(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 524 564**

(51) Int. CI.:

C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2010 E 10703318 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2387581**

(54) Título: **Identificación de nuevas toxinas antagonistas de canales de calcio de tipo T de aplicación analgésica**

(30) Prioridad:

15.01.2009 FR 0900174

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2014

(73) Titular/es:

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16 , FR y
UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS (50.0%)

(72) Inventor/es:

BOURINET, EMMANUEL;
ESCOUBAS, PIERRE;
MARGER, FABRICE;
NARGEOT, JOËL y
LAZDUNSKI, MICHEL

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Identificación de nuevas toxinas antagonistas de canales de calcio de tipo T de aplicación analgésica

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a una toxina antagonista de canales de calcio de tipo T ("canales de tipo T"). En particular, se refiere a un péptido compuesto por un péptido, a ácidos nucleicos que codifican este péptido y al uso de dicho péptido como antagonista y/o agonista inverso de canales de calcio de tipo T. La presente invención se refiere igualmente al uso de este péptido para la fabricación de un medicamento.

Encuentra aplicación especialmente en el tratamiento del dolor, en patologías cardiovasculares, en el tratamiento de la disfunción eréctil y potencialmente en el tratamiento de cánceres.

En la descripción siguiente, las referencias indicadas como " Ref. " remiten a la lista de referencias presentadas después de los ejemplos.

Estado de la técnica

La toma en consideración y el tratamiento del dolor son esenciales para la calidad de vida. El dolor afecta a un número significativo de personas. En Europa, se estima que 60 millones de personas están afectadas cada año por el dolor, lo que representa un coste anual de 1.000 millones de dólares en medicamentos para su tratamiento. Los gastos efectuados anualmente en medicamentos analgésicos pueden evaluarse en aproximadamente 25.000 millones de dólares y deberían alcanzar los 42.000 millones en 2010. El dolor se divide en dos categorías: el dolor agudo y el dolor crónico. El dolor agudo corresponde a un dolor rápido y breve, limitado en el tiempo, en contraposición con el dolor crónico, que es un dolor persistente y que puede estar ligado, por ejemplo, a una hiperalgesia.

Se han efectuado numerosos estudios referentes a la identificación de los mecanismos que permiten la transmisión del dolor. La transmisión de la señal de dolor por el sistema nervioso hace intervenir a receptores neuronales que transforman el estímulo doloroso en una señal eléctrica. Esta se transmitirá entonces al sistema nervioso central por los nervios, haciendo intervenir a receptores moleculares específicos.

Entre las diversas neuronas sensoriales, se pueden citar las neuronas nociceptivas, que reaccionan específicamente a los estímulos dolorosos.

A causa de su especificidad, las neuronas nociceptivas poseen un repertorio único de canales iónicos, que son proteínas responsables de la excitabilidad celular, y que representan una clase importante de dianas de medicamentos. Así, los canales iónicos expresados específicamente en las neuronas nociceptivas representan también dianas para el descubrimiento de nuevos analgésicos.

Las moléculas que inhiben el dolor, o analgésicos, son conocidas desde hace mucho tiempo. Se pueden citar, por ejemplo, la clase de los opiáceos, que actúan sobre la señalización de la señal de dolor y estimulan las vías nerviosas inhibidoras del dolor. Se usan otras moléculas para tratar los dolores crónicos. Son, por ejemplo, moléculas que actúan sobre los receptores de GABA como badofeno, diazepám, tizanidina y dartroleno.

Las moléculas analgésicas usadas actualmente presentan varios inconvenientes. Es bien conocido que los derivados de los opioides pueden provocar fenómenos alucinatorios y depresiones cardiorrespiratorias. Son igualmente fuente de dependencias, como por ejemplo dependencia de morfina, metadona, etc. Por último, el tratamiento con opiáceos está asociado a efectos indeseables como un estreñimiento grave.

Existen igualmente casos de habituación de estos medicamentos, es decir, que deba aumentarse la dosis necesaria para obtener un efecto constante. Esta habituación crece con el tiempo y conlleva por tanto la necesidad de aumentar las dosis y puede conllevar la ineficacia del medicamento. Efectivamente, la cantidad necesaria puede volverse superior a la dosis tóxica de dicho medicamento.

