03/00364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.7 C07K 14/215, A61K 38/16, A61P 9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.7 C07K, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EMBL, REG, CIBEPAT, EPODOC, PAJ, WPI, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2094695 A (UNIVERSIDAD DE ALICANTE) 16.01.1997, the whole document	1-4
A	ES 2094696 A (UNIVERSIDAD DE ALICANTE) 16.01.1997, the whole document	5-11
A	WO 0183470 A (PFIZER PRODUCTS INC.) 08.11.2001, the whole document	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 2003 (30.09.03)

Date of mailing of the international search report

13 October 2003 (13.10.03)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 03/00364

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although the claims relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

2. ☐ Claims Nos.: **No 8**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES03/00364

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2094695 A	16.01.1997	none	
-----	-----	-----	-----
ES 2094696 A	16.01.1997	WO 9628179 A	19.09.1996
-----	-----	-----	-----
WO 0183470 A	08.11.2001	AU3589601 A	12.11.2001
		BG107139 A	31.07.2003
		CA2407535 A	08.11.2001
		CN1426404T T	21.02.2003
		EP1276737 A	22.01.2003
		HU0300651 A	28.07.2003
		NO20025132 A	12.12.2002
		TR200202439T T	21.02.2003
		US2001051634 A	13.12.2001
		US2003064361 A	
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES03/00364

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD CIP⁷ C07K 14/215, A61K 38/16, A61P 9/10 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.				
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación) CIP⁷ C07K, A61K, A61P Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda				
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EMBL, REG, CIBEPAT, EPODOC, PAJ, WPI, HCAPLUS				
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES				
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°		
A	ES 2094695 A (UNIVERSIDAD DE ALICANTE) 16.01.1997, todo el documento.	1-4		
A	ES 2094696 A (UNIVERSIDAD DE ALICANTE) 16.01.1997, todo el documento.	5-11		
A	WO 0183470 A (PFIZER PRODUCTS INC.) 08.11.2001, todo el documento.	1-11		
<input type="checkbox"/> En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p> </td> </tr> </table>			<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>			
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 30 septiembre 2003 (30.09.2003)		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional <div style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">13 OCT 2003 13. 10. 03</div>		
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. n° de fax +34 91 3495304		Funcionario autorizado Maria Novoa Sanjurjo n° de teléfono +34 91 349 55 52		

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 03/00364

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: 8.
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber: aunque las reivindicaciones se refieren a un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, la búsqueda se ha realizado en relación a los efectos de los compuestos/composición.
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES03/00364

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2094695 A	16.01.1997	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
ES 2094696 A	16.01.1997	WO 9628179 A	19.09.1996
-----	-----	-----	-----
WO 0183470 A	08.11.2001	AU3589601 A	12.11.2001
		BG107139 A	31.07.2003
		CA2407535 A	08.11.2001
		CN1426404T T	21.02.2003
		EP1276737 A	22.01.2003
		HU0300651 A	28.07.2003
		NO20025132 A	12.12.2002
		TR200202439T T	21.02.2003
		US2001051634 A	13.12.2001
		US2003064361 A	
-----	-----	-----	-----

ES03/00364 – ISR

BOX I.1

Although the claims relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.