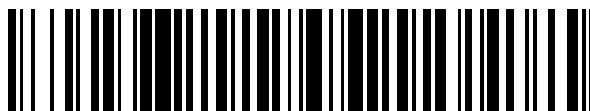


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 836**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 1/06 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2008 E 08783634 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2322541**

54 Título: **Polipéptidos inhibidores competitivos de proteína GQ, procedimientos de preparación y usos de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2013

73 Titular/es:

**LI, XIAOHUI (25.0%)
30 Gaotanyan Street Shaping District
Chongqing 400038, CN;
THIRD MILITARY MEDICAL UNIVERSITY (25.0%);
CHONGQING ZHAOKANGLIHUI MEDITECH CO.,
LTD (25.0%) y
CHONGQING QINGYANG PHARMACEUTICAL
CO., LTD (25.0%)**

72 Inventor/es:

**ZHANG, HAIGANG;
ZHOU, JIANZHI;
LI, SHUHUI y
LI, XIAOHUI**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 427 836 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

Polipéptidos inhibidores competitivos de proteína Gq, procedimientos de preparación y usos de los mismos

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido. Más particularmente, la presente invención se refiere a un péptido inhibidor competitivo contra la subunidad α de la proteína Gq. La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar el polipéptido, a una formulación que comprende el polipéptido y a la utilización del polipéptido en la fabricación de un fármaco para revertir la remodelación miocárdica.

10 Antecedentes de la invención

La remodelación miocárdica (es decir, conocida habitualmente como hipertrofia miocárdica) se refiere al síntoma en el que los cardiocitos se encuentran en cantidad constante pero aumentan de volumen. Es una respuesta orquestada de los cardiocitos a diversos estímulos patológicos y puede ser el resultado de estimulación con inducciones hemorreológicas tales como hipertensión, valvulopatía, infarto agudo de miocardio, cardiopatía congénita y aumento inducido por el ejercicio de la carga de presión así como sustancias endocrinas humorales tales como endotelina, angiotensina II, catecolaminas, factor de crecimiento transformante β , interleuquina-1, que tienen de este modo una tasa de morbilidad extremadamente alta^[1]. Solamente para la hipertensión en solitario, la tasa de morbilidad es del 15-20% en Occidente. Aunque la tasa es ligeramente inferior en China, el número de pacientes supera los 150 millones. La hipertrofia miocárdica puede ofrecer cierta compensación en la fase inicial del síntoma. A medida que la afección avanza, la hipertrofia miocárdica puede conducir a una función cardiaca alterada a través de anomalías tales como reorganización deficiente de las fibras miocárdicas y disfunción contráctil cardiaca y similares, y ésta puede desarrollarse adicionalmente a insuficiencia cardiaca. La hipertrofia miocárdica es un contribuyente principal a la mortalidad, dado que promueve la insuficiencia cardiaca que, a su vez, causa la muerte. Por lo tanto, la exploración de un fármaco específico eficaz en el tratamiento y el control de la hipertrofia miocárdica es no solamente el asunto y un punto caliente de la investigación al que se enfrentan los científicos, sino también una preocupación de salud pública fundamental que requiere una solución inmediata en todo el globo.

Hasta la fecha, no ha habido ningún fármaco terapéutico en clínica específico para tratar hipertrofia miocárdica, principalmente debido a sus múltiples causas etiológicas y complejo mecanismo subyacente. Estudios de investigación han demostrado que la estimulación de estiramiento causada por cambios hemorreológicos o la estimulación por una sustancia endocrina humoral (que son causalidad recíproca en la enfermedad) pueden inducir respuestas patológicas, tales como hipertrofia miocárdica, fibrosis intersticial, etc., casi todas a través de los eventos de transducción de señales de receptor y post-receptor^[2]. En base a dicho descubrimiento, se intentaron terapias dirigidas a las causas etiológicas para hipertrofia miocárdica utilizando un antagonista de endotelina, un fármaco hipotensor, un inhibidor de angiotensina convertasa, etc., que demostraron ser algo eficaces. Sin embargo, dado que muchos factores y receptores están implicados en la respuesta patológica, y adicionalmente, los antagonistas/inhibidores descritos anteriormente pueden inducir regulación positiva de sus correspondientes receptores y el aumento de la secreción compensatoria de ligandos para otros receptores relacionados mientras suprimen la función de una molécula señal, los efectos del tratamiento resultan ser muy limitados^[3-6]. Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar un fármaco específico útil en la profilaxis y el tratamiento a través de rutas más fundamentales.

Las proteínas G son proteínas de unión a GTP heterotriméricas constituidas por las subunidades α , β , y γ y desempeñan un papel clave en la transducción de señales estimuladoras desde el espacio extracelular al interior del espacio intracelular. La norepinefina (NE), endotelina (ET), angiotensina II (Ang II), y similares agonizan un α_1 -AR, un receptor AT₁, y un receptor de endotelina, respectivamente, a continuación activan la enzima efectora, fosfolipasa C (PLC- β), a través de las proteínas G de la familia Gq, enzima que, a su vez, actúa sobre PIP₂ para producir DAG e IP₃; e inducir expresión génica embrionaria dentro de una célula habitualmente mediante la ruta de señalización de DAG-PKC-Ras-MAPK e IP₃-Ca²⁺-CaN/CaMPKII-NFAT3 / GATA-4, dando como resultado remodelación miocárdica. Además de activar Raf1 a través de integrinas, los estímulos de estiramiento pueden estimular la secreción de Ang II, NE y ET₁, y por lo tanto también está estrechamente relacionada con Gq. Además, se ha observado en experimentos que: (1) durante el proceso patológico de remodelación miocárdica, la señal de Gq es significativamente excesiva, cuyo nivel es significativamente mayor que la señal de Gq fisiológica en tejidos normales; tanto la función como la morfología del cardiocito no se alteran significativamente cuando la expresión de Gqa aumenta dos veces (o menos), la hipertrofia miocárdica y la disfunción contráctil en el corazón se producen cuando la expresión de Gqa aumentaba cuatro veces, la insuficiencia cardiaca ocurre cuando la expresión de Gqa aumentaba ocho veces; (2) la sobre-expresión del gen de Gqa de manera transgénica en el corazón de un ratón puede inducir la evidente hipertrofia miocárdica y la insuficiencia cardiaca mortal en el animal; (3) la inactivación de la expresión de Gqa en el corazón puede atenuar significativamente la respuesta hipertrófica del corazón a la carga de presión^[7-9]. Por lo tanto, puede verse que el Gqa desempeña un papel central en la aparición y el desarrollo de remodelación miocárdica, y se considera una diana común para múltiples rutas de señalización y un elemento de señalización clave para mediar en la remodelación/hipertrofia miocárdica causada por diversos factores. Por lo tanto,

se espera que la regulación sobre Gqa sea una nueva estrategia y quizás una exitosa manera de revertir la remodelación/hipertrofia miocárdica.

Sin embargo, los animales transgénicos son una clase de animales en los que el gen exógeno se introduce por medios experimentales, se integra de forma estable dentro del genoma cromosómico y es capaz de ser heredado por su descendencia; el principio para criar animales transgénicos es el siguiente: un gen/fragmento de interés abordado con procesos en biología molecular se inyecta en cigotos/células embrionarias de preimplantación de animales experimentales mediante diversos procedimientos genéticos, el cigoto/célula embrionaria de preimplantación inyectada se transplanta además al oviducto o el útero del animal receptor y se le permite desarrollarse a un animal transgénico que porta el gen exógeno, y la función del gen exógeno se anota analizando el estado de integración del gen exógeno en el animal transgénico y el fenotipo del animal transgénico, y aquellos animales manipulados genéticamente con excelente calidad se crían mediante un método de mejora genética típico. Por lo tanto, en base a la tecnología actual, el tratamiento de remodelación/hipertrofia miocárdica que aparece en adultos en el ser humano con técnicas transgénicas es poco práctico o no es racional. Adicionalmente, la inactivación de la expresión de Gqa en el corazón dará como resultado efectos secundarios gravemente tóxicos dado que Gqa tiene también importantes funciones fisiológicas. Por lo tanto, las dos estrategias y métodos descritos anteriormente no tienen ningún valor práctico aplicable en el tratamiento clínico de remodelación/hipertrofia miocárdica.

Por esta razón, los inventores se han preparado una serie de polipéptidos con actividades significativas para revertir remodelación/hipertrofia miocárdica utilizando técnicas sistemáticas, tales como, diseño molecular, optimización, ingeniería genética, preparación de polipéptidos, cribado para actividades in vitro e in vivo, etc.

El documento WO 99/05294 se refiere a agentes proteínicos y no proteínicos que inhiben la señalización del receptor acoplado a Gq cardíaca y a un método de inhibidor de hipertrofia ventricular inadaptaada asociada con diversas formas de cardiopatía en transición a insuficiencia cardíaca. En particular, el documento WO 99/05294 da a conocer la expresión miocárdica dirigida de los 55 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad a de Gq para el tratamiento o la prevención de hipertrofia miocárdica en ratones transgénicos que necesitan dicho tratamiento

Características de la invención

Dadas las desventajas presentes en la técnica anterior, un objetivo de la presente invención es dar a conocer una serie de polipéptidos, que no solamente tienen actividades terapéuticas para revertir hipertrofia miocárdica, sino que también pueden producirse fácilmente con bajo coste, estando listos para industrialización y comercialización.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento de fabricación de la serie de polipéptidos, y dicho procedimiento es de realización sencilla, efectivo en cuanto a coste, y puede producir una serie de productos polipeptídicos con alta pureza y excelentes actividades para revertir hipertrofia miocárdica.

Un objetivo adicional de la presente invención es dar a conocer un producto de formulación que comprende el polipéptido y la utilización del polipéptido en la fabricación de un fármaco para tratar remodelación miocárdica.