Por ejemplo, en el caso de dolores neuropáticos, que pueden aparecer en casos de diabetes, cáncer, tratamientos quimioterapéuticos, dolores inflamatorios crónicos, casos de síndrome del colon irritable, etc., el tratamiento del dolor con analgésicos y antálgicos conocidos induce frecuentemente un fenómeno de habituación y por tanto problemas de tratamiento de estos dolores.

Existe por tanto una necesidad real de encontrar nuevas moléculas analgésicas o antálgicas que palien estos defectos, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior con el fin de reducir los costes y mejorar el tratamiento del dolor y el bienestar de los pacientes.

Exposición de la invención

Los inventores han mostrado mediante experimentos de inhibición de la expresión del gen Cacna1h, que codifica el canal de calcio de tipo T $Ca_v3.2$ presente en los nocirreceptores, que dicho canal está implicado en la percepción del dolor.

Los canales Cav3.2 forman parte de la familia de los canales de calcio de "umbrales bajos" o "de tipo T" y se expresan en neuronas nociceptivas

Al usar un enfoque de represión génica por inyección intratecal de ADN anticodificante en rata, como se describe en Bourinet, E., *et al.*, "Silencing of the CaV3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception". Embo J.' 2005. 24(2) : pág. 315-24 (Ref 1), los inventores han demostrado que la disminución de los canales de calcio $Ca_v3.2$ en neuronas nociceptivas de animales sanos o en estado de neuropatía conlleva una analgesia espectacular. En consecuencia, los canales de calcio de tipo T representan una diana potencial para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos del tratamiento del dolor.

Por otro lado, se ha demostrado que los canales de calcio $Ca_v3.2$ están implicados en la proliferación celular (Taylor, J.T., Zeng, X.B., Pottle, J.E., Lee, K., Wang, A.R., Yi, S.G., Scruggs, J.A., Sikka, S.S. y Li, M. (2008) "Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling". World J. Gastroenterol., 14, 4984-4991 (Ref 8)) y en la regulación de la tensión sanguínea (Chen, C.C., Lamping, K.G., Nuno, D.W., Barresi, R., Prouty, S.J., Lavoie, J.L., Cribbs, L.L., England, S.K., Sigmund, C.D., Weiss, R.M., Williamson, R.A., Hill, J.A. y Campbell, K.P. (2003) "Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca2+ channels". Science, 302, 1416-1418. (Ref 9)). Los canales de calcio de tipo T representan una diana potencial para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos del tratamiento del de hipertensión y cánceres, por ejemplo cánceres ligados a una proliferación anárquica de las células cancerosas.

Puede tratarse de cánceres de diversos órganos, por ejemplo:

- cáncer de próstata (véase Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoï-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P.(2008) "CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells". J. Biol. Chem., 283(15): 10162-73 (Ref 16),

- glioma (véase Panner A, Cribbs LL, Zainelli GM, Origitano TC, Singh S, Wurster RD. (2005) "Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells". Cell Calcium, 37(2): 105-19 (Ref 11)),

- carcinoma de esófago (véase Lu F, Chen H, Zhou C, Liu S, Guo M, Chen P, Zhuang H, Xie D, Wu S. (2008) "T-type Ca2+ channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation" Cell Calcium. 43(1): 49-58 (Ref 12))

- cáncer de mama (véase Taylor JT, Huang L, Pottle JE, Liu K, Yang Y, Zeng X, Keyser BM, Agrawal KC, Hansen JB, Li M (2008) "Selective blockade of T-type Ca2+ channels suppresses human breast cancer cell proliferation". Cancer Lett., 18; 267(1): 116-24 (Ref 13).

En particular, es el objeto de la presente patente un enfoque farmacológico que usa antagonistas selectivos del canal Cav3.2 de tipo T.

La invención responde precisamente a la necesidad de encontrar nuevas moléculas analgésicas o antálgicas que proporcionen una nueva molécula capaz de inhibir especialmente una señal de dolor, más particularmente una molécula capaz de inhibir los receptores responsables de esta señal. Esta molécula es un péptido de secuencia: YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1).

Se entiende por "derivado" que estos "fragmentos" o "derivados" son aquellos que conservan las propiedades del péptido de la presente invención. Puede considerarse igualmente que los derivados o fragmentos son análogos del péptido de la presente invención.

