

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 829 927**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
C07K 7/04 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
G16C 20/90 (2009.01)
G16C 99/00 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2015** **PCT/EP2015/051376**
87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015** **WO15110589**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2015** **E 15705512 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2020** **EP 3107933**

54 Título: **Péptidos miméticos y su uso en medicina**

30 Prioridad:

24.01.2014 IT MI20140097

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2021

73 Titular/es:

**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(100.0%)
Piazzale Aldo Moro, 7
00185 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**CATALUCCI, DANIELE y
CONDORELLI, GIANLUIGI**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 829 927 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos miméticos y su uso en medicina

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de los canales iónicos, y en concreto se refiere a péptidos que son adecuados para su uso en el tratamiento de afecciones donde la densidad de los canales de calcio tipo L está alterada.

Estado de la técnica

[0002] Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que ayudan a establecer y controlar el pequeño gradiente de voltaje a través de la membrana plasmática de células vivas permitiendo el flujo de iones hacia abajo en el gradiente electroquímico. Están presentes en las membranas que rodean a todas las células biológicas regulando el flujo de iones a través de las mismas. Los canales de calcio tipo L (LTCC) son canales iónicos que vinculan la despolarización de la membrana a la entrada de Ca^{2+} celular¹. Los LTCC son fundamentales para numerosos procesos, incluyendo la propagación del potencial de acción cardíaca, la contracción muscular, la expresión génica dependiente de Ca^{2+} , la eficacia sináptica y la supervivencia celular al contribuir a varias cascadas de señalización. Los LTCC desempeñan una función esencial en los procesos de señalización dependientes de Ca^{2+} en varios tipos de células, y se encuentran principalmente en el músculo esquelético, el músculo liso, el hueso (osteoblastos), los miocitos atriales y ventriculares (responsables del potencial de acción prolongado en células cardíacas; también denominados receptores de DHP), las dendritas y espinas dendríticas de neuronas corticales. En concreto, los LTCC se pueden encontrar en células excitables, como las células de músculos cardíacos y esqueléticos, células de músculos lisos, células neuronales, células que están presentes en los ojos y que son responsables de la visión. Los LTCC son los iniciadores del proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) en el corazón y están compuestos por distintas subunidades: la subunidad formadora de poros $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ y las subunidades complementarias $\text{Ca}_v\beta 2$ y $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$. El número de LTCC funcionales en la membrana plasmática influye notablemente en la intensidad y la duración de las señales de Ca^{2+} que desencadenan los ciclos sistólico/diastólico del miocardio y el ritmo cardíaco, y se han observado cambios en la densidad de los LTCC durante el envejecimiento, así como en diversas enfermedades. El n.º de acceso C7TQ54 a la base de datos UniProt de 13 de octubre de 2009 (XP002729771) corresponde a la secuencia de proteínas de la subunidad $\text{Ca}_v\beta 2$ de ratón. El n.º de acceso Q6TME0 a la base de datos UniProt de 5 de julio de 2004 (XP002729772) corresponde a la secuencia de proteínas de la variante de empalme $\text{Ca}_v\beta 2\text{dN4}$ de humano.

[0003] El documento US 2002142938 da a conocer las secuencias de aminoácidos de péptidos transportadores que están relacionados con la subfamilia de transportadores del canal de calcio.

[0004] De hecho, se ha observado una tendencia a la disminución de la densidad del canal de Ca^{2+} con el avance de la hipertrofia patológica, la miocardiopatía dilatada, la fibrilación atrial/ventricular y la miocardiopatía diabética. Además, existen pruebas recientes que han revelado que las mutaciones de pérdida de función en genes que codifican subunidades de los LTCC, anteriormente consideradas raras, se consideran ahora relativamente comunes y se asocian a una gran variedad de síndromes hereditarios de arritmia cardíaca, incluyendo el síndrome de Timothy, la repolarización precoz, el síndrome de QT corto y el síndrome de Brugada. Por lo tanto, estas observaciones destacan el papel decisivo de los LTCC en salud y enfermedad y respaldan la opinión de que los LTCC pueden representar una diana farmacológica razonable para el tratamiento de diversas afecciones patológicas que precisan enfoques terapéuticos novedosos para reducir su morbilidad y mortalidad.

[0005] En los últimos años, se han conseguido avances importantes en la comprensión de las anomalías de la regulación de Ca^{2+} presentes en enfermedades de humanos, y se han realizado esfuerzos para convertir este conocimiento en estrategias terapéuticas novedosas dirigidas a intercambiadores de iones relacionados con Ca^{2+} , proteínas de unión y canales iónicos para impedir o revertir disfunciones de la gestión del Ca^{2+} .

[0006] Es necesaria una comprensión exhaustiva de los mecanismos moleculares subyacentes a alteraciones estructurales y funcionales de los LTCC que se producen en patologías cardíacas, así como en otras patologías relacionadas con los LTCC (o dependientes de Ca^{2+}) en general.

[0007] Cada vez resulta más necesario e importante el desarrollo de moléculas pequeñas, tales como péptidos terapéuticos, para el tratamiento de afecciones que tengan una funcionalidad alterada de los LTCC, que sean más específicas de la diana y eviten los efectos adversos de los fármacos actualmente disponibles.

[0008] Por consiguiente, el objeto de la presente invención es el desarrollo de péptidos miméticos novedosos como herramientas innovadoras, que permiten modular la cantidad de Ca^{2+} intracelular disponible para activar células excitables (esto es, para unir y activar proteínas contráctiles musculares).

Sumario de la invención

[0009] La presente invención se refiere a un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y a su uso como un dominio de unión a péptidos. La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10 corresponde a un dominio de unión conocido previamente [en adelante denominado dominio de interacción Tail (*Tail Interacting Domain* (TID)), véase el Ejemplo 1] de la proteína diana $\text{Ca}_v\beta 2$, que es el sitio de unión de los péptidos (expuestos en SEQ ID NO:1 a 9 y SEQ ID NO:12 a 22) y que, al unirse al TID, amplía la semivida de la proteína $\text{Ca}_v\alpha 1.2$, subunidad formadora de poros de los LTCC. Esta modulación de la densidad de los LTCC restablece la

gestión del Ca^{2+} intracelular en afecciones en las que las alteraciones de la homeostasis de Ca^{2+} en células excitables determinan la extensión y la gravedad de la enfermedad.

[0010] La invención también se refiere a péptidos miméticos expuestos en SEQ ID NO:1 a 9 y SEQ ID NO:12 a 22 que se unen al dominio de unión a péptidos TID de la proteína $\text{Ca}_v\beta 2$ según SEQ ID NO:10, actuando así en la modulación de la densidad y función de los LTCC.

[0011] Como se describirá a continuación en la descripción detallada de la invención, la presente invención se refiere a un péptido aislado que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

A- Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-B (SEQ ID NO:1)

o

A- Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-B (SEQ ID NO:2)

o

Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp (SEQ ID NO:8), o Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO:9); o Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp (SEQ ID NO:21), o Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO:22),

donde:

A es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp-Gln-,

y

B es una secuencia de aminoácidos que está presente opcionalmente, y en caso de estar presente se selecciona del grupo que consiste en: Arg-, Arg-Ser, Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys (SEQ ID NO:23), Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys (SEQ ID NO:24), Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys-Ser-Gln-His-Arg (SEQ ID NO:25), Arg-Ser-Gln, o Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro (SEQ ID NO:26).

[0012] Los péptidos de la presente invención tienen las ventajas de ser específicos para los LTCC, ya que se unen a un dominio de bolsillo (TID, SEQ ID NO:10) en la proteína $\text{Ca}_v\beta 2$, subunidad de los LTCC.

[0013] Otro aspecto de la presente invención es el uso de un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 para la preparación de un medicamento.

[0014] En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 para el tratamiento de afecciones que presentan una densidad y función alteradas de los LTCC.

[0015] Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o varios péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0016] Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del péptido aislado seleccionado de la SEQ ID NO:10 para su posterior optimización y al desarrollo de péptidos novedosos (además de SEQ ID NO:1-9 y SEQ ID NO:12-22) o compuestos sintéticos capaces de unirse al dominio de unión TID en $\text{Ca}_v\beta 2$ y de modular la densidad y función de los LTCC.

Breve descripción de los dibujos

[0017] Las características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada que se indica más adelante, a partir de los Ejemplos proporcionados con fines ilustrativos y no limitativos, y a partir de las figuras 1-9 adjuntas, en las cuales:

Figura 1: muestra un modelo de trabajo esquemático de la modulación de la semivida de los LTCC en condiciones basales (arriba a la izquierda), diseñadas (abajo a la izquierda) y patológicas (derecha).