Para conseguir el propósito de la presente invención, se da a conocer un polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 2 (una secuencia de pentatetracontapéptido)

En una realización adicional, el polipéptido que se da a conocer en la presente invención es un polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 3 (una secuencia de pentatriacontapéptido).

En una realización adicional, el polipéptido que se da a conocer en la presente invención es un polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 5 (una secuencia de heptacosapéptido).

En una realización adicional, el polipéptido que se da a conocer en la presente invención es un polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 6 (una secuencia de pentacosapéptido).

En una realización adicional, el polipéptido que se da a conocer en la presente invención es un polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 7 (una secuencia de icosapéptido).

En una realización adicional, el polipéptido que se da a conocer en la presente invención es un polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 8 (una secuencia de heptadecapéptido).

La presente invención también da a conocer una formulación que comprende polipéptidos descritos anteriormente y aditivos farmacéuticamente aceptables.

En una realización preferente, la formulación es una inyección parenteral.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer la utilización de el polipéptido descrito anteriormente en la fabricación de un fármaco junto con aditivos farmacéuticamente aceptables para tratar hipertrofia miocárdica.

5 En una realización preferente, el polipéptido actúa como ingrediente activo en el fármaco, formulado además con aditivos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional, la presente invención da a conocer un método de preparación de polipéptidos descritos anteriormente, que comprende la siguiente etapa de:

10 realizar síntesis polipeptídica según la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente en un sintetizador de polipéptidos.

La presente invención también da a conocer otro procedimiento de preparación de polipéptidos descritos anteriormente, que comprende la siguiente etapa de:

15 ligar la secuencia de nucleótidos correspondiente en un vector para formar un vector recombinante; transformar dicho vector recombinante en una célula huésped;

20 inducir a dicha célula huésped a expresar dicho polipéptido; y

separar dicho polipéptido.

En una realización preferente para el procedimiento de preparación, el vector recombinante comprende un promotor de T7.

25 En una realización preferente para el procedimiento de preparación, el vector es un plásmido, y la célula huésped es E. coli.

30 En una realización preferente para el procedimiento de preparación, el plásmido es pIVEX2.3MCS, y la cepa de E. coli es BL21.

35 Por medio de las realizaciones mencionadas anteriormente, se contempla en la presente invención que una serie de polipéptidos se obtienen delecionando residuos de aminoácidos en una orientación desde el primer residuo de aminoácido en el extremo N de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1 hacia el extremo C de la misma, es decir, sustracción gradual de los residuos de aminoácidos N-terminales hasta la delección de 38 residuos de aminoácidos mientras se conservan solamente 17 residuos de aminoácidos del extremo C de la secuencia. En base a este concepto de la invención, se optimizaron el gen para y la estructura molecular del pentapentacontapéptido, la longitud del pentapentacontapéptido se acertó con éxito un 69,1% mientras se conservaban y aumentaban sus actividades, y los polipéptidos de interés se sintetizaron con éxito con el 99,2% de pureza mediante la utilización de técnicas de síntesis peptídica avanzadas, con todos los parámetros clave para industrialización adquiridos.

45 La presente invención también tuvo éxito en producir el polipéptido de interés mediante procedimientos de ingeniería genética. Dado que la longitud completa del gen para el pentapentacontapéptido es de solamente 165 pb, y aproximadamente 180 pb después de la activación de los sitios de la enzima de restricción, se selecciona el procedimiento de que dos partes del gen (constituido por 4 fragmentos) se sintetizaron por separado y a continuación se clonaron secuencialmente en un vector de expresión. Se construyó un plásmido de expresión pIVEX2.3MCS2-pentapentacontapéptido, que comprendía el gen de longitud completa para el pentapentacontapéptido bajo el control del promotor de T7. Esto permitía que el plásmido de expresión expresara con éxito el pentapentacontapéptido en un sistema de expresión procariota con el promotor de T7.

50 La presente invención ha evaluado de forma más sistemática la farmacodinámica del polipéptido de interés para que sea significativamente eficaz, utilizando las técnicas tales como microscopía óptica, microscopía electrónica, pesaje directo, ultrasonidos de tipo B en color, etc. En la investigación, se demostró que el polipéptido de interés tiene una buena eficacia profiláctica en un modelo in vitro de hipertrofia de cardiocitos inducida por diversos factores tales como angiotensina II, NE, etc; ejerce un muy buen efecto de supresión sobre el cambio de la actividad de MAPK estimulado por angiotensina II, etc; tiene un buen efecto terapéutico tanto sobre hipertrofia miocárdica en un modelo en ratón normal de coartación invertida de la aorta torácica (TAC) mediante cirugía in vivo como sobre hipertrofia miocárdica causada por sobrecarga de volumen aguda (AVO) en rata normal; tiene también efectos evidentes de reversión de la remodelación miocárdica, reversión de paquinsis de la pared del vaso y reducción de la presión sanguínea en rata con hipertensión espontánea (SHR).

55 Se ha demostrado mediante evaluación de seguridad preliminar que el polipéptido de interés es extremadamente seguro en administración. (1) Ensayo de citotoxicidad: sin citotoxicidad (negativo); (2) Ensayo de toxicidad genética: sin citotoxicidad genética (negativo); (3) Ensayo de mutagenicidad (test de Ames): sin efecto mutagénico (negativo). La dosis tolerada del polipéptido de interés en un ratón es mayor, como mínimo, de 50 mg/kg, la relación de la dosis

5 tolerada con respecto a la dosis eficaz es mayor, como mínimo, de 500; mientras que la relación de DL₅₀/ dosificación rutinaria (la dosificación clínica se convierte en la dosificación en el ratón) de captoprilo, losartán y nifedipina, los fármacos hipotensores típicos con un efecto de reversión de hipertrofia miocárdica, es de 388, 349 y 157, respectivamente, lo que indica que la seguridad del polipéptido de interés es significativamente mayor que la de los fármacos citados anteriormente. Además, no se observaron otros efectos secundarios tóxicos en el transcurso del ensayo.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 Figura 1. Cambios en la morfología de tejidos de músculo cardiaco del grupo del modelo SHR.
 Figura 2. Cambios en la morfología de tejidos de músculo cardiaco del grupo de losartán.
 Figura 3. Cambios en la morfología de tejidos de músculo cardiaco del grupo de heptacosapéptido.
 15 Figura 4. Cambios en la ultramicroestructura de tejidos de músculo cardiaco del grupo del modelo SHR.
 Figura 5. Cambios en la ultramicroestructura de tejidos de músculo cardiaco del grupo de losartán.
 20 Figura 6. Cambios en la ultramicroestructura de tejidos de músculo cardiaco del grupo de heptacosapéptido.

EJEMPLO

25 La presente invención se ilustra con más detalle según la realización específica de la presente invención en combinación con los dibujos.

Ejemplo1: Síntesis en fase sólida del polipéptido

- 30 1. Procesos de síntesis y purificación para el heptacosapéptido

Se introdujeron 25 g de resina (con la constante del sustituyente de 0,6 mmol/g) a escala piloto en las siguientes etapas. Se utilizó 1 kg de resina a escala de fabricación, la cantidad de alimentación se incrementó proporcionalmente, y el tiempo de reacción se prolongó.

- 35 1.1 Proceso de síntesis para el heptacosapéptido

1. Se pesaron de forma precisa 25 g de resina Fmoc-Val-Wang y se colocaron en un reactor de 1000 ml, seguido por la adición en su interior de DCM, se agitaron y se empaparon durante 30 minutos, se lavaron respectivamente con 500 ml de cada uno de DCM, MeOH y DMF dos veces, y se sometieron a filtración por aspiración para eliminar el disolvente.

45 2. Se añadieron 500 ml de piperidina al 20%/DMF, se agitaron a temperatura ambiente, y se hicieron reaccionar durante 30 minutos para eliminar el grupo protector Fmoc N-terminal. Después de eliminar el disolvente mediante filtración por aspiración, la resina se lavó adicionalmente con 500 ml de cada uno de DCM, MeOH y DMF dos veces, y el disolvente se eliminó mediante filtración por aspiración.

50 3. Se pesaron 21,2 g de Fmoc-Leu-OH y 22,8 g de HBTU y se disolvieron en 500 ml de DMF, seguido por la adición en su interior de 40 ml de DIEA, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. A continuación, la mezcla se transfirió al reactor y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h mientras se agitaba. Después de eliminar el líquido de reacción mediante filtración por aspiración, la resina se lavó adicionalmente con 500 ml de cada uno de DCM, MeOH y DMF dos veces, y el disolvente se eliminó mediante filtración por aspiración.

55 4. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones permanecieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 35,8 g de Fmoc-Asn(Trt)-OH y el tiempo de reacción duró 3 h.

60 5. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 27,6 g de Fmoc-Tyr(tBu)-OH.

6. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 25,5 g de Fmoc-Glu(OtBu)-OH.

65 7. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 28,1 g de Fmoc-Lys(Boc)-OH.

8. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 21,2 g de Fmoc-Leu-OH.
- 5 9. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 35,8 g de Fmoc-Asn(Trt)-OH.
10. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 21,2 g de Fmoc-Leu-OH.
- 10 11. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 36,7 g de Fmoc-Gln(Trt)-OH.
12. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 21,2 g de Fmoc-Leu-OH.
- 15 13. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 21,2 g de Fmoc-Ile-OH.
14. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 23,9 g de Fmoc-Thr(tBu)-OH.
- 20 15. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 24,7 g de Fmoc-Asp(OtBu)-OH.
- 25 16. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 28,1 g de Fmoc-Lys(Boc)-OH.
17. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 20,4 g de Fmoc-Val-OH.
- 30 18. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 19,8 g de Fmoc-Ala-OH.
19. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 19,8 g de Fmoc-Ala-OH.
- 35 20. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 23,2 g de Fmoc-Phe-OH.
- 40 21. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 20,4 g de Fmoc-Val-OH.
22. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 23,2 g de Fmoc-Phe-OH.
- 45 23. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 39,0 g de Fmoc-Arg(pbf)-OH.
24. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 21,2 g de Fmoc-Ile-OH.
- 50 25. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 35,8 g de Fmoc Asn(Trt)-OH.
- 55 26. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 25,5 g de Fmoc-Glu(OtBu)-OH.
27. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 23,9 g de Fmoc-Thr(tBu)-OH.
- 60 28. Se repitieron las etapas 2 y 3, y todas las demás condiciones se mantuvieron sin cambios y las etapas fueron idénticas, excepto que el aminoácido añadido en la etapa 3 fué 24,7 g de Fmoc-Asp(OtBu)-OH.
- 65 29. Se añadieron 500ml de piperidina al 20%/DMF, se agitaron a temperatura ambiente, y se hicieron reaccionar durante 30 minutos para eliminar el grupo protector Fmoc N-terminal. Después de eliminar el disolvente mediante

filtración por aspiración, la resina se lavó adicionalmente con 500 ml de cada uno de DCM, MeOH y DMF dos veces, y el disolvente se eliminó mediante filtración por aspiración. La resina se secó al vacío durante una noche.

5 30. La resina seca se pesó con un peso total de 68 g, siendo el incremento de peso de 43 g. La resina se transfirió a un matraz de 250 ml de fondo redondo, seguido por la adición a su interior de 150 ml de TFA/TA/EDT/TIS/H₂O/fenol 7:1:1:0,1:0,35/0,5), y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La resina se separó del filtrado mediante filtración por aspiración, 2000 ml de éter etílico a 0°C se añadieron al filtrado, y el precipitado resultante se separó del éter etílico por centrifugado y a continuación se secó para dar 40 g del producto impuro del heptacosapéptido.

10 1.2 proceso de purificación para el heptacosapéptido

15 1.2.1 la muestra liofilizada del producto impuro de heptacosapéptido se disolvió en DMSO, se separó en un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa y se eluyó mediante un gradiente. Las fracciones del pico principal para el heptacosapéptido se recogieron, se reunieron y se liofilizaron de nuevo para obtener la materia prima inicialmente purificada del heptacosapéptido. El producto liofilizado después de la purificación inicial se disolvió en acetonitrilo al 15% y se sometió a la segunda purificación en un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa. Las fracciones del pico principal se recogieron, siendo eliminados los contaminantes cerca del pico principal, reunidos y liofilizados de nuevo para obtener el heptacosapéptido refinado.

20 1.2.2 las condiciones de cromatografía fueron las siguientes:

Equipo de cromatografía: Equipo de cromatografía de líquidos prepstar de Varian y su software para funcionamiento y análisis;

25 Columna de cromatografía; la columna de cromatografía C₁₈ (250 x 50 mm) llena de Load & Lock; Fase móvil: A: TFA al 0,05%/acetonitrilo al 2%/agua; B: acetonitrilo al 90%/agua; gradiente de elución: purificación inicial: fase móvil B al 8-8-32-57% durante un total de 70 minutos, gradiente de nivel durante 5 minutos;

30 La segunda purificación: fase móvil B al 0-0-34-55% durante un total de 70 minutos, gradiente de nivel durante 5 minutos; Caudal: 50 ml/minuto; Longitud de onda para detección UV: 275 nm.

2. Procesos de síntesis y purificación para el pentapentacontapéptido como referencia

Las referencias no están dentro del alcance de la invención reivindicada.

35 Se introdujeron 25 g de resina (con la constante del sustituyente de 0,6 mmol/g) a escala piloto en las siguientes etapas. Se utilizó 1 kg de resina a escala de fabricación, la cantidad de alimentación se incrementó en proporción, y el tiempo de reacción se prolongó.

40 1. Se pesaron de forma precisa 25 g de resina Fmoc-Val-Wang y se colocaron en un reactor de 67,63 onzas fluidas, seguidos por la adición en su interior de DCM, se agitaron y se empaparon durante 30 minutos, se lavaron respectivamente con 500 ml de cada uno de DCM, MeOH y DMF dos veces, y se sometieron a filtración por agitación para eliminar el disolvente.

45 2. se añadieron 500 ml de piperidina al 20%/DMF, se agitaron a temperatura ambiente, y se hicieron reaccionar durante 30 minutos para eliminar el grupo protector Fmoc N-terminal. Después de eliminar el disolvente mediante filtración por aspiración, la resina se lavó adicionalmente con 500 ml de cada uno de DCM, MeOH y DMF dos veces, y el disolvente se eliminó mediante filtración por aspiración.

50 3. Se pesaron 21,2 g de Fmoc-Leu-OH y 22,8 g de HBTU y se disolvieron en 500 ml de DMF, seguidos por la adición de 40 ml de DIEA, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. A continuación, la mezcla se transfirió al reactor y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h con agitación. Después de eliminar el líquido de reacción mediante filtración por aspiración, la resina se lavó adicionalmente con 500 ml de cada uno de DCM, MeOH y DMF dos veces, y el disolvente se eliminó mediante
55 filtración por aspiración.

4. Se repitieron el lavado y la desprotección en la etapa 2 y 3, y los aminoácidos se introdujeron de forma secuencial hasta que se hizo reaccionar al último aminoácido.

60 5. Se añadieron 750 ml de piperidina al 20%/DMF, se agitaron a temperatura ambiente, y se hicieron reaccionar durante 30 minutos para eliminar el grupo protector Fmoc N-terminal. Después de eliminar el disolvente mediante filtración por aspiración, la resina se lavó adicionalmente con 500 ml de cada uno de DCM, MeOH y DMF dos veces, y el disolvente se eliminó mediante filtración por aspiración. La resina se secó al vacío durante una noche.

65 6. La resina seca se pesó con un peso total de 113 g, siendo el incremento de peso de 88 g. La resina se transfirió a un matraz de 250 ml de fondo redondo, seguido por la adición a su interior de 8,45 onzas fluidas de

TFA/TA/EDT/TIS/H₂O/fenol 7:1:1:0,1:0,35/0,5), y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La resina se separó del filtrado mediante filtración por aspiración, se añadieron 3000 ml de éter etílico a 0°C al filtrado, y el precipitado resultante se separó del éter etílico por centrifugado y a continuación se secó para dar 85 g del producto en bruto de pentapentacontapéptido.

5 7. El proceso de refinado y las condiciones de cromatografía se establecieron en referencia a las del heptacosapéptido.

10 3. Procesos de síntesis y purificación para el dodecapéptido como referencia.

1-4. Iguales a los de la sección anterior para el pentapentacontapéptido.

15 5. Se añadieron 500 ml de piperidina al 20%/DMF, se agitaron a temperatura ambiente, y se hicieron reaccionar durante 30 minutos para eliminar el grupo protector Fmoc N-terminal. Después de eliminar el disolvente mediante filtración por aspiración, la resina se lavó adicionalmente con 500 ml de cada uno de DCM, MeOH y DMF dos veces, y el disolvente se eliminó mediante filtración por aspiración. La resina se secó al vacío durante una noche.

20 6. La resina seca se pesó con un peso total de 46 g, siendo el incremento de peso de 21 g. La resina se transfirió a un matraz de 250 ml de fondo redondo, seguido por la adición de 100 ml de TFA/TA/EDT/TIS/H₂O 7:1:1:0,1:0,35), y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La resina se separó del filtrado mediante filtración por aspiración, se añadieron 1500 ml de éter etílico a 0°C al filtrado, y el precipitado resultante se separó del éter etílico mediante centrifugado y a continuación se secó para dar 0,67 onzas del producto impuro del dodecapéptido.

25 7. El proceso de refinado y las condiciones de cromatografía se establecieron en referencia a aquellos para el heptacosapéptido.

Ejemplo2: Expresión de pentapentacontapéptido como referencia y heptacosapéptido mediante ingeniería genética y purificación de los mismos

30 En base a las secuencias de nucleótidos para el pentapentacontapéptido y el heptacosapéptido, se diseñaron las secuencias de oligonucleótidos correspondientes para construir el vector de expresión para el péptido.