Por ejemplo, un derivado puede ser el péptido de secuencia ID NO1 con modificaciones en al menos uno de los aminoácidos. Las modificaciones son, por ejemplo, las siguientes:

- reemplazo de al menos un aminoácido por otro de la misma familia (aromática, hidrófoba, básica, etc.);

- reemplazo de un aminoácido natural (aminoácido L) por el mismo aminoácido en forma D;

- reemplazo de un enlace peptídico entre dos aminoácidos por un enlace seudopeptídico.

- modificación independiente de los extremos N y C terminales del péptido.

Estos derivados podrán comprender aminoácidos naturales, aminoácidos modificados, por ejemplo selenocisteínas, aminoácidos no naturales y/o modificaciones de la estructura del péptido como ciclaciones.

Los derivados pueden comprender igualmente, por ejemplo, péptidos modificados con vistas a un marcaje por agentes como biotina, agrupamientos fluoróforos o un isótopo radiactivo.

Las modificaciones de los extremos N o C terminales pueden ser, por ejemplo, isoprenilación, glipiación, miristoilación o palmitoilación. El extremo C terminal puede modificarse igualmente, por ejemplo, por amidación, que conduce a la formación de una función amida en el extremo C terminal. Se presentan ejemplos de modificaciones postraduccionales encontradas en péptidos en Han KK, Martinage A (1992) "Post-translational chemical modification(s) of proteins". Int. J. Biochem. 24(1): 19-28 y Walsh G, Jefferis R (2006) "Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins", Nature Biotechnology - 24, 1241-1252 (Ref 17)). Estas modificaciones son modificaciones que pueden encontrarse en toxinas de insectos (véase, por ejemplo, Escoubas P. (2006) "Molecular diversification in spider venoms: a web of combinatorial peptide libraries". Mol Divers. 10(4): 545-54 (Ref 18)).

En la descripción siguiente, se entiende por péptido de secuencia ID NO 1 la secuencia peptídica ID NO 1 o una secuencia derivada de la misma.

La invención responde igualmente a la necesidad de encontrar nuevas moléculas antihipertensivas al proporcionar una nueva molécula especialmente capaz de disminuir la presión arterial.

La invención responde igualmente a la necesidad de encontrar nuevas moléculas para el tratamiento del cáncer al proporcionar una nueva molécula especialmente capaz de inhibir la proliferación celular.

La nueva molécula de la presente invención es un péptido. Este péptido se ha aislado por primera vez por los inventores a partir del veneno de una araña del género *Paraphysa* (Psp3) (*Araneae: Theraphosidae*).

También, la presente invención se refiere igualmente a cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido de secuencia YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1).

El ácido nucleico de la presente invención puede ser cualquier secuencia que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO 1, teniendo en cuenta la degeneración del código genético. Por ejemplo, puede tratarse de ácidos nucleicos de las secuencias siguientes:

5' TAT TGC CAG AAA TTT CTG TGG ACC TGC GAT AGC GAA CGC CCG TGC TGC GAA GGC CTG GTG TGC CGC CTG TGG TGC AAA ATT AAC 3' (SEQ ID NO 2)

5' TAY TGY CAR AAR TTY YTN TGG ACN TGY GAY WSN GAR MGN CCN TGY TGY GAR GGN YTN GTN TGY MGN YTN TGG TGY AAR ATH AAY 3' (SEQ ID NO 3)

en las que A es adenosina, C es citidina, G es guanosina, T es timidina y H es A o C o T, M es A o C, N es A o C o G o T, R es A o G, S es C o G, W es A o T e Y es C o T:

La invención se refiere igualmente a un sistema de expresión que comprende un plásmido y/o un vector de expresión que codifica el péptido de SEQ ID NO 1.

En la presente, el sistema de expresión puede comprender al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido de secuencia YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1).

Se entiende por "vector de expresión" en la presente una secuencia de ácidos nucleicos en la que es posible insertar uno o varios fragmentos de ácidos nucleicos que se desea expresar en un hospedador. El vector de expresión puede constar de elementos que permitan la expresión de la secuencia de ácido nucleico en el hospedador. Por ejemplo, el vector puede comprender una secuencia promotora o una secuencia que codifica un péptido señal. Los vectores pueden ser cualquier vector conocido por el especialista en la materia.