Figura 2: muestra la identificación de un dominio de unión anteriormente desconocido en $\text{Ca}_v\beta 2$ (TID; SEQ ID NO:10), según se describe en el Ejemplo 1. (a, arriba) Representación esquemática de $\text{Ca}_v\beta 2$ [cuadro gris oscuro (dominio globular); línea de color gris claro (hélice superenrollada); cuadro gris claro (TID); negro (sitio de consenso Akt)]. (a, abajo) Estructura tridimensional de $\text{Ca}_v\beta 2$ (código PDB de $\text{Ca}_v\beta 2$: 1T3S²) donde la accesibilidad al disolvente del TID para una potencial interacción proteína-proteína se muestra en color gris claro; (b) cotransformación de doble híbrido en levadura: actividad b-galactosidasa (gris oscuro) en estrías de células de

levadura sobre una placa de cultivo, Hu=humano, Ms=*mus musculus*; las etiquetas muestran los plásmidos cebo y/o presa transformados en las células de levadura; y (c) ensayo de coimmunoprecipitación de clones positivos identificados. Se transfectaron células HEK293 y tSA-201 según se indica (n=4).

Figura 3: muestra los efectos de la mutagénesis dirigida en el sitio de unión TID y la estabilidad de Cav α 1.2 según se describe en el Ejemplo 1. a) Análisis de *Western blot* (izquierda) y mediciones de densitometría (derecha) de Cav α 1.2 y niveles de la proteína GAPDH de lisados de proteínas totales de células HEK293 transfectadas; b) cotransformación de doble híbrido en levadura: actividad b-galactosidasa (gris oscuro) en estrías de células de levadura sobre una placa de cultivo; las etiquetas muestran los plásmidos cebo y/o presa transformados en las células de levadura; (c) análisis de flujo de Ca²⁺ de células HEK293 transfectadas; (d) mediciones de corriente de Ca²⁺ en células tSA-201 transfectadas. Se transfectaron células HEK293 y tSA-201 según lo indicado. La degradación de la proteína Cav α 1.2 se produjo *in vitro* con hambre celular (eliminación del suero). Los niveles de proteínas se normalizaron a la GAPDH. (n=4). Los datos se muestran como las medias $\pm$ SEM; *, P<0,05, **, P<0,005; ***, P<0,001.

Figura 4: muestra los efectos de los péptidos en la estabilidad y función de la proteína Cav α 1.2 según lo descrito en el Ejemplo 2 y 3.

a) Análisis de *Western blot* de Cav α 1.2 y niveles de la proteína GAPDH de lisados de proteínas totales; b) flujos de Ca²⁺ intracelular; (c) modelado y acoplamiento molecular de un péptido (SEQ ID NO:2, gris oscuro) a la región TID (SEQ ID NO:10, gris claro) de Cav β 2; (d) análisis de *Western blot* de Cav α 1.2 y niveles de la proteína GAPDH de lisados de proteínas totales; (e) análisis confocales de cardiomiocitos adultos tratados con TAT-MP y TAT-*scramble* y teñidos con colorante di 8-ANEPPS. MP = SEQ ID NO:3, *scramble* = SEQ ID NO:11; (f) análisis de *Western blot* de Cav α 1.2 y niveles de la proteína GAPDH de lisados de proteínas totales de células HEK293 tratadas con dosis crecientes de MP; (g) mediciones de corriente de Ca²⁺ en células tSA-201 previamente transfectadas. Para los análisis de *Western blot*, las células HEK293 o tSA-201 se transfectaron o trataron según lo indicado. Los niveles de proteínas se normalizaron a la GAPDH. (n=4). Los datos se muestran como las medias $\pm$ SEM; *, P<0,05, **, P<0,005; ***, P<0,001. Los péptidos se seleccionan del grupo indicado en la Tabla 1.

Figura 5: muestra los efectos de la mutagénesis dirigida en el sitio de unión TID y la estabilidad de Cav α 1.2 según se describe en el Ejemplo 2. Análisis de *Western blot* de Cav α 1.2 y niveles de la proteína GAPDH de lisados de proteínas totales de células HEK293 transfectadas. La degradación de la proteína Cav α 1.2 se produjo *in vitro* con hambre celular (eliminación del suero). Las células HEK293 se transfectaron según lo indicado. Los niveles de proteínas se normalizaron a la GAPDH. (n=4).

Figura 6: muestra el potencial terapéutico del péptido mimético en un modelo genético de ratón de insuficiencia cardíaca conforme a lo descrito en el Ejemplo 4. (a, arriba) Diseño del estudio. Eco, ecocardiografía. (a, abajo) Acortamiento fraccional (%) determinando mediante ecocardiografía en ratones *knockout* pdk1 tratados con péptido mimético (TAT-MP) o *scramble* (TAT-*scramble*). (b) Análisis de *Western blot* de Cav α 1.2 y niveles de la proteína GAPDH de lisados de proteínas totales de homogeneizados de ventrículo izquierdo. Los niveles de proteínas se normalizaron a la GAPDH. (n=4) MP = SEQ ID NO:3, *scramble* = SEQ ID NO:11. Se inyectó tamoxifeno (TAM) y péptido a diario según lo indicado. Los niveles de proteínas se normalizaron a la GAPDH. Los datos se muestran como las medias $\pm$ SEM; *, P<0,05.

Figura 7: muestra el potencial terapéutico del péptido mimético en un modelo de ratón de miocardiopatía diabética. (a, arriba) Diseño del estudio. Eco, ecocardiografía. (a, abajo) Acortamiento fraccional (%) determinando mediante ecocardiografía en ratones tratados con estreptozocina (STZ) y péptido mimético (TAT-MP) o *scramble* (TAT-*scramble*). (n=10) (b) Análisis de *Western blot* y densitometría de Cav α 1.2 y niveles de la proteína GAPDH de lisados de proteínas totales de homogeneizados de ventrículo izquierdo. (c) Mediciones de corriente de Ca²⁺ en cardiomiocitos aislados de ratones tratados. (d, arriba) Contractilidad y (d, medio y abajo) mediciones transitorias sistólica y diastólica de Ca²⁺ en cardiomiocitos aislados de ratones tratados. Los cardiomiocitos se analizaron con ritmo distinto (Hz). MP = SEQ ID NO:3, *scramble* = SEQ ID NO:11. Los niveles de proteínas se normalizaron a la GAPDH. Se inyectó STZ y péptido a diario según lo indicado. Los datos se muestran como las medias $\pm$ SEM; *, P<0,05, **, P<0,005; ***, P<0,001.

Figura 8: muestra el potencial terapéutico del péptido mimético en un modelo cardíaco humano según se describe en el Ejemplo 6. (a) Análisis de *Western blot* de Cav α 1.2 y niveles de la proteína GAPDH de lisados de proteínas totales de cardiomiocitos (CM) diferenciados de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y previamente obtenidas de fibroblastos de la piel de individuos sanos. (n=4) Las células no se trataron o bien se trataron con un inhibidor de Akt. MP = SEQ ID NO:3, *scramble* = SEQ ID NO:11.

Figura 9: muestra el potencial terapéutico del péptido mimético en un modelo de síndrome hereditario de arritmia cardíaca (Brugada) según se describe en el Ejemplo 6. La densidad de corriente I_{Ca} se normalizó para la capacitancia celular. La mutación de Cav α 1.2 se produce en el sitio Q420E. Las células HEK293 se transfectaron según lo indicado. MP = SEQ ID NO:3 (n = 15 células/grupo). * p<0,05 frente a la referencia para los grupos MP.

Descripción detallada de la invención

[0018] La presente invención se refiere a un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, correspondiente al dominio de unión TID de la proteína diana Cav β 2.

[0019] La $\text{Ca}_v\beta 2$ es la subunidad beta-2 del canal de calcio tipo L que depende del voltaje, también conocida como *CACNB2* [gen ID 783 (*Homo sapiens*), gen ID 12296 (*Mus musculus*)].

[0020] El sitio de unión TID de la $\text{Ca}_v\beta 2$ (SEQ ID NO:10) era anteriormente desconocido y se ha revelado aquí como un dominio que desencadena la modulación de la semivida de la proteína $\text{Ca}_v\alpha 1.2$. En concreto, los péptidos que se unen al TID inducen un mecanismo molecular que incrementa la densidad y función de la proteína $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ en la membrana plasmática.

[0021] La importancia de identificar el sitio de unión exacto de la $\text{Ca}_v\beta 2$ (SEQ ID NO:10 Ile-Ser-Phe-Glu-Ala-Lys-Asp-Phe-Leu-His-Val-Lys-Glu-Lys-Phe-Asn-Asn-Asp-Trp-Trp-Ile-Gly-Arg-Leu-Val-Lys-Glu-Gly-Cys-Glu-Ile-Gly-Phe-Ile) y en concreto los aminoácidos (destacados en negrita en SEQ ID NO:10 Ile-Ser-Phe-**Glu-Ala-Lys-Asp**-Phe-Leu-His-Val-Lys-Glu-**Lys**-Phe-Asn-Asn-Asp-Trp-Trp-Ile-Gly-Arg-Leu-Val-**Lys-Glu**-Gly-Cys-**Glu**-Ile-Gly-Phe-Ile (SEQ ID NO:10) y descritos más ampliamente en el ejemplo 1) que son responsables del enlace iónico directo entre el TID en $\text{Ca}_v\beta 2$ y los péptidos activadores (SEQ ID NO: 1 a 9 y SEQ ID NO: 12 a 22) es ampliamente reconocida y permitió la identificación de péptidos miméticos que modulan la densidad y actividad del canal.