Para el pentapentacontapéptido, se sintetizaron cuatro oligonucleótidos de cadena sencilla de la siguiente manera:

35 55-1: 60 pb

5' tcgagctccatgggtcgagaattcattctgaagatgttcgctgactaaacgttctctgca 3'

40 55-2: 52 pb

5' gagaacgtttagtcgacgaacatctcagaatgaattctcgacctggagc 3'

55-3: 85 pb

45 5' gaggtcgacctgaaccagacagtgacaaaattatctactcccacttcacgtgtgccacagacaccgagaatatccgcttctct 3'

55-4: 85 pb

50 5' tagcccggggaccagattgtactcctcaggttcagctggaggatggtgtccttgacggctgcaaagacaaagcggatattctcg 3'

Para el heptacosapéptido, se sintetizaron dos oligonucleótidos de cadena sencilla de la siguiente manera:
27-1:

55 5' catggacaccgagaatatccgcttctcttcagccgtcaaggacaccatcctccagctgaacctgaaggagtacaatctggtctaacc 3'

27-2:

5' gggtagaccagattgtactcctcaggttcagctggaggatggtgtccttgacggctgcaaagacaaagcggatattctcggtctc 3'

60 Los primer y segundo oligonucleótidos de cadena sencilla sintetizados para el pentapentacontapéptido se hibridaron para formar un fragmento de ADN de cadena doble con extremos cohesivos, el fragmento de ADN resultante se clonó de forma unidireccional entre los sitios de restricción *Xho* I y *Pst* I en el plásmido pEGFP-N1 (suministrado por el Departamento de Genética, Tercera Universidad Médica Militar, Chongqing, China), y el plásmido construido se designó pEGFP-A. Dado que había 20 bases complementarias en los extremos 3' del tercer y cuarto oligonucleótidos de cadena sencilla sintetizados, los tercer y cuarto oligonucleótidos se hibridaron y se prolongaron mediante Taq polimerasa para formar un fragmento B de ADN de cadena doble. El fragmento amplificado se

observó en el marcador de peso molecular de ADN de 150 pb en electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. El fragmento B se digirió por partida doble mediante *Sal*I y *Sma*I y a continuación se clonó de forma unidireccional entre los sitios de restricción *Sal*I y *Sma*I en el plásmido pEGFP-A, y el plásmido construido se designó pEGFP-55, que comprende todo el gen del pentapentacontapéptido. El gen del pentapentacontapéptido se escindió mediante doble digestión con *Xho*I y *Sma*I y se insertó entre los sitios de restricción *Xho*I y *Sma*I en el plásmido pIVEX2.3-MCS, y el plásmido construido se designó pIVEX2.3MCS-55. El cribado para el plásmido de interés puede realizarse de la siguiente manera: el plásmido candidato se digirió por partida doble con *Xho*I y *Sma*I, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% y se identificó como un clon positivo si había una banda aproximadamente en el marcador de peso molecular de ADN de 180 pb.

Los primer y segundo oligonucleótidos de cadena sencilla sintetizados para el heptacosapéptido se hibridaron para formar directamente un fragmento de ADN de cadena doble con extremos cohesivos para *Nco*I y *Sma*I, el plásmido pIVEX2.3 se digirió por partida doble con *Nco*I y *Sma*I y se sometió a electroforesis, y a continuación el fragmento plasmídico con extremos cohesivos se recuperó mediante un kit de recuperación en gel. El gen del heptacosapéptido se clonó de forma unidireccional en el plásmido pIVEX2.3 (adquirido de Roche company, Suiza) con T4 ADNligasa. El clon positivo comprende el gen del heptacosapéptido y se designa como pIVEX2.3-27. Seis colonias con el plásmido recombinante ligado en una placa que contenía ampicilina se recogieron en 5 ml de medio LB y se cultivaron durante una noche; el plásmido se extrajo, se digirió por partida doble con *Nco*I y *Sma*I y se sometió a electroforesis para identificación; el clon identificado como positivo se confirmó adicionalmente por secuenciación. Se estableció que pIVEX2.3MCS-55 y pIVEX2.3-27 se construyeron con éxito. pIVEX2.3MCS-55 y pIVEX2.3-27 se transformaron individualmente en células competentes de BL21 (DE3) pLysE (adquiridas de Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.), el plásmido se extrajo de la colonia transformada con un kit de extracción del plásmido y se identificaron mediante digestión por restricción, y una única colonia se recogió y se cultivó con agitación a 37°C, 180 rpm en 2 ml de un medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) durante 10 h. Se añadieron 200 µl de la suspensión bacteriana anterior a 250 ml de un medio LB que contenía ampicilina, se cultivaron con agitación a 37°C, 180 rpm durante 10 h, seguido por la adición de IPTG a su concentración final de 1 mmol/l, se cultivaron adicionalmente a 37°C durante 4 - 6 h y a continuación a 30°C durante 10 h. Las células bacterianas se recogieron mediante centrifugado y se almacenaron a -70°C hasta su utilización. Se resuspendió 1 g de peso húmedo de las bacterias recogidas con 5 ml del tampón de unión, se rompieron por by ultrasonificación (ajuste: positivo durante 6 s, amplitud de 15 - 20, ruptura en hielo durante 8 - 10 minutos), y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos, El sobrenadante se pipeteó para purificación. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad por níquel-quelato en condición desnaturalizante: una columna de Ni se equilibró en primer lugar con 5 ml de un tampón de unión desnaturalizante. Al sobrenadante que se originó de la ultrasonificación se le dejó pasar a través de la columna con un caudal controlado de no más de 10 ml por hora, y se recogió un eluato. La columna se eluyó con 5 ml de un tampón A de lavado desnaturalizante y se recogió el eluato. 1 ml de un líquido se formuló con el tampón B de lavado no desnaturalizante y el tampón B de lavado desnaturalizante en la relación 0:1, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 y 1:0. La columna se eluyó con los líquidos descritos anteriormente y a continuación con 2 ml del tampón B de lavado no desnaturalizante, todo el ciclo debe durar no menos de 2 - 3 h, y se recogió el eluato. Se dejó pasar a 3 ml del tampón A de elución a través de la columna para eluir la proteína, y se recogió el eluato. Se dejaron pasar a 2 x 3 ml del tampón A de elución a través de la columna para eluir la proteína, y se recogió el eluato. La pureza de la proteína se identificó mediante SDS-PAGE. Se demostró que las bacterias BL21 (DE3) expresan el polipéptido de interés, la cantidad de expresión en el polipéptido de interés supone hasta aproximadamente el 10% de la proteína total de las células bacterianas, y el rendimiento es de aproximadamente 1,5 mg del polipéptido de interés purificado a partir de 250 ml de suspensión bacteriana después de purificación y renaturalización en columna de Ni. La mayor parte del polipéptido de interés se eluyó con 500 mmol/l de imidazol y produjo una única banda en SDS-PAGE, con una pureza superior al 98% según lo determinado mediante densitometría.

Ejemplo 3: Una serie de los polipéptidos de la presente invención es capaz de reducir el contenido de proteínas en un modelo de hipertrofia de cardiocitos de rata inducida por norepinefrina

1. Se utilizaron ratas Wistar 1-3 días postparto (adquiridas del Centro para Animales Experimentales, Tercera Universidad Médica Militar), se sacrificaron mediante dislocación cervical, y se fijaron en una mesa de disecciones. La piel ventral del cuerpo se desinfectó con tintura de yodo al 2% y a continuación etanol al 75%. El corazón se extirpó, se cortó en trozos de aproximadamente 1-3 mm³, se digirió repetidamente con una solución de digestión que contenía tripsa al 0,08%, EDTA al 0,02% y colágeno al 0,05%. Las células se recogieron en DMEM que contenía suero fetal bovino al 10% y se cultivaron en una incubadora a 37°C, CO₂ al 5%,

2. Los cardiocitos cultivados durante 48 h se sometieron a sustitución del DMEM por un medio de cultivo DMEM sin suero y se cultivaron adicionalmente durante 24 h antes de la adición de un fármaco según los siguientes grupos:

Grupo de control normal; se añadieron 10 µl de PBS.

Grupo de norepinefrina; se añadió norepinefrina (NE, Serva Corporation, Estados Unidos) a 1 µmol/l.

Grupo dosificado con el polipéptido: se añadió NE, mientras el fármaco polipeptídico correspondiente se añadió a 10 nmol/l.

3. Después de la adición del fármaco, las células se cultivaron adicionalmente durante 24 h y a continuación el medio de cultivo se desechó. El cultivo se lavó con PBS, seguido por la adición de 0,5 ml de ácido tricloroacético al 5% por pocillo, y se dejó a 4°C durante 1 h. El precipitado se disolvió en 1 ml de 0,1 mol/l de NaOH. El contenido de proteína se determinó mediante el método de Lowry.

4. Resultado: cada uno del pentapentacontapéptido como referencia, el pentatetracontapéptido, el pentatriacontapéptido, el triacontapéptido como referencia, el heptacosapéptido, el pentadicosapéptido, el icosapéptido, el heptadecapéptido y el pentadecapéptido como referencia a 10 nmol/l es capaz de reducir significativamente el contenido de proteína en el cardiocito hipertrófico inducido por NE, y el dodecapéptido no tiene ningún efecto manifiesto (tal como se muestra en la tabla 1).

Tabla 1. Efecto de una serie de polipéptidos de la presente invención sobre el contenido de proteína en los cardiocitos cultivados de las ratas (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (nmol/l)	Contenido de proteína ($\mu\text{g}/10^5$ células)
Control	-	80,5 \pm 13
NE	1000	121,0 \pm 13,2**
Pentapentacontapéptido como referencia	10	90,3 \pm 10,8##
Pentatetracontapéptido	10	92,7 \pm 12,3##
Pentatriacontapéptido	10	93,4 \pm 12,0##
Triacontapéptido como referencia	10	99,8 \pm 9,9##
Heptacosapéptido	10	89,4 \pm 10,7##
Pentadicosapéptido	10	100,2 \pm 11,6##
Icosapéptido	10	103,4 \pm 11,4#
Heptadecapéptido	10	96,4 \pm 10,5##
Pentadecapéptido como referencia	10	104,3 \pm 12,6##
Dodecapéptido como referencia	10	113,3 \pm 11,6

**P<0,01 frente al grupo de control; #P<0,05, ##P<0,01 frente al grupo de NE

Ejemplo 4: Una serie de los polipéptidos de la presente invención es capaz de reducir el contenido de proteína en el modelo de hipertrofia de cardiocitos de rata inducida por angiotensina II (Ang II).

1. Los cardiocitos se cultivaron durante 48 h de la misma manera descrita anteriormente, a continuación se sometieron a sustitución del DMEM por un medio de cultivo DMEM sin suero, y se cultivaron adicionalmente durante 24 h antes de la adición de un fármaco según los siguientes grupos: grupo de control normal: se añadieron 10 μl de PBS; grupo de Ang II; se añadió Ang II a 1 $\mu\text{mol/l}$; grupo dosificado con la serie de polipéptidos: se añadió Ang II, mientras que se añadió cada uno del dodecapéptido como referencia, el pentadecapéptido como referencia, el heptacosapéptido, el pentapentacontapéptido como referencia a 10 nmol/l.