Por ejemplo, los vectores de expresión pueden elegirse del grupo que comprende plásmidos, virus, vectores bacterianos, cromosomas artificiales de levadura (YAC) y cromosomas artificiales de bacterias (BAC). Los vectores de expresión pueden ser igualmente vectores de sobreexpresión de proteínas recombinantes con o sin fusión con una proteína soluble como, por ejemplo, GST o tiorredoxina o cualquier otra proteína de fusión conocida por el especialista en la materia.

Por ejemplo, los vectores utilizables en la presente invención pueden elegirse especialmente del grupo que comprende el plásmido pT7-7 (SEQ ID NO 4, Figura 5), un plásmido de la serie pGEX (SEQ ID NO 5, Figura 6),

comercializado por ejemplo por la compañía Pharmacia, o un plásmido de la serie pET32 (SEQ ID NO 6, Figura 7), comercializado por ejemplo por la compañía Novagen.

Se describe un hospedador que comprende un vector de expresión del péptido de secuencia YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO1) .

En la presente, se entiende por "hospedador" cualquier célula que pueda transformarse con un vector de expresión o modificarse genéticamente con el fin de producir el péptido de la invención.

La transformación de dicho "hospedador" puede realizarse, por ejemplo, mediante electroporación o cualquier otro método conocido por el especialista en la materia. La secuencia que codifica el péptido de secuencia ID NO 1 usado en la transformación puede ser libre o incorporarse a uno de los vectores anteriormente citados. Después de la introducción, puede incorporarse dicha secuencia de ácidos nucleicos al genoma del hospedador mediante recombinación genética, permanecer en forma libre en el hospedador y/o permanecer en el vector, siendo reconocida a continuación dicha secuencia de ácidos nucleicos por las proteínas y/o enzimas del hospedador y expresándose por el mismo.

El hospedador puede elegirse del grupo que comprende células eucarióticas o procarióticas, por ejemplo bacterias como *Escherichia coli*, levaduras como *Pichia pastoris*, células de insectos como células de *Drosophila* o *Spodoptera*, células de mamíferos y cualquier otra célula conocida por el especialista en la materia que permita la producción de péptidos y/o de proteínas a partir de vectores de expresión.

Las células procarióticas o eucarióticas pueden permitir, de preferencia, la sobreexpresión del péptido que codifica el vector. Así, es utilizable cualquier célula hospedadora capaz de expresar un vector de expresión del péptido de la invención, por ejemplo, *Escherichia coli*.

Preferiblemente, las células eucarióticas o procarióticas elegidas son aquellas que permiten la sobreexpresión del péptido de la invención. Por ejemplo, se trata de células Sf9 de Spodoptera, de células S2 de *Drosophile*, de levaduras de tipo *Pichia pastoris* o de bacterias *Escherichia coli*.

Los inventores muestran en los ejemplos siguientes que el péptido de secuencia SEQ ID NO 1 es un antagonista o un antagonista parcial de los canales de tipo T.

También la presente invención se refiere igualmente al péptido de secuencia YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) como antagonista de un canal de calcio de tipo T.

También la presente invención se refiere igualmente al péptido que es antagonista de un canal de calcio de tipo T de secuencia de aminoácidos: YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO:1).

Se entiende por "antagonista" un agente, por ejemplo una molécula química, una proteína, un péptido, etc., que interacciona con un sitio receptor sobre un canal y que impide funcionar dicho canal.

El antagonista puede disminuir eficazmente el efecto farmacológico del agonista, se trata entonces de un "antagonista parcial".

La invención tiene igualmente como objeto el uso del péptido de secuencia SEQ ID NO 1 como agonista inverso de un canal de tipo T. Se entiende por "agonista inverso" un agente, por ejemplo una molécula química, una proteína, etc., que interacciona con el mismo receptor que un agonista de este receptor pero que produce el efecto farmacológico opuesto.

En otros términos, el antagonista, antagonista parcial o agonista inverso puede ser una sustancia que se fija sobre los mismos receptores celulares al nivel de sitios idénticos o diferentes de una sustancia de referencia, impidiéndola producir todos o parte de sus efectos habituales o produciendo el efecto inverso.

En la presente, se entiende por "canales de calcio de tipo T" los canales de calcio de bajo umbral de activación, es decir, que tienen un potencial de activación comprendido entre -80 y -20 mV, de preferencia entre -70 y -50 mV

Por ejemplo, los canales de calcio de tipo T pueden ser