[0022] En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del péptido aislado de SEQ ID NO:10 como un dominio de unión a péptidos. En concreto, este dominio de unión a péptidos en $\text{Ca}_v\beta 2$ es relevante para la posterior optimización y desarrollo de péptidos miméticos novedosos o compuestos sintéticos que son más específicos para la unión al dominio TID en $\text{Ca}_v\beta 2$ y conducen a una modulación de la densidad y función de los LTCC.

[0023] En otro aspecto, la invención se refiere a péptidos miméticos (SEQ ID NO: 1 a 9 y SEQ ID NO:12 a 22) que se unen al dominio de unión a péptidos TID de la proteína $\text{Ca}_v\beta 2$ según la SEQ ID NO:10, actuando así en la densidad y función de los LTCC dependientes del voltaje.

[0024] En un aspecto preferido, la invención se refiere a un péptido aislado que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

A- Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-B (SEQ ID NO:1)

o

A- Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-B (SEQ ID NO:2)

o

Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp (SEQ ID NO:8), o Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO:9); o Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp (SEQ ID NO:21), o Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO:22),

donde:

A es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp-Gln-,

y B es una secuencia de aminoácidos que está presente opcionalmente, y en caso de estar presente se selecciona del grupo que consiste en: Arg-, Arg-Ser, Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys (SEQ ID NO:23), Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys (SEQ ID NO:24), Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys-Ser-Gln-His-Arg (SEQ ID NO:25), Arg-Ser-Gln, o Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro (SEQ ID NO:26).

TABLA 1

Número de péptido	SEQ ID NO:	secuencia de aminoácidos del péptido (código de tres letras)	secuencia de aminoácidos del péptido (código de una letra)
1	SEQ ID NO: 1	Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro	RPDRDAP
2	SEQ ID NO: 2	Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro	RPDREAP
3	SEQ ID NO: 3	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-Arg-Ser	DQRPDREAPRS
4	SEQ ID NO: 4	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-Arg	DQRPDREAPR
5	SEQ ID NO:5	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys	DQRPDREAPRSASQAEEEPC

ES 2 829 927 T3

Número de péptido	SEQ ID NO:	secuencia de aminoácidos del péptido (código de tres letras)	secuencia de aminoácidos del péptido (código de una letra)
6	SEQ ID NO: 6	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys	DQRPDREAPRSASQAEEEPCL EPVKK
7	SEQ ID NO: 7	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys-Ser-Gln-His-Arg	DQRPDREAPRSASQAEEEPCL EPV KKSQHR
8	SEQ ID NO:8	Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp	KQRDRHKEKD
9	SEQ ID NO:9	Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp	KQRDRHKDKD
10	SEQ ID NO:10	Ile-Ser-Phe-Glu-Ala-Lys-Asp-Phe-Leu-His-Val-Lys-Glu-Lys-Phe-Asn-Asn-Asp-Trp-Trp-Ile-Gly-Arg-Leu-Val-Lys-Glu-Gly-Cys-Glu-Ile-Gly-Phe-Ile	ISFEAKDFLHVKEKFNDWW IGRLVKEGCEIGFI
11	SEQ ID NO:11	Asp-Gln-Pro-Pro-Ser-Arg-Arg-Asp-Glu-Arg-Ala	DQPPSRRDERA
12	SEQ ID NO:12	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro	DQRPDREAPRSASQAEEEPCL EP
13	SEQ ID NO:13	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln	DQRPDREAPRSASQ
14	SEQ ID NO: 14	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-Arg-Ser	DQRPDREAPRS
15	SEQ ID NO: 15	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-Arg	DQRPDREAPR
16	SEQ ID NO:16	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys	DQRPDREAPRSASQAEEEPCL

Número de péptido	SEQ ID NO:	secuencia de aminoácidos del péptido (código de tres letras)	secuencia de aminoácidos del péptido (código de una letra)
17	SEQ ID NO: 17	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys	DQRPDRDAPRSASQAEEEEPCLEPVKK
18	SEQ ID NO: 18	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys-Ser-Gln-His-Arg	DQRPDRDAPRSASQAEEEEPCLEPVKKSQHR
19	SEQ ID NO:19	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro	DQRPDRDAPRSASQAEEEEPCLEP
20	SEQ ID NO:20	Asp-Gln-Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-Arg-Ser-Ala-Ser-Gln	DQRPDRDAPRSASQ
21	SEQ ID NO:21	Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp	KQRSRHKEKD
22	SEQ ID NO:22	Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp	KQRSRHKDKD
23	SEQ ID NO:23	Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys	RSQAEEEEPC
24	SEQ ID NO:24	Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys	RSQAEEEEPCLEPVKK
25	SEQ ID NO:25	Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys-Ser-Gln-His-Arg	RSQAEEEEPCLEPVKKKSQHR
26	SEQ ID NO:26	Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro	RSQAEEEEPCLEP

[0025] A efectos de la presente invención, cada péptido aislado tiene una SEQ ID NO. correspondiente, de acuerdo con la Tabla 1 anterior.

5 **[0026]** Los péptidos aislados de la presente invención presentan la secuencia de aminoácidos definida en la Tabla 1, en la que se utiliza el código de aminoácidos de una y tres letras de la IUPAC (esto es, Arg y R corresponden al aminoácido Arginina, Pro y P corresponden al aminoácido Prolina). Cada péptido tiene un número de péptido y una SEQ ID NO. correspondiente, como se ha indicado anteriormente en la Tabla 1.

[0027] Por consiguiente, el objeto de la invención es un grupo novedoso de péptidos de bajo peso molecular, que se pueden sintetizar químicamente.

[0028] Estos péptidos son de origen sintético y, por lo tanto, son fáciles de fabricar en grandes cantidades, y pueden ser modificados química o biológicamente o estar conjugados con otras porciones (esto es, vehículos).

5 [0029] Estos péptidos presentan las ventajas de ser de origen sintético y, por lo tanto, no tienen los inconvenientes observados en péptidos naturales, tales como la tendencia a inducir respuesta inflamatoria y transferencia de patógenos debido a factores indefinidos que no pueden ser eliminados mediante purificación antes de su implantación, el significativo grado de variabilidad entre distintos lotes y los problemas de disponibilidad de fuentes a gran escala.

10 [0030] En comparación con las proteínas/anticuerpos o incluso con pequeñas moléculas orgánicas, los péptidos según la presente invención ofrecen ventajas tales como: i) buena biocompatibilidad; ii) efectos secundarios reducidos debido a una toxicidad sistémica limitada o a interacciones fármaco-fármaco (p. ej., los productos de degradación son aminoácidos); iii) complicaciones secundarias reducidas (p. ej., menor acumulación en tejidos) debido a una semivida relativamente corta de los péptidos (o sus metabolitos); (además, la proteólisis se puede prevenir mediante modificaciones químicas); iv) por lo general, menor inmunogenicidad; v) potencialmente mayor penetración en tejidos debido a un tamaño menor; vi) buena eficacia, selectividad y especificidad y unión limitada fuera de la diana; vii) facilidad de síntesis y modificación química, libre de impurezas y productos secundarios; viii) bajos costes de producción.

15 [0031] Además, puesto que el sitio de unión al péptido terapéutico en la proteína diana se conoce y se expone en la SEQ ID NO:10, esto permite una mayor optimización del fármaco (esto es, diseño de fármacos para una selectividad aumentada).

[0032] En un aspecto adicional, la invención hace referencia a un péptido aislado, donde:

A- Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-B (SEQ ID NO:1)

o

A- Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-B (SEQ ID NO:2)

25 o

Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp (SEQ ID NO:8), o, Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO:9); o Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp (SEQ ID NO:21), o Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO:22),

donde:

30 A es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp-Gln-,

y

35 B es una secuencia de aminoácidos que está presente opcionalmente, y en caso de estar presente se selecciona del grupo que consiste en: Arg-, Arg-Ser, Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys (SEQ ID NO:23), Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys (SEQ ID NO:24), Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys-Ser-Gln-His-Arg (SEQ ID NO:25), Arg-Ser-Gln, o Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro (SEQ ID NO:26).

40 [0033] En un aspecto preferido, la invención se refiere a un péptido aislado según la invención, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22.

[0034] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 para la preparación de un medicamento.

45 [0035] Sorprendentemente, los péptidos de la presente invención han demostrado ser útiles en la preparación de un medicamento (Ejemplos 4, 5, 6 y 7).

50 [0036] En otra forma de realización adicional, la invención se refiere al uso de un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 para el tratamiento de afecciones que presentan una densidad alterada de los LTCC (Ejemplos 4, 5, 6 y 7).

55 [0037] En general, los péptidos de la invención pueden ser útiles en cualquier situación que implique afecciones que presentan una densidad alterada de los LTCC o en aquellas afecciones donde sea preferible una intervención para la modulación de la densidad de los LTCC o la concentración de Ca^{2+} intracelular. Dichas afecciones pueden producirse como resultado de trastornos genéticos y/o metabólicos, y/u otras enfermedades y/o afecciones.