2. Después de la adición del fármaco, las células se cultivaron adicionalmente durante 24 h y a continuación el medio de cultivo se desechó. El cultivo se lavó con PBS, seguido por la adición de 0,5 ml de ácido tricloroacético al 5% por pocillo, y se dejó a 4°C durante 1 h. El precipitado se disolvió en 1 ml de 0,1 mol/l de NaOH. El contenido de proteína se determinó mediante el método de Lowry.

3. Resultado: La adición de Ang II al medio de cultivo celular es capaz de aumentar de forma significativa el contenido de proteína en el cardiocito (μg : 143,2 \pm 5,49 frente a 113,9 \pm 7,48, p<0,01) en comparación con el grupo de control normal. En comparación con Ang II, el pentadecapéptido como referencia, el heptacosapéptido y el pentapentacontapéptido como referencia pueden reducir el contenido de proteína en el cardiocito en grados variables, mientras que el dodecapéptido no tiene ningún efecto manifiesto (ver tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la serie de polipéptidos sobre el contenido de proteína en el cardiocito hipertrófico inducido por angiotensina II (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (nmol/l)	Contenido de proteína ($\mu\text{g}/10^5$ células)
Control	-	113,9 \pm 7,48
Ang II	1000	143,2 \pm 5,49**
Dodecapéptido como referencia	10	144,0 \pm 11,7
Pentadecapéptido como referencia	10	130,6 \pm 10,79#
Heptacosapéptido	10	125,3 \pm 9,41##
Pentapentacontapéptido como referencia	10	127,2 \pm 6,33##

Nota: **P<0,01 frente al grupo de control; #P<0,05, ##P<0,01 frente al grupo de Ang II.

Ejemplo 5. Polipéptidos capaces de suprimir de forma significativa hipertrofia miocárdica en ratones inducidos por norepinefrina

5 Cincuenta de los ratones utilizados en el experimento (adquiridos del Centro para Animales Experimentales, Tercera Universidad Médica Militar) se asignaron a cinco grupos con 10 ratones por grupo. A los ratones en el grupo de control se les administró ácido ascórbico al 0,1%-3mg% de tartrato de sodio y potasio - solución salina fisiológica. A los ratones en el grupo modelo se les administró ácido ascórbico al 0,1% - 6 mg% de bitartrato de norepinefrina - solución salina fisiológica (equivalente a 1,5 mg/kg de NE); A los ratones en los tres grupos de dosificación se les administraron el pentadecapéptido como referencia, el heptacosapéptido, y el pentapentacontapéptido como referencia a 30 µg/kg respectivamente, mientras se administraba ácido ascórbico al 0,1% - 6 mg% de bitartrato de norepinefrina - solución salina fisiológica. La administración se realizó de forma consecutiva mediante inyección intraperitoneal (ip), dos veces al día (bid), durante 15 días. Los volúmenes de dosificación para cada grupo fueron de 50 ml/kg. A continuación, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. El corazón se extirpó mediante toracotomía, se lavó con la solución salina fisiológica enfriada para eliminar las manchas de sangre, se secó con papel de filtro, se pesó en una báscula. Las aurículas y el ventrículo derecho se retiraron cuidadosamente (con el tabique interventricular izquierdo), y se pesó el ventrículo izquierdo.

20 El resultado muestra que la serie de polipéptidos puede prevenir de forma significativa la aparición de hipertrofia miocárdica en los ratones, y diversos indicadores sobre hipertrofia miocárdica en todos los otros grupos mejoran de forma significativa, excepto para el peso del corazón en el grupo de pentadecapéptido como referencia (que disminuye un 9,9%, mientras que $P > 0,05$) (visto en la tabla 3).

25 Tabla 3.Efecto de la serie de polipéptidos sobre la hipertrofia miocárdica en los ratones ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	N	BW(g)	HW(mg)	LVW(mg)	HI(mg/g)	LVI(mg/g)
Control	10	25,1±2,19	98,8±9,68	70,8±8,21	3,95±0,31	2,82±0,27
NE	8	23,2±1,69	112,1±12,1*	85,6±9,16**	4,82±0,44**	3,69±0,36**
Pentadecapéptido como referencia	9	23,6±2,51	100,9±12,8	74,7±9,25 ^{##}	4,27±0,4 ^{##}	3,16±0,39 ^{##}
Heptacosapéptido	8	23,1±2,26	95,2±5,79 [#]	67,9±6,30 ^{##}	4,17±0,52 ^{##}	2,98±0,48 ^{##}
Pentapentacontapéptido como referencia	8	23,3±2,05	99,0±16,3 [#]	72,9±12,8 ^{##}	4,24±0,59 ^{##}	3,13±0,50 ^{##}

Nota: BW - peso corporal; HW - peso del corazón; LVW - peso ventricular izquierdo; HI - índice cardiaco; LVI - índice ventricular izquierdo o índice de hipertrofia miocárdica.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ frente al grupo de control; [#] $P < 0,05$, ^{##} $P < 0,01$ frente al grupo de NE

Ejemplo 6.La presente invención una serie de polipéptidos suprime de forma significativa la hipertrofia miocárdica en ratas inducida por norepinefrina

30 Se seleccionaron treinta ratas Wistar y se asignaron a cinco grupos con 6 ratas por grupo. A las ratas en el grupo de control se les administró ácido ascórbico al 0,1% - 3 mg% de tartrato de sodio y potasio - solución salina fisiológica; a las ratas en el grupo modelo se les administró ácido ascórbico al 0,1% - 6 mg% de bitartrato de norepinefrina - solución salina fisiológica; a las ratas en los tres grupos de dosificación se les administró el pentadecapéptido como referencia, el heptacosapéptido y el pentapentacontapéptido como referencia a 15 µg/kg respectivamente, mientras se administraba norepinefrina. El volumen de dosificación para cada grupo era de 33 ml/kg, y la administración se realizó de forma consecutiva por ip, bid, durante 20 días. En ese momento, se pesaron el corazón y el ventrículo izquierdo.

40 El resultado muestra que el pentadecapéptido como referencia puede reducir de forma significativa el índice ventricular izquierdo, el heptacosapéptido y el pentapentacontapéptido como referencia pueden reducir de forma significativa el peso ventricular izquierdo, el índice cardiaco y el índice ventricular izquierdo (ver tabla 4).

Tabla 4. efecto de la serie de polipéptidos sobre hipertrofia miocárdica en las ratas inducida por norepinefrina

Grupo	(n=6, $\bar{x} \pm s$)				
	BW(g)	HW(g)	LVW(g)	HI(g/kg)	LVI(g/kg)
Control	189±15	0,573±0,035	0,408±0,027	3,043±0,178	2,166±0,114
NE	187±5,0	0,690±0,078*	0,555±0,055**	3,674±0,348**	2,954±0,225**
Pentadecapéptido como referencia	188±12	0,673±0,055	0,490±0,038	3,580±0,226	2,606±0,154 [#]
Heptacosapéptido	200±13	0,622±0,032	0,442±0,017 ^{###}	3,111±0,041 ^{###}	2,213±0,056 ^{###}
Pentapentacontapéptido como referencia	190±21	0,630±0,052	0,450±0,036 ^{###}	3,310±0,137 [#]	2,368±0,166 ^{###}

Nota: BW - peso corporal; HW - peso del corazón; LVW - peso ventricular izquierdo; HI - índice cardiaco; LVI - índice ventricular izquierdo o índice de hipertrofia miocárdica.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ frente al grupo de control; [#] $P < 0,05$, ^{###} $P < 0,01$ frente al grupo de NE

5 Ejemplo 7. Polipéptidos que previenen de forma significativa hipertrofia miocárdica en ratas inducida por coartación aórtica

10 Ratas Wistar macho sanas (adquiridas del Centro para Animales Experimentales, Tercera Universidad Médica Militar) se asignaron aleatoriamente a los siguientes grupos: el grupo de operación simulada, grupo modelo de operación (SRS), y grupo de dosificación de polipéptido. Antes de la operación, los animales se mantuvieron en ayuno durante una noche y se les proporcionó acceso *ad libitum* a agua, y a continuación se anestesiaron con pentobarbital sódico y se les sometió a celiotomía. La aorta abdominal se separó, y se fijó una aguja 8 G (0,80 mm de diámetro externo) a lo largo de la aorta abdominal por encima de la arteria renal derecha con un hilo de seda antes de que la aguja se retirara rápidamente. A continuación, el abdomen se cerró mediante sutura. Las ratas en el grupo operación simulada se sometieron al mismo tratamiento que el mencionado anteriormente, excepto que no se produjo ligamento con hilo de seda. A partir del primer día después de la operación, a las ratas en el grupo de control de operación simulada y en el grupo modelo de operación se les administró solución salina fisiológica a 7,5 ml/kg, *ip*, una vez al día; a las ratas en el grupo de dosificación se les administró el pentadecapéptido como referencia, el heptacosapéptido y el pentapentacontapéptido como referencia a 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente, *ip*, una vez al día. Las ratas se criaron de forma rutinaria durante 3 semanas y a continuación se sacrificaron. El corazón se extirpó mediante toracotomía, se lavó con la solución salina fisiológica enfriada para eliminar las manchas de sangre, se secó con papel de filtro. El corazón y el ventrículo izquierdo se pesaron en una báscula.

15 El resultado demuestra que la serie de polipéptidos pueden prevenir de forma significativa la aparición de hipertrofia miocárdica en las ratas, y existen reducciones significativas en HW, LVW, HI y LVI (ver tabla 5).