[0038] Los péptidos de la invención tienen como objetivo aumentar la densidad de las proteínas de los LTCC al ampliar la semivida del canal de calcio a través de un mecanismo que depende de la unión de los péptidos a un dominio expuesto a disolvente (TID, SEQ ID NO:10) en la proteína $\text{Ca}_v\beta_2$, subunidad de los LTCC.

[0039] Se pueden utilizar determinados péptidos de la presente invención para mitigar los efectos de enfermedades tales como una patología cardíaca.

[0040] En un aspecto preferido, la invención se refiere al uso de un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 donde dichas afecciones que presentan una densidad y una función alteradas de los LTCC son problemas cardiovasculares seleccionados del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca, reducción de la contracción miocárdica, fibrilación, miocardiopatía diabética, miocardiopatía dilatada, trastornos de base genética (esto es, canalopatías como el síndrome de Brugada, síndrome de Timothy, síndrome de QT corto), hipertrofia cardíaca, hipotensión, hipertiroidismo, hipotiroidismo, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, infarto de miocardio.

[0041] En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, donde dichas afecciones que presentan una densidad y una función alteradas de los LTCC son afecciones oftalmológicas seleccionadas del grupo que consiste en la transparencia del cristalino y una presión intraocular alterada.

[0042] En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, donde dichas afecciones que presentan una densidad y una función alteradas de los LTCC son afecciones neurológicas seleccionadas del grupo que consiste en demencia vascular, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad por priones y parálisis periódica hipocalémica.

[0043] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o varios péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0044] Entre los ejemplos de excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, agentes de suspensión o dispersantes, tensioactivos, agentes isotónicos, espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes, etc., nanopartículas, ácidos nucleicos (esto es, aptámeros), moléculas o péptidos de penetración celular, según sea conveniente para la forma de administración y dosificación concretas.

[0045] La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede ser para administración enteral y parenteral (esto es, intravenosa, intraperitoneal, oral, sublingual, de aerosol, de inhalación, de pulverización, rectal, intraocular, tópica o transdérmica).

[0046] En otro aspecto, la invención se refiere a un método de cribado de un péptido u otra molécula sintética que se une a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, comprendiendo las etapas de:

a) transfectar una célula de mamífero con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10;

b) poner en contacto dicha célula de mamífero con un compuesto de detección;

c) detectar la unión del compuesto de detección a la célula de mamífero;

o

d) cribado virtual de alto rendimiento de una base de datos de biblioteca de compuestos para identificar péptidos o moléculas de estructura química novedosa que se unen a la diana macromolecular $\text{Ca}_v\beta_2$ que comprende la SEQ ID NO:10;

o

e) diseño de fármacos asistido por ordenador de compuestos que se unen a la diana macromolecular $\text{Ca}_v\beta_2$ que comprende la SEQ ID NO:10.

EJEMPLOS

[0047] Los resultados que se indican a continuación fueron parcialmente financiados por Fondazione Cariplo (n.º de concesión 2008.2504).

Ejemplo 1.**Identificación de un dominio de unión anteriormente desconocido en Cavβ2 (TID; SEQ ID NO:10)**

[0048] Nuestros anteriores hallazgos *in vitro* mostraron que una fosforilación de Cavβ2 dependiente de Akt, ya sea directamente a través de la quinasa o mediante la introducción de una mutación fosfomimética de Akt (Ser a Glu, Cavβ2-SE) en el sitio de consenso Akt del ADNc de Cavβ2, era suficiente para mejorar la semivida de Cavα1.2 (y, por lo tanto, de los LTCC) y, por consiguiente, la gestión del Ca²⁺ intracelular y la contractilidad de los cardiomiocitos (Figura 1)³. Basándonos en esta evidencia, se diseñaron experimentos para determinar la secuencia de eventos estructurales y moleculares que conectan la fosforilación mediada por Akt de Cavβ2 con la inhibición de la degradación de Cavα1.2. Como primer paso, investigamos si tras la fosforilación con Akt, Cavβ2 atrae colaboradores de interacción adicionales para inhibir la degradación de Cavα1.2. Se realizó un cribado de doble híbrido en levadura utilizando ADNc de Cavβ2 fosfomimético de Akt (Cavβ-SE) como cebo y bibliotecas de expresión de ADNc de corazón de humano o ratón como presas. Notablemente, varios clones positivos correspondían a Cavβ2 en una región que pertenece al dominio globular (Figura 2a,b), mientras que no se encontraron clones de Cavβ2 cuando se repitió el ensayo con un cebo de Cavβ2-WT silvestre. Los análisis de coimmunoprecipitación de lisados obtenidos de células HEK293 cotransfectadas con los clones de Cavβ2-SE cebo y Cavβ2 presa de ratón o humano confirmaron la especificidad de la interacción (Figura 2c). Por último, cuando se alinearon las secuencias de aminoácidos de los clones positivos identificados (Figura 2a, arriba) y se analizó la accesibilidad al disolvente (Figura 2a, abajo), identificamos una región común mínima que potencialmente se une a la región C-terminal de Cavβ2, que denominamos dominio de interacción Tail (TID; SEQ ID NO:10).

[0049] Para evaluar si el TID desempeña una función directa en el mecanismo molecular que protege a Cavα1.2 de la degradación de proteínas, utilizamos mutagénesis dirigida para sustituir lisinas (K) cargadas positivamente en las posiciones 6, 14 y 26 en la secuencia TID (SEQ ID NO:10) por glutaminas (Q) para destruir cualquier interacción iónica potencial entre el dominio de unión y la hélice superenrollada. Mientras que la cotransfección de las células HEK293 con Cavα1.2 y Cavβ2-SE dio como resultado unos niveles no alterados de la proteína Cavα1.2 cuando el Akt no estaba activado (esto es, tras la eliminación del suero), la introducción de la mutación de sitio K26Q en TID afectó notablemente al efecto protector (Figura 3a, panel derecho). Se obtuvieron resultados similares, aunque en distinta medida, cuando se mutaron los otros aminoácidos en el TID (Figura 3a, panel derecho). Un ensayo de doble híbrido en levadura con Cavβ2-SE como cebo y la Cavβ2 mutada de K26Q como presa no mostró interacción, confirmando el papel directo de K26 en la SEQ ID NO:10 para la interacción (Figura 3b). Posteriormente, se utilizó un ensayo de fluorescencia de Ca²⁺ para analizar el flujo de Ca²⁺ intracelular mediado por los LTCC. La cotransfección de Cavα1.2 con cualquiera de los constructos de Cavβ2-SE mutados derivó en una reducción significativa del flujo de Ca²⁺ tras la eliminación del suero, hasta un nivel que era similar al de la condición de control (Figura 3c). Además, las mediciones de I_{Ca} mostraron una reducción significativa de la corriente cuando las células tSA-201 se transfectaron con Cavβ2-SE-K26Q en comparación con Cavβ2-SE (Figura 3d).

Ejemplo 2.**Los péptidos miméticos (MP) afectan a la estabilidad y función *in vitro* de las proteínas de los LTCC**

[0050] Basándonos en las evidencias mostradas en el ejemplo 1, investigamos a continuación si los péptidos miméticos (MP) podrían recapitular el mecanismo mediante el cual se protegen los LTCC de la degradación de proteínas uniéndose al dominio TID. Así, transfectamos células HEK293 con una matriz de péptidos parcialmente solapados (longitud de 7 a 25 aminoácidos) pertenecientes a la región terminal de hélice superenrollada de Cavβ2 y posteriormente se realizó un *Western blot* (Figura 4a) y mediciones de Ca²⁺ intracelular (Figura 4b), identificando diversos péptidos que, en distintas medidas, eran eficaces para proteger la estabilidad y la función de las proteínas de los LTCC tras la eliminación del suero. No se hallaron evidencias de apoptosis significativa (Figura 4a).

[0051] Mediante simulación de acoplamiento computacional, analizamos la capacidad de los MP identificados para reconocer la región TID y pronosticamos que los MP reconocen más específicamente la región TID mediante la interacción directa con el residuo de lisina K26 y la formación de interacciones electrostáticas entre dos residuos de arginina y regiones con carga negativa del núcleo funcional de la Cavβ2 (Figura 4c). En este sentido, unos análisis adicionales de mutagénesis dirigida en Cavβ2 apoyaron de forma complementaria esta predicción y consideraron relevantes a E4, D7, E27 y E30 en la SEQ ID NO:10 para la unión MP-TID (Figura 5). La especificidad del MP seleccionado (SEQ ID NO:3) se confirmó posteriormente *in vitro*, ya que el efecto protector del MP seleccionado en Cavα1.2 se perdió completamente cuando mutaciones concretas en el MP o bien en Cavα1.2 suprimieron la interacción prevista entre MP y TID (Figura 4d).