25 Tabla 5. Efecto de la serie de polipéptidos sobre la hipertrofia miocárdica en ratas inducida por coartación aórtica

	n	($\bar{x} \pm SEM$)				
		BW(g)	HW(mg)	LVW(mg)	HI(mg/g)	LVI(mg/g)
Operación simulada	6	222±8,2	713±23,3	399±24,9	3,22±0,08	1,80±0,07
SRS	5	204±5,8	813±31,3*	508±26,4*	3,98±0,09**	2,48±0,10**
Pentadecapéptido como referencia	5	208±5,6	706±30,8 [#]	418±12,3 [#]	3,39±0,10 ^{###}	2,01±0,06 ^{###}
Heptacosapéptido	5	211±6,4	696±30,7 ^{###}	413±22,1 [#]	3,30±0,08 ^{###}	1,96±0,08 ^{###}
Pentapentacontapéptido como referencia	5	215±8,0	702±31,3 ^{###}	409±24,6 [#]	3,27±0,08 ^{###}	1,90±0,07 ^{###}

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ frente al grupo de operación simulada; [#] $P < 0,05$, ^{###} $P < 0,01$ frente al grupo SRS.

30 Ejemplo 8. La serie de polipéptidos de la presente invención puede prevenir la remodelación miocárdica en ratas con hipertensión espontánea

1. Se seleccionaron treinta ratas de 13 semanas de edad con hipertensión espontánea (SHR, adquiridas de Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co. Ltd., Beijing) y se asignaron aleatoriamente a cinco grupos con 6 ratas por grupo:

35 Grupo modelo de SHR (Vehículo): solución salina fisiológica al 0,9%, inyección intraperitoneal a una dosis de 5 ml/kg, *bid*.

40 Grupo de control positivo (losartán): losartán potásico a una dosis de 6 mg/kg, administración intragástrica, *qd*.

Grupo del pentadecapéptido como referencia: administración del pentadecapéptido como referencia a una dosis de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mediante inyección intraperitoneal, *bid*.

Grupo del heptacosapéptido: administración del heptacosapéptido a una dosis de 30 µg/kg mediante inyección intraperitoneal, *bid*.

5 Grupo del pentapentacontapéptido como referencia: administración del pentapentacontapéptido como referencia a una dosis de 30 µg/kg mediante inyección intraperitoneal, *bid*.

Seis ratas WKY (Wistar-Kyoto) (adquiridas del Centro para Animales Experimentales, Tercera Universidad Médica Militar) se seleccionaron adicionalmente como control normal.

10 2. La intervención con el fármaco se realizó de forma consecutiva durante ocho semanas (de la semana 14 a la semana 21). Los pesos corporales de todas las ratas ensayadas se obtuvieron una vez cada dos semanas, y la dosis de administración se ajustó en base a los pesos corporales.

3. El resultado sugiere:

15 (1) la serie de polipéptidos tiene cierto efecto hipotensor y puede reducir de forma significativa la presión sanguínea sistólica de la arteria en las SHR (ver Tabla 6).

Tabla 6.Efecto de la serie de polipéptidos de la presente invención sobre la presión arteria sistólica en SHRS

20 $(\bar{x} \pm s, n=6)$.

Grupo	Dosis	Presión sanguínea sistólica de la arteria (mmHg)				
		0 semanas	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
WKY	-	143,8±10,79	144,8±9,03	143,8±8,16	144,4±9,67	142,6±4,82
Vehículo	-	176,9±1,82	207,4±8,80 ^{##}	225,3±1624 ^{##}	238,6±8,09	248,1±7,27*
Losartán	6 mg/kg	178,3±2,24	165,1±4,80 ^{**}	177,1±8,27 ^{**}	178,3±8,23 ^{**}	172,8±4,82 ^{**}
Pentadecapéptido como referencia	30 µg/kg	177,3±6,42	190,4±7,75 ^{**}	200,2± 4,13 ^{**}	217,1±8,82 ^{**}	224,1±8,37 ^{**}
Heptacosapéptido	30 µg/kg	180,0±3,60	185,2±6,92 ^{**}	189,4±6,34 ^{**}	211,8±3,97 ^{**}	202,3±3,87 ^{**}
Pentapentacontapéptido como referencia	30 µg/kg	178,2±4,15	189,8±7,80 ^{**}	193,4±5,31 ^{**}	216,0±5,55 ^{**}	218,3:1:8,54 ^{**}

$P < 0,01$ frente a WKY; ** $P < 0,01$ frente a Vehículo

25 (2) la serie de polipéptidos de la presente invención puede mejorar de forma significativa la remodelación miocárdica en las SHR, y puede conducir de forma significativa a una reducción de HW, LVW, HI y LVI en las ratas (tabla 7) así como en el grosor de la pared posterior ventricular izquierda (PWT) y grosor del tabique interventricular (IVST) en las SHR (tabla 8).

Tabla 7.Efecto de la serie de polipéptidos sobre la hipertrofia miocárdica en las ratas ($\bar{x} \pm s, n=6$).

Grupo	Dosis	BW (g)	HW(mg)	LVW(mg)	HI(mg/g)	LVI(mg/g)
WKY	-	300±8	876±29	582±20	2,92±0,05	1,94±0,10
Vehículo	-	309±6	1176±39 ^{##}	950±31 ^{##}	3,80±0,08 ^{##}	3,07±0,13 ^{##}
Losartán	6 mg/kg	288±9	1003±16 ^{**}	789±88	3,48±0,05 ^{**}	2,74±0,28
Pentadecapéptido como referencia	30 µg/kg	307±8	1055±30 ^{**}	775±28 ^{**}	3,44±0,05 ^{**}	2,46±0,04 ^{**}
Heptacosapéptido	30 µg/kg	304±10	849±23 ^{**}	609±99 ^{**}	2,80±0,03 ^{**}	2,01±0,07 ^{**}
Pentapentacontapéptido como referencia	30 µg/kg	291±7	949±28 ^{**}	705±49 ^{**}	3,26±0,05 ^{**}	2,30±0,08 ^{**}

Nota: ** $P < 0,01$ frente a Vehículo; ^{##} $P < 0,01$ frente a WKY

Tabla 8. Efecto de los polipéptidos de la presente invención sobre los parámetros ecocardiográficos en SHRS
($\bar{x} \pm s$, n=6).

Grupo	Dosis	PWT (mm)	IVST (mm)	LAD (mm)	LVEDD (mm)	LVEDS (mm)	EF (%)	FS (%)	SV (ml)
WKY	-	1,75±0,19	1,45±0,26	3,43±0,12	5,41±0,32	2,42±0,24	90,1±3,13	55,2±3,99	0,35±0,05
Vehículo	-	2,8±0,21 ^{##}	2,22±0,17 ^{##}	3,33±0,26	5,28±0,58	2,39±0,32	89,1±3,04	54,7±3,06	0,30±0,09
Losartán	6 mg/kg	2,25±0,21 [*]	1,87±0,18 [*]	3,26±0,3	5,05±0,42	2,33±0,18	88,8±2,62	53,6±3,57	0,21±0,04
Pentadecapéptido como referencia	30 µg/kg	1,96±0,16 ^{**}	1,62±0,20 ^{**}	3,39±0,33	5,38±0,31	2,41±0,35	89,4±3,90	55,1±4,33	0,32±0,05
Heptacosapéptido	30 µg/kg	1,85±0,19 ^{**}	1,30±0,24 ^{**}	3,45±0,49	6,35±0,40	2,40±0,21	90,0±1,26	55,1±1,56	0,34±0,06
Pentapentacotapéptido como referencia	30 µg/kg	1,93±0,31 ^{**}	1,44±0,17 ^{**}	3,45±0,37	5,23±0,37	2,23±0,26	90,5±2,41	57,6±4,37	0,30±0,10

Nota: ^{##}: P < 0,01 frente a WKY; ^{*}: P < 0,05, ^{**}: P < 0,01 frente a Vehículo

LAD: diámetro de la aurícula izquierda; LVEDD: diámetro diastólico final ventricular izquierdo; EF: fracción expulsada; FS: fracción de acortamiento; SV: volumen de latido.

(3) Efecto de la serie de polipéptidos de la presente invención sobre la morfología de los tejidos del músculo cardíaco en las SHR:

5 El análisis morfológico sugiere: mientras que el diámetro transversal (TDM) y el área de sección transversal (CSA) del cardiocito en ratas del grupo modelo aumentan significativamente en comparación con las del grupo de WKY ($P < 0,01$), el CSA de las ratas en el grupo dosificado con la serie de polipéptidos y en el grupo de losartán se reduce de forma significativa en comparación con las del grupo modelo significativo ($P < 0,01$) (visto en la tabla 9).

Tabla 9. Análisis morfológico en cardiocitos de rata ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Grupo	Dosis	TDM(μm)	CSA (μm^2)
WKY	-	11,30 \pm 2,35	248 \pm 26
Vehículo	-	15,56 \pm 2,94 ^{##}	375 \pm 11 ^{##}
Losartán	6 mg/kg	13,83 \pm 2,54	335 \pm 20 ^{**}
Pentadecapéptido como referencia	30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	14,88 \pm 2,56	329 \pm 24 ^{**}
Heptacosapéptido	30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	12,33 \pm 1,84 ^{**}	286 \pm 22 ^{**}
Pentapentacontapéptido como referencia	30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	14,62 \pm 2,36	313 \pm 29 ^{**}

$p < 0,01$ frente a WKY; ** $p < 0,01$, ** $p < 0,01$ frente a vehículo

10 Se observó con el microscopio óptico que el núcleo del cardiocito era azul, el plasma celular era rosa y el colágeno no se teñía.