Ejemplo 3.**El MP modificado penetra en la membrana plasmática y afecta a la función *in vitro* de los LTCC**

[0052] Para facilitar la absorción intracelular, se conjugó un péptido de penetración celular (CPP) con el MP (SEQ ID NO:3). Para superar cualquier potencial impedimento estérico que pudiera tener un CPP al fusionarse con el MP, evaluamos nuestro modelo tridimensional Cavβ2-MP (Figura 4d) y pronosticamos que el N-terminal del MP sería una región adecuada para la fusión con el CCP. Por lo tanto, se utilizó el transactivador de la transcripción (TAT) del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1). Al administrarse a cardiomiocitos aislados, se demostró que este derivado de penetración celular del péptido MP (TAT-MP) se colocaliza específicamente con los LTCC (Figura 4e), protege a Cavα1.2 de la degradación de proteínas (Figura 4f) y conserva la corriente de Ca²⁺ (Figura 4g) tras la eliminación del

suero. En cambio, ninguno de estos efectos se observó al utilizar un péptido *scramble*. TAT-MP = SEQ ID NO:3; TAT-*scramble* = *scramble* = SEQ ID NO:11.

Ejemplo 4.

Potencial terapéutico de péptidos miméticos (modelo genético de ratón de insuficiencia cardíaca)

5 [0053] Para explorar el potencial terapéutico *in vivo*, el MP se utilizó en un *knockout* inducible y específico cardíaco de la quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1), el activador aguas arriba de las tres isoformas de Akt. Como se ha indicado anteriormente³, la delección de PDK1 mediante inyección de tamoxifeno dio como resultado una reducción de la función cardíaca según lo evaluado mediante análisis ecocardiográfico. A continuación, tratamos a los ratones con MP de penetración celular o bien péptidos *scramble* y seguimos el fenotipo durante los siguientes días. Mientras que los animales tratados con *scrambles* mostraron un deterioro progresivo de la función del ventrículo izquierdo, los animales 10 tratados con MP mostraron una significativa atenuación del deterioro de la función cardíaca que correspondía a un restablecimiento de los niveles de proteínas de los LTCC (Figura 6). MP = SEQ ID NO:3; TAT-*scramble* = *scramble* = SEQ ID NO:11.

Ejemplo 5.

Potencial terapéutico de péptidos miméticos (miocardiopatía diabética)

15 [0054] Para seguir explorando la potencial aplicación terapéutica, evaluamos los efectos de la TAT-MP en un modelo de ratón de miocardiopatía en el que la densidad de los LTCC y, por consiguiente, la contractilidad cardíaca, está disminuida (esto es, miocardiopatía diabética, DM). Las alteraciones en la señalización de Ca^{2+} en las células del músculo cardíaco son un sello distintivo de la DM. Los defectos identificados en la actividad mecánica de los corazones 20 de animales diabéticos se atribuyen a una reducción de I_{Ca} , una disminución del Ca^{2+} sistólico y un alargamiento del Ca^{2+} sistólico transitorio, principalmente como resultado de la disfunción del RS. Para inducir la DM, se les inyectó estreptozotocina (STZ) a los ratones, un compuesto que es tóxico para las células beta del páncreas que producen insulina (Figura 7). En consonancia con los efectos de la señalización de insulina/Akt en los LTCC, la disfunción cardíaca en ratones DM se asoció a niveles reducidos de la proteína $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ en ratones DM en comparación con los 25 ratones de control (Figura 7b). Curiosamente, tras 4 días de tratamiento de los ratones DM con TAT-MP (MP = SEQ ID NO:3), se restableció casi completamente la función cardíaca (Figura 7a), mientras que no se obtuvieron efectos cuando se administró el vehículo o la TAT-*scramble* (*scramble* = SEQ ID NO:11). Además, los análisis funcionales de cardiomiocitos aislados de los mismos ratones tratados revelaron que la TAT-MP restableció la I_{Ca} así como la contractilidad celular y las amplitudes del Ca^{2+} sistólico (figuras 7c,d).

Ejemplo 6.

Potencial terapéutico de péptidos miméticos (modelo cardíaco humano)

30 [0055] Para perseguir el potencial terapéutico cardíaco de MP, empleamos un modelo cardíaco humano que se basa en cardiomiocitos (CM) diferenciados de las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y derivados previamente de fibroblastos de la piel de individuos sanos⁴. Los iPSC-CM sometidos a un inhibidor de Akt mostró una disminución de los 35 niveles de proteínas $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ que se impidió cuando las células se cotrataron con MP (MP = SEQ ID NO:3) (Figura 8a). En cambio, no se obtuvieron efectos de rescate al utilizar un péptido *scramble*. Sobre esta base, llevamos a cabo a continuación análisis funcionales y examinamos las propiedades de gestión de Ca^{2+} en los grupos de latidos (BC) de iPSC-CM. Mientras que la administración del inhibidor de Akt a los BC mostró una ralentización significativa del desarrollo transitorio de Ca^{2+} , indicando una alteración entre la actividad LTCC y la liberación provocada de Ca^{2+} del 40 retículo sarcoplasmático, la administración de MP resultó suficiente para reducir este retraso (Figura 8b, c). En cambio, no se observaron efectos cuando los BC se cotrataron con *scramble*.

Ejemplo 7.

Potencial terapéutico de péptidos miméticos (enfermedad hereditaria de arritmia cardíaca, esto es, síndrome de Brugada)

45 [0056] Analizar si el potencial uso terapéutico del TAT-MP (MP = SEQ ID NO:3) también puede ejercer un efecto corrector en condiciones de pacientes afectados por el síndrome de Brugada (BrS) y que son portadores de mutaciones de pérdida de función en el gen *CACNA1C* que codifica la subunidad $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ de los LTCC. El BrS es una enfermedad arritmogénica hereditaria que se calcula que representa un 20 % de las muertes súbitas en pacientes jóvenes que, por lo demás, presentan un corazón normal. Por lo tanto, investigamos si la pérdida de función en los LTCC provocada por 50 mutaciones con cambio de sentido (esto es, la sustitución de la glutamina en la posición 428 por un ácido glutámico hallada en un paciente de 32 años de edad diagnosticado tras un paro cardíaco ocurrido en reposo) en el gen *CACNA1C* identificado en pacientes con BrS podría invertirse mediante la administración de TAT-MP. Las corrientes de membrana se midieron utilizando procesos de fijación de voltaje en parches de membrana de célula entera para obtener la relación corriente-voltaje (I-V). Las relaciones corriente-voltaje (I-V) entre WT y Q428E mostraron que las amplitudes 55 de corriente se redujeron significativamente en comparación con la WT (Figura 8). El tratamiento de las células que expresan la $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ mutante con TAT-MP revirtió casi por completo el fenotipo de pérdida de corriente inducido por la mutación de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$.

[0057] A partir de la descripción anterior y los ejemplos indicados anteriormente, resulta evidente la ventaja lograda por el producto descrito y obtenido de acuerdo con la presente invención.

REFERENCIAS

[0058]

- 5 1 Catterall, W. A. Voltage-gated calcium channels. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3, a003947, doi:10.1101/cshperspect.a003947 (2011).
- 2 Opatowsky, Y., Chen, C. C., Campbell, K. P. & Hirsch, J. A. Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. Neuron 42, 387-399 (2004).
- 10 3 Catalucci, D. *et al.* Akt regulates L-type Ca²⁺ channel activity by modulating Cavalpha1 protein stability. The Journal of cell biology 184, 923-933, doi:10.1083/jcb.200805063 (2009).
- 4 Di Pasquale, E. *et al.* CaMKII inhibition rectifies arrhythmic phenotype in a patient-specific model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Cell death & disease 4, e843, doi:10.1038/cddis.2013.369 (2013).

LISTA DE SECUENCIAS

[0059]

<110> CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

<120> PÉPTIDOS MIMÉTICOS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES QUE PRESENTAN UNA DENSIDAD ALTERADA DE LOS CANALES DE CALCIO TIPO L

20 <130> 12861PTWO

<150> ITMI2014A000097

<151> 2014-01-24

<160> 26

<170> BiSSAP 1.3

25 <210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

30 Arg Pro Asp Arg Asp Ala Pro
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 2

Arg Pro Asp Arg Glu Ala Pro
1 5

40 <210> 3

<211> 11

<212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<400> 3

45 Asp Gln Arg Pro Asp Arg Glu Ala Pro Arg Ser
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Glu Ala Pro Arg
1 5 10

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Glu Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln Ala Glu
1 5 10 15
Glu Glu Pro Cys
20

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Glu Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln Ala Glu
1 5 10 15
Glu Glu Pro Cys Leu Glu Pro Val Lys Lys
20 25

<210> 7

<211> 30

<212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Glu Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln Ala Glu
1 5 10 15
Glu Glu Pro Cys Leu Glu Pro Val Lys Lys Ser Gln His Arg
20 25 30

<210> 8

<211> 10

<212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Gln Arg Asp Arg His Lys Glu Lys Asp
1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<400> 9

Lys Gln Arg Asp Arg His Lys Asp Lys Asp
1 5 10

<210> 10

<211> 34

<212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 829 927 T3

Ile Ser Phe Glu Ala Lys Asp Phe Leu His Val Lys Glu Lys Phe Asn
 1 5 10 15
 Asn Asp Trp Trp Ile Gly Arg Leu Val Lys Glu Gly Cys Glu Ile Gly
 20 25 30
 Phe Ile