15 En el grupo modelo de SHR (figura 1): las fibras miocárdicas se vuelven gruesas, se hinchan, tienen espacios intermedios no transparentes, se rompen, se fusionan o se disponen de forma desordenada, y parte de las fibras miocárdicas muestran degeneración hidrópica más distinta del miocardio en un área grande; los cardiocitos muestran hipertrofia significativa, tumefacción turbia, degeneración similar a la vacuolar; los núcleos celulares se agrandan o experimentan picnosis; el contenido celular se volvió granular, roto y fusionado, incluso está presente necrosis; focos necróticos localizados y focos necróticos focales se observan en varias vistas; las paredes de los vasos se vuelven gruesas; las células de músculo liso proliferan y se hipertrofian; se observa fibrosis miocárdica intersticial en vistas individuales. Pero en términos generales, el grado de fibrosis es relativamente leve y la respuesta inflamatoria es relativamente grave en el grupo modelo; se observan focos necróticos en varias vistas.

25 En el grupo de losartán (figura 2): Los cambios patológicos mejoran algo y se presentan de forma predominante como infiltración de las células inflamatorias. Puede verse que los cardiocitos muestran cambios inflamatorios, tales como, tumefacción turbia evidente, hipertrofia, etc, y se siguen observando focos necróticos en varias vistas.

30 En el grupo de heptacosapéptido (figura 3): En comparación con el grupo modelo de SHR, los cambios patológicos descritos anteriormente en cardiocitos se alivian de forma significativa. La mejora de los cambios patológicos en el grupo de heptacosapéptido es esencialmente aproximada al estado en el grupo de control normal, y cambios inflamatorios se observan ocasionalmente en vistas individuales, tales como, tumefacción leve de los cardiocitos, etc. No se forman focos necróticos, y las morfologías de las fibras miocárdicas y las paredes de los vasos se mantienen normales.

35 (4) Efecto del heptacosapéptido sobre la ultraestructura del cardiocito de SHR (microscopio de transmisión electrónica PHILIPS-TECNI10, Holanda):

40 En el grupo modelo SHR (figura 4): el volumen del cardiocito aumenta, su membrana nuclear es incompleta, su núcleo presenta cambios irregulares tales como hipertrofia, deformación, lisis, etc; el retículo sarcoplásmico se dilata; las mitocondrias proliferan, se disponen de forma desordenada, y se hinchan en diversos grados (leve, moderada o gravemente), dentro de las cuales se forman vacuolusas; los miofilamentos están esencialmente en disposición normal, y experimentan lisis focal en parte de los cardiocitos; pueden observarse estrías transversales difusas en zonas locales, y las líneas Z son esencialmente normales, unas pocas de las cuales se disponen de forma desordenada; las fibras de colágeno intersticiales no tienen proliferación significativa.

45 En el grupo de losartán (figura 5): la morfología del núcleo celular es esencialmente normal y algo irregular; los miofilamentos bajo la membrana plasmática experimentan lisis focal; las mitocondrias están levemente hinchadas; el retículo sarcoplásmico está dilatado y levemente hinchado; la estructura de la línea Z y la estría transversal son esencialmente normales,

50 En el grupo de heptacosapéptido (Figure 6): En comparación con el grupo modelo de SHR, la ultraestructura miocárdica mejora significativamente. La estructura del cardiocito es esencialmente normal, es decir, el sarcómero y los miofilamentos de su cardiocito son esencialmente normales; las estrías transversales son claras; las fibras de colágeno intersticiales no tienen proliferación significativa; las líneas Z están dispuestas en orden; las mitocondrias

no tienen proliferación significativa, algunas de las cuales están levemente hinchadas; los miofilamentos experimentan lisis leve; y las células endoteliales en los vasos capilares son normales.

5 Aunque los ejemplos anteriores se dan a conocer en el presente documento, las realizaciones de la presente invención no están limitadas a los ejemplos mencionados anteriormente; pueden realizarse diversas variaciones de las realizaciones según la presente invención sin alejarse del espíritu de la presente invención y en cualquier caso estarán dentro del alcance definido por las reivindicaciones de la presente invención.

Referencia:

- 10 1. Cooper G 4th. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. *Annu Rev Med*, 1997, 48: 13 - 23.
- 15 2. Aoki H, Sadoshima J, Izumo S. Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nat Med* 2000, 6(2): 183-188.
3. McKinsey TA, Kass DA. Small-molecule therapies for cardiac hypertrophy: moving beneath the cell surface. *Nat Rev Drug Discov*. 2007; 6(8): 617-635.
- 20 4. Mitchell JA, Ventura HO, Mehra MR. Early recognition and treatment of hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2005; 20(4): 282-289.
- 5 5. Jalili T, Carlstrom J, Kim S, Freeman D, Jin H, Wu TC, Litwin SE, David Symons J. Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47(4): 531-541.
6. Carlstrom J, Symons JD, Wu TC, Bruno RS, Litwin SE, Jalili T. A quercetin supplemented diet does not prevent cardiovascular complications in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 2007; 137(3): 628-633.
- 30 7. Niizeki T, Takeishi Y, Kitahara T, y otros. Diacylglycerol Kinase zeta Rescues Galphaq-Induced Heart Failure in Transgenic Mice. *Circ J*. 2008; 72(2): 309-317.
8. Dorn GW 2nd, Tepe NM, Lorenz JN, Koch WJ, Liggett SB. Low- and high-level transgenic expression of β 2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in G α q-overexpressing mice. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*. 1999; 96(11): 6400-6405.
- 35 9. Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289(1): H8-H16.

40 Listado de secuencias

<110> LI, Xiaohui
 TERCERA UNIVERSIDAD MÉDICA MILITAR
 CHONGQING ZHAOKANGLIHUI MEDITECH CO., LTD
 45 CHONGQING QINGYANG PHARMACEUTICAL CO., LTD

<120> POLIPÉPTIDOS INHIBIDORES COMPETITIVOS DE LA PROTEÍNA Gq, MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y UTILIZACIONES DE LOS MISMOS

50 <130> DP1F080358ZX/CNSJY/YL

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

55

<210> 1
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> ser humano

60

<400> 1

ES 2 427 836 T3

Ala Arg Glu Phe Ile Leu Lys Met Phe Val Asp Leu Asn Pro Asp Ser

1 5 10 15

Asp Lys Ile Ile Tyr Ser His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn

20 25 30

Ile Arg Phe Val Phe Ala Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn

35 40 45

Leu Lys Glu Tyr Asn Leu Val

50 55

<210> 2

<211> 45

5 <212> PRT

<213> ser humano

<400> 2

Asp Leu Asn Pro Asp Ser Asp Lys Ile Ile Tyr Ser His Phe Thr Cys

1 5 10 15

Ala Thr Asp Thr Glu Asn Ile Arg Phe Val Phe Ala Ala Val Lys Asp

20 25 30

Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Tyr Asn Leu Val

35 40 45

10

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

15 <213> ser humano

<400> 3

Tyr Ser His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn Ile Arg Phe Val

1 5 10 15

Phe Ala Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Tyr

 20 25 30

Asn Leu Val

35

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

5 <213> ser humano

<400> 4

Cys Ala Thr Asp Thr Glu Asn Ile Arg Phe Val Phe Ala Ala Val Lys

1 5 10 15

Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Tyr Asn Leu Val

 20 25 30

<210> 5

10 <211> 27

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 5

Asp Thr Glu Asn Ile Arg Phe Val Phe Ala Ala Val Lys Asp Thr Ile

1 5 10 15

Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Tyr Asn Leu Val

 20 25

15 <210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> ser humano

20 <400> 6

Glu Asn Ile Arg Phe Val Phe Ala Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln

1 5 10 15

Leu Asn Leu Lys Glu Tyr Asn Leu Val

20 25

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

5 <213> ser humano

<400> 7

Val Phe Ala Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu

1 5 10 15

Tyr Asn Leu Val

20

<210> 8

10 <211> 17

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 8

Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Tyr Asn Leu

1 5 10 15

Val

15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> ser humano

20

<400> 9

Lys Asp Thr Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Tyr Asn Leu Val

1 5 10 15

<210> 10

<211> 12

25 <212> PRT

<213> ser humano

ES 2 427 836 T3

<400> 10

Ile Leu Gln Leu Asn Leu Lys Glu Tyr Asn Leu Val

1

5

10

<210> 11

<211> 165

5 <212> ADN

<213> ser humano

<400> 11

gcccgagaat tcattctgaa gatgttcgtg gacctgaacc cagacagtga caaaattatc 60

tactcccact tcacgtgtgc cacagacacc gagaatatcc gctttgtctt tgcagccgtc 120

aaggacacca tctccagct gaacctgaag gagtacaatc tggtc 165

10 <210> 12

<211> 135

<212> ADN

<213> ser humano

15 <400> 12

gacctgaacc cagacagtga caaaattatc tactcccact tcacgtgtgc cacagacacc 60

gagaatatcc gctttgtctt tgcagccgtc aaggacacca tctccagct gaacctgaag 120

gagtacaatc tggtc 135

<210> 13

<211> 105

<212> ADN

20 <213> ser humano

<400> 13

tactcccact tcacgtgtgc cacagacacc gagaatatcc gctttgtctt tgcagccgtc 60

aaggacacca tctccagct gaacctgaag gagtacaatc tggtc 105

25 <210> 14

<211> 90

<212> ADN

<213> ser humano

<400> 14

	tgtgccacag acaccgagaa tatccgcttt gtctttgcag ccgtaagga caccatcctc	60
	cagctgaacc tgaaggagta caatctggtc	90
	<210> 15	
	<211> 81	
	<212> ADN	
5	<213> ser humano	
	<400> 15	
	gacaccgaga atatccgctt tgtctttgca gccgtcaagg acaccatcct ccagctgaac	60
	ctgaaggagt acaatctggt c	81
	<210> 16	
10	<211> 75	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
	<400> 16	
	gagaatatcc gctttgtctt tgcagccgtc aaggacacca tctccagct gaacctgaag	60
	gagtacaatc tggtc	75
15	<210> 17	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
20	<400> 17	
	gtctttgcag ccgtaagga caccatcctc cagctgaacc tgaaggagta caatctggtc	60
	<210> 18	
	<211> 51	
25	<212> ADN	
	<213> ser humano	
	<400> 18	
	gccgtcaagg acaccatcct ccagctgaac ctgaaggagt acaatctggt c	51
30	<210> 19	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> ser humano	
35	<400> 19	