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Secuencia *scramble*
 <400> 11

Asp Gln Pro Pro Ser Arg Arg Asp Glu Arg Ala
 1 5 10

<210> 12
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Glu Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln Ala Glu
 1 5 10 15
 Glu Glu Pro Cys Leu Glu Pro
 20

<210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Glu Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln
 1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Asp Ala Pro Arg Ser
 1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Asp Ala Pro Arg
 1 5 10

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Asp Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln Ala Glu
 1 5 10 15
 Glu Glu Pro Cys
 20

<210> 17
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Asp Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln Ala Glu
 1 5 10 15
 Glu Glu Pro Cys Leu Glu Pro Val Lys Lys
 20 25

<210> 18
 <211> 30
 <212> **PRT**
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Asp Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln Ala Glu
 1 5 10 15
 Glu Glu Pro Cys Leu Glu Pro Val Lys Lys Ser Gln His Arg
 20 25 30

<210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Asp Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln Ala Glu
 1 5 10 15
 Glu Glu Pro Cys Leu Glu Pro
 20

<210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

Asp Gln Arg Pro Asp Arg Asp Ala Pro Arg Ser Ala Ser Gln
 1 5 10

<210> 21
 <211> 10
 <212> **PRT**
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

Lys Gln Arg Ser Arg His Lys Glu Lys Asp
 1 5 10

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

ES 2 829 927 T3

Lys Gln Arg Ser Arg His Lys Asp Lys Asp
1 5 10

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23

Arg Ser Gln Ala Glu Glu Glu Pro Cys
1 5

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24

Arg Ser Gln Ala Glu Glu Glu Pro Cys Leu Glu Pro Val Lys Lys
1 5 10 15

```
<210> 25
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25
```

Arg Ser Gln Ala Glu Glu Glu Pro Cys Leu Glu Pro Val Lys Lys Ser
1 5 10 15
Gln His Arg

```
<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26
```

Arg Ser Gln Ala Glu Glu Glu Pro Cys Leu Glu Pro
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.
2. Péptido aislado según la reivindicación 1, para su uso como un dominio de unión a péptidos.
3. Péptido aislado, que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - 5 A- Arg-Pro-Asp-Arg-Glu-Ala-Pro-B (SEQ ID NO:2)
 - o
 - A- Arg-Pro-Asp-Arg-Asp-Ala-Pro-B (SEQ ID NO:1)
 - o
- 10 Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp (SEQ ID NO:8), o Lys-Gln-Arg-Asp-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO:9);
 o Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Glu-Lys-Asp (SEQ ID NO:21), o Lys-Gln-Arg-Ser-Arg-His-Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO:22),
 donde:
 - A es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Asp-Gln-,
 - y
 - 15 B es una secuencia de aminoácidos que está presente opcionalmente, y en caso de estar presente se selecciona del grupo que consiste en: Arg-, Arg-Ser, Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys (SEQ ID NO:23), Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys (SEQ ID NO:24), Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro-Val-Lys-Lys-Ser-Gln-His-Arg (SEQ ID NO:25), Arg-Ser-Gln, o Arg-Ser-Gln-Ala-Glu-Glu-Glu-Pro-Cys-Leu-Glu-Pro (SEQ ID NO:26).
- 20 4. Péptido aislado según la reivindicación 3, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22.
- 25 5. Uso de un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 para la preparación de un medicamento.
- 30 6. Péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 para su uso en el tratamiento de afecciones que presentan una densidad y una función alteradas de los LTCC, donde dichas afecciones que presentan una densidad y una función alteradas de los LTCC son disfunciones cardiovasculares seleccionadas del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca, reducción de la contracción miocárdica, fibrilación, miocardiopatía diabética, síndrome de Brugada, síndrome de Timothy, síndrome de QT corto,
- 35 hipertrofia cardíaca, miocardiopatía dilatada, hipotensión, hipertiroidismo, hipotiroidismo, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, infarto de miocardio.
7. Uso según la reivindicación 6, donde dichas afecciones que presentan una densidad y una función alteradas de los LTCC son afecciones oftalmológicas seleccionadas del grupo que consiste en la transparencia del cristalino y una presión intraocular alterada.
- 40 8. Uso según la reivindicación 6, donde dichas afecciones que presentan una densidad y una función alteradas de los LTCC son afecciones neurológicas seleccionadas del grupo que consiste en demencia vascular, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad por priones y parálisis periódica hipocalémica.
- 45 9. Composición farmacéutica que comprende uno o varios péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable, para administración enteral y parenteral, por vía intravenosa, intraperitoneal, oral, sublingual, de aerosol, de inhalación, de pulverización, rectal, intraocular, tópica o transdérmica).
- 50 10. Método de cribado de un péptido o molécula sintética que se une a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 comprendiendo las etapas de:
 - a) transfectar una célula de mamífero con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10;
 - b) poner en contacto dicha célula de mamífero con un compuesto de detección;
 - c) detectar la unión del compuesto de detección a la célula de mamífero;

o

d) cribado virtual de alto rendimiento de una base de datos de biblioteca de compuestos para identificar péptidos o moléculas de estructura química novedosa que se unen a la diana macromolecular $\text{Ca}_v\beta 2$ que consiste en SEQ ID NO:10;

5

o

e) diseño de fármacos asistido por ordenador de compuestos que se unen a la diana macromolecular $\text{Ca}_v\beta 2$ que consiste en SEQ ID NO:10.

FIGURA 1

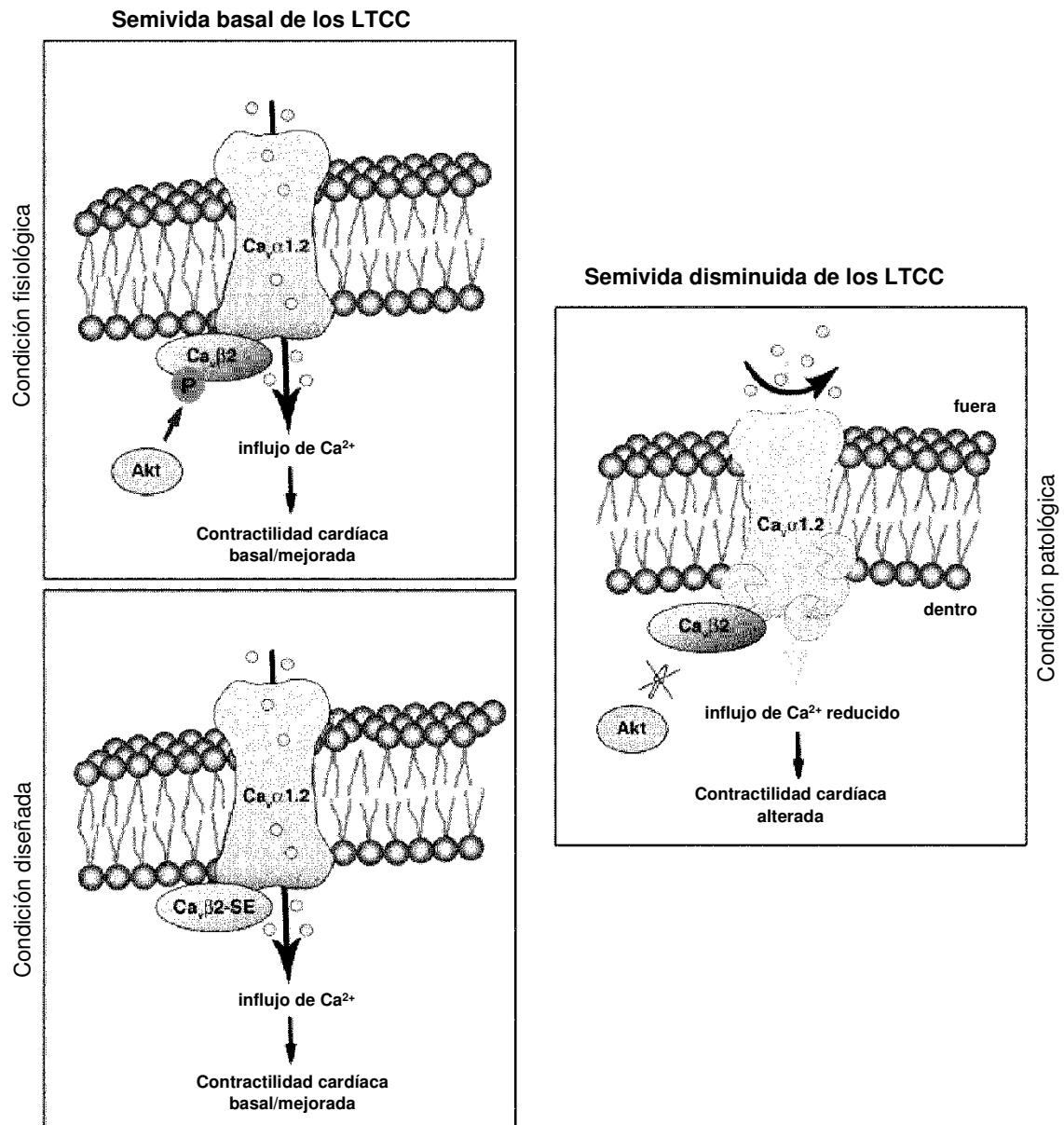
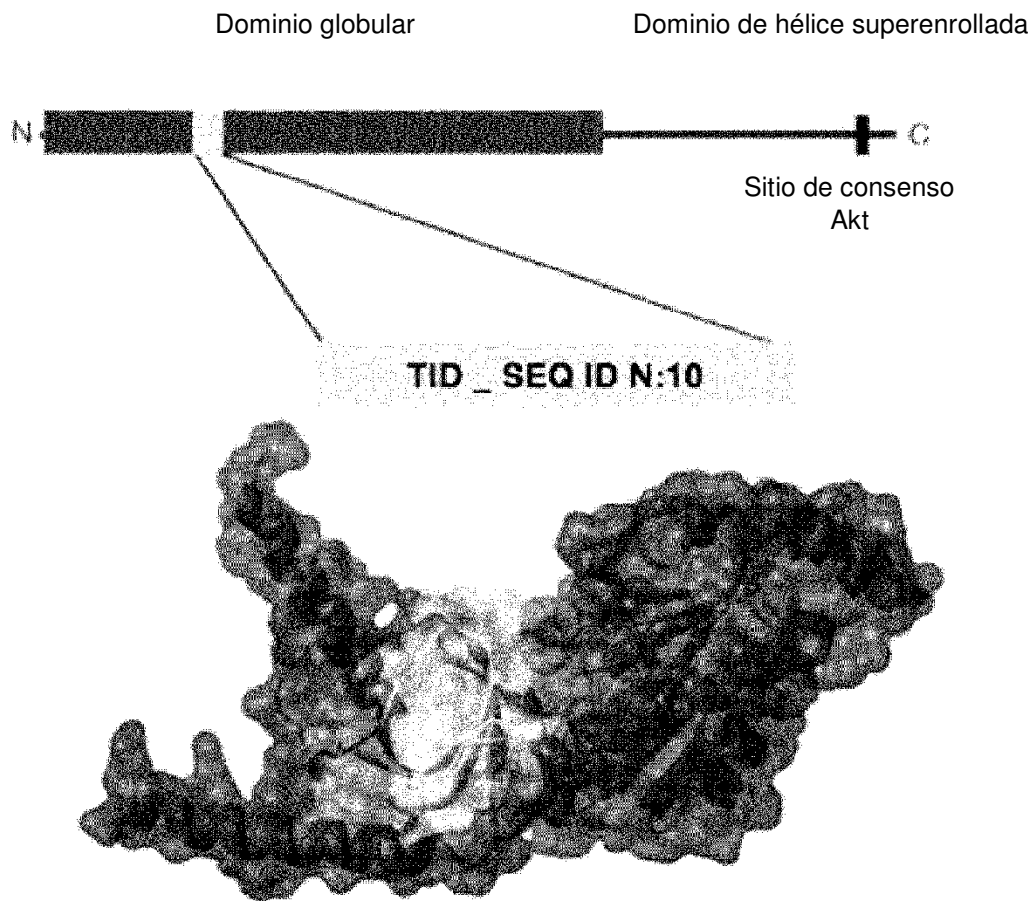
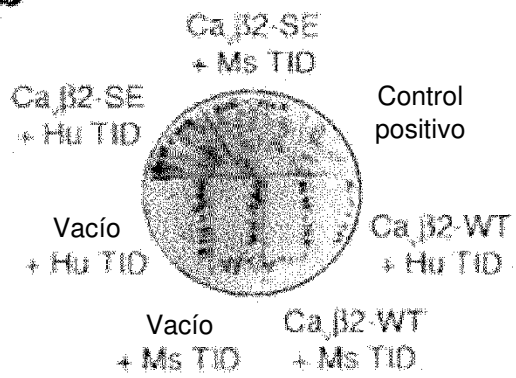


FIGURA 2

a



b



c

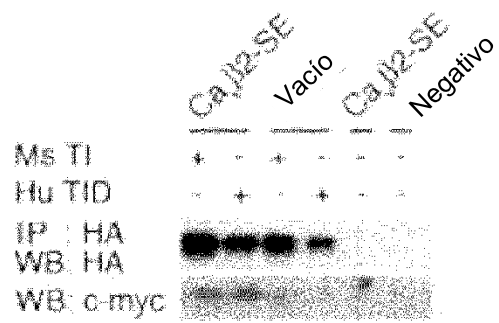


FIGURA 4

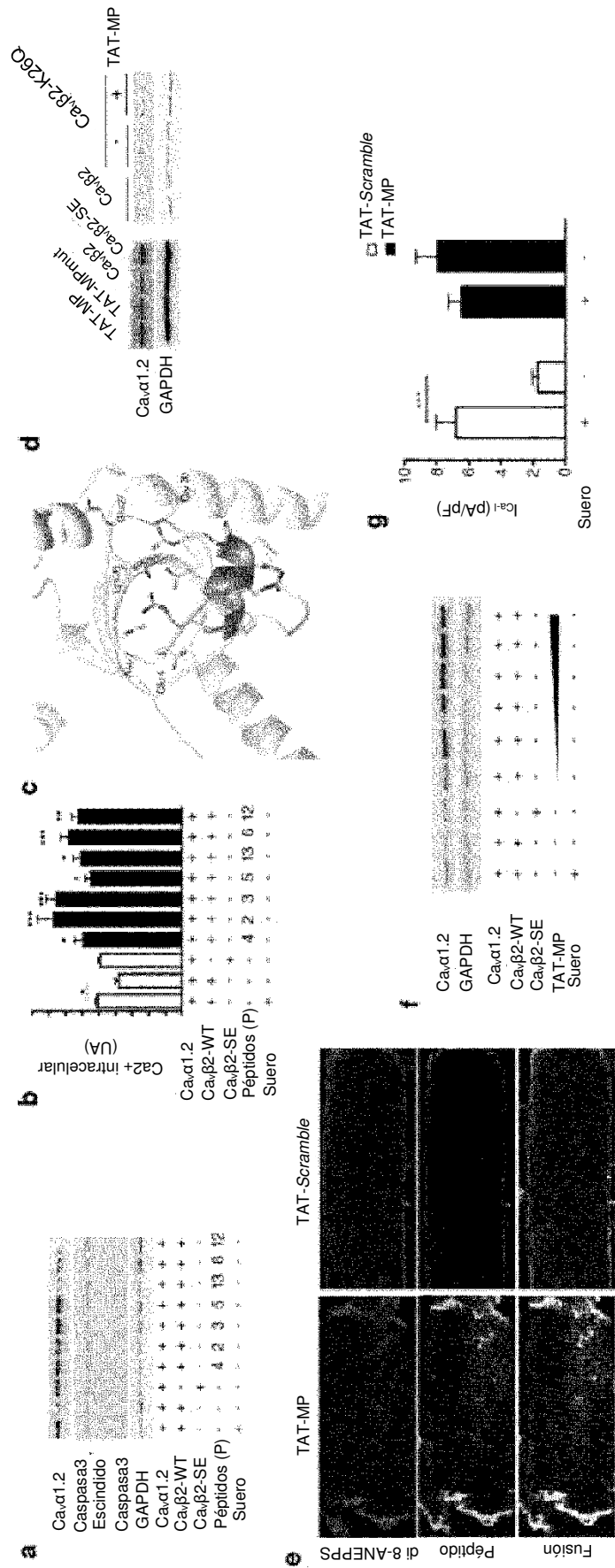
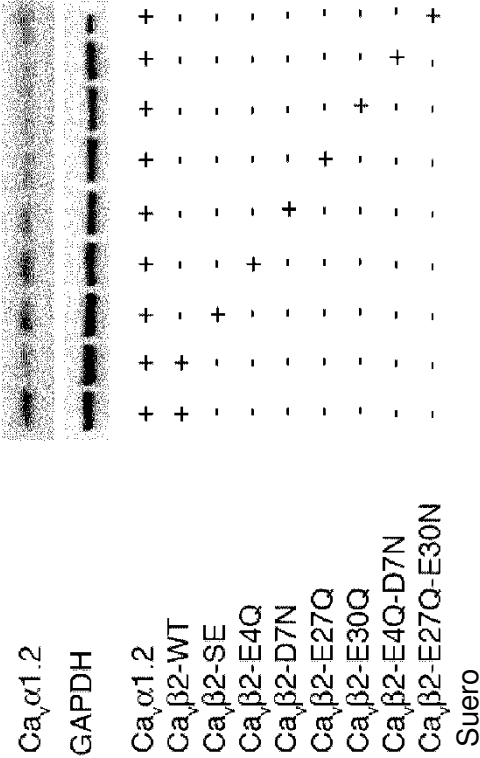