aaggacacca tccctccagct gaacctgaag gagtacaatc tggtc

45

<210> 20

<211> 36

<212> ADN

5 <213> ser humano

<400> 20

atcctccagc tgaacctgaa ggagtacaat ctggtc

36

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 2.
- 5 2. Polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 3.
3. Polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 5.
- 10 4. Polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 6.
5. Polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 7.
6. Polipéptido tal como se muestra en la SEC ID N° 8.
- 15 7. Formulación, que comprende los polipéptidos, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y aditivos farmacéuticamente aceptables.
8. Formulación, según la reivindicación 7, en la que la formulación es una inyección parenteral.
- 20 9. Utilización del polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la fabricación de un fármaco, junto con aditivos farmacéuticamente aceptables, para tratar hipertrofia miocárdica.
10. Procedimiento de preparación del polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende la etapa de:
25 realizar síntesis polipeptídica según la secuencia de aminoácidos, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en un sintetizador de polipéptidos.
- 30 11. Procedimiento de preparación del polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende la etapa de:
ligar la secuencia de nucleótidos correspondiente en un vector para formar un vector recombinante;
transformar dicho vector recombinante en una célula huésped;
35 inducir a dicha célula huésped a expresar dicho polipéptido;
separar dicho polipéptido.
- 40 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que dicho vector es el plásmido pIVEX2.3MCS, y dicha célula huésped es la cepa BL21 de *Escherichia coli*.



Figura 1



Figura 2

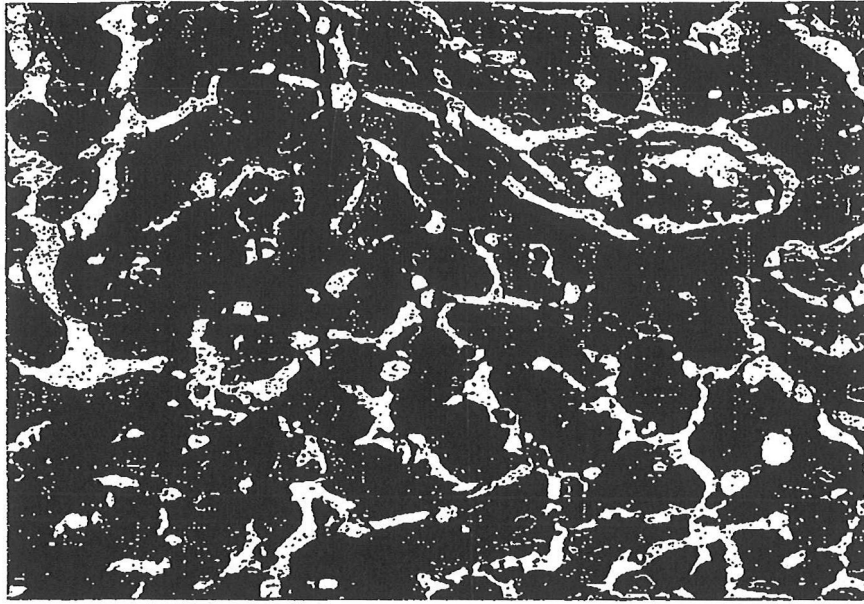


Figura 3

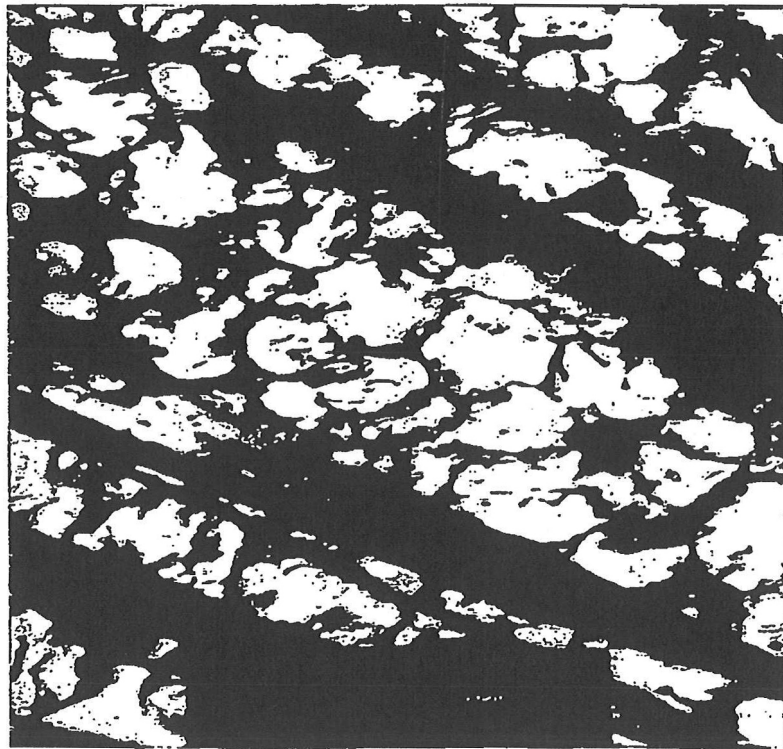


Figura 4

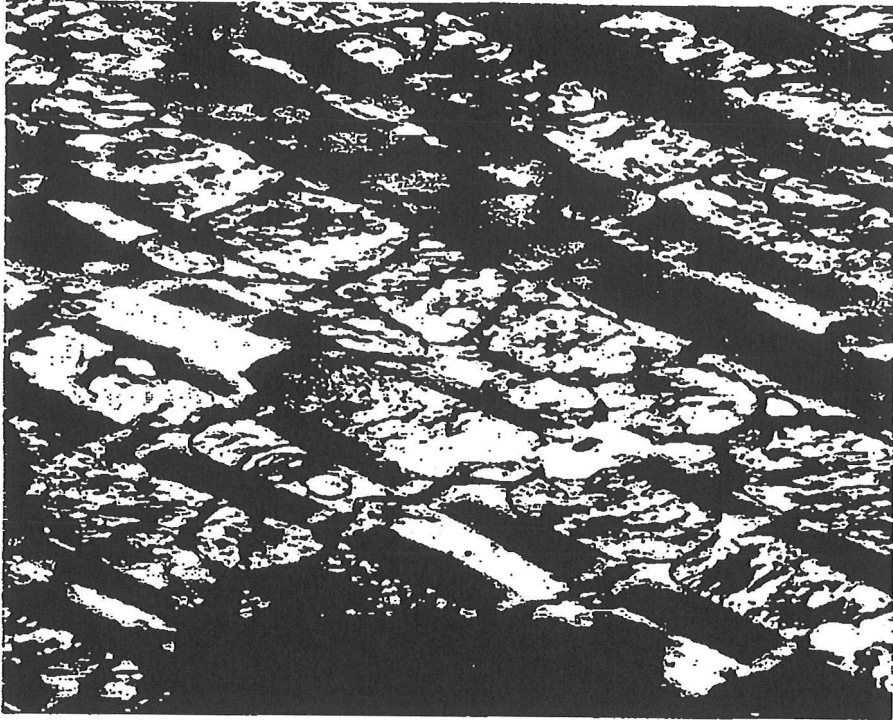


Figura 5

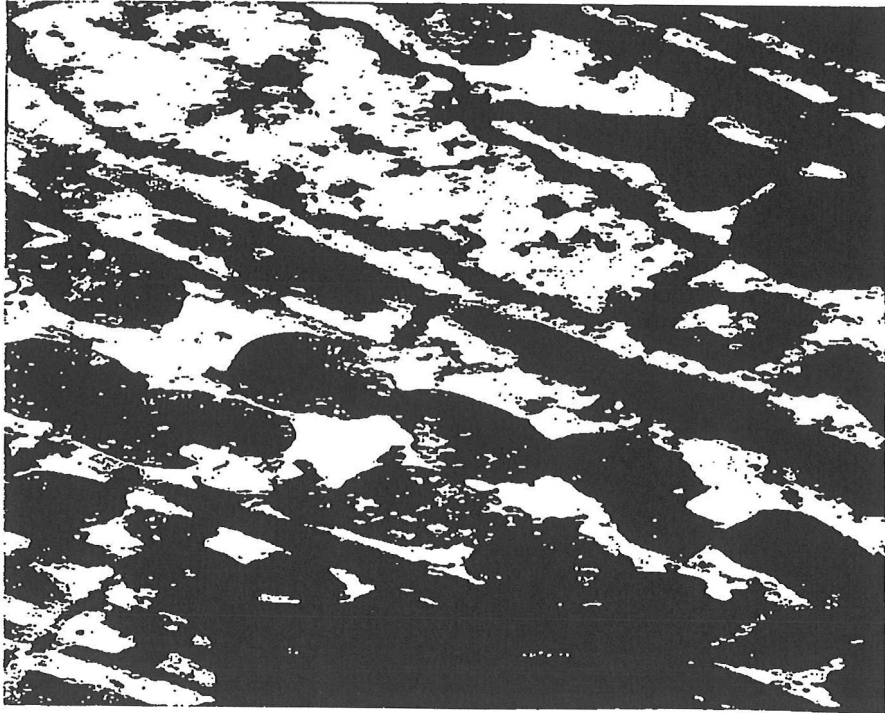


Figura 6