FIGURA 5



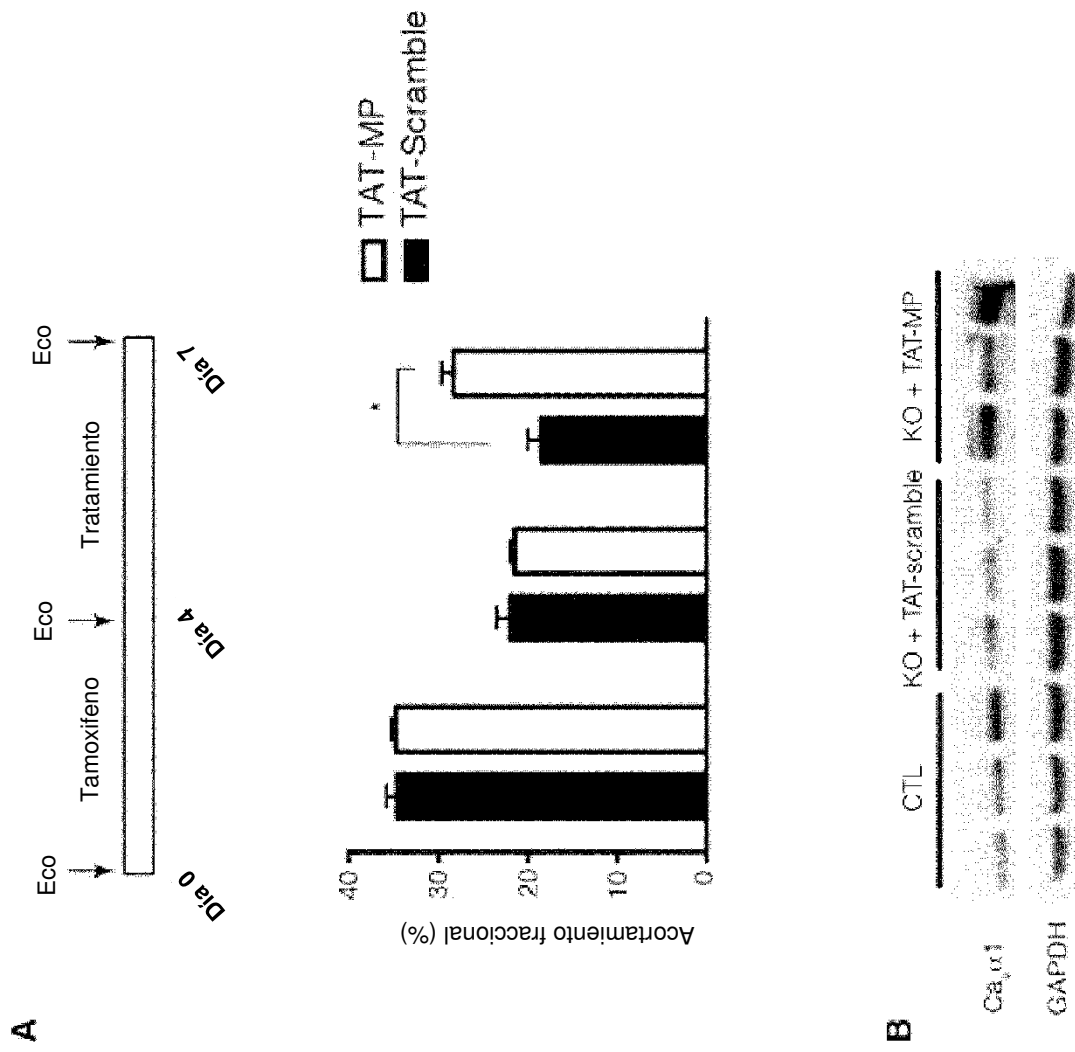


FIGURA 6

FIGURA 7

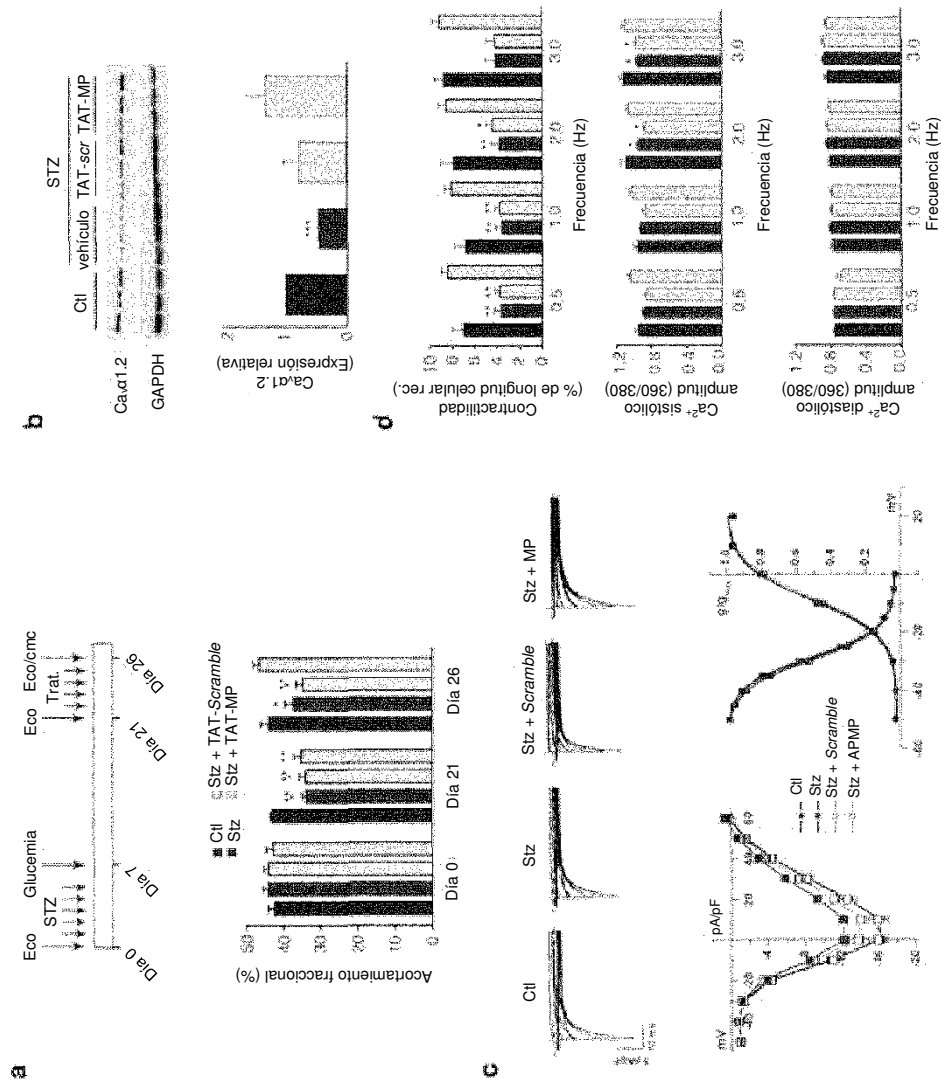


FIGURA 8

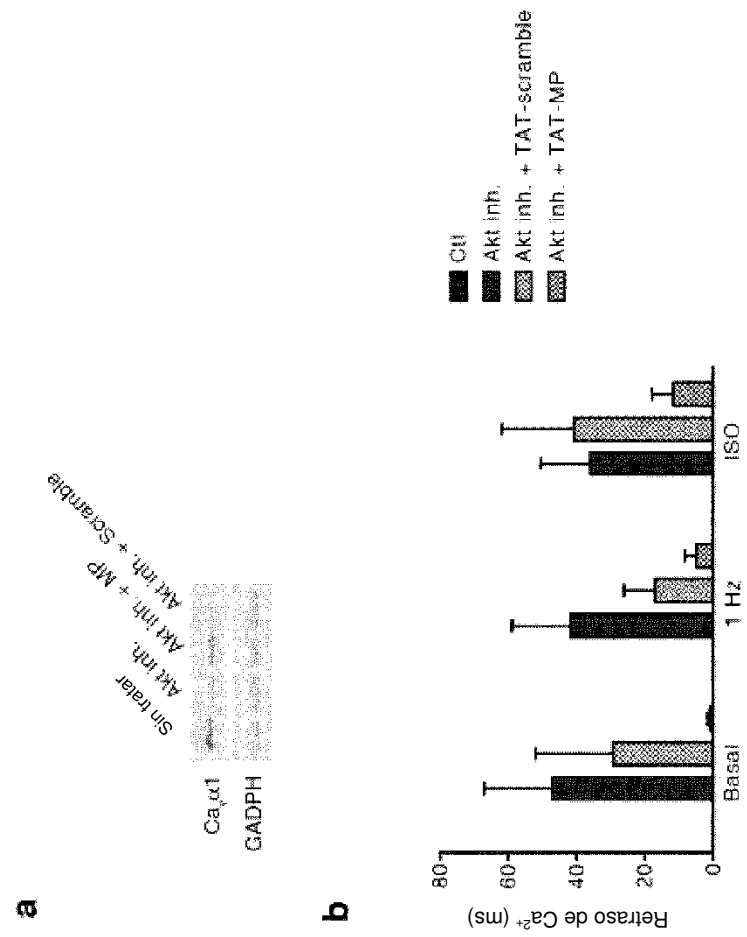


FIGURA 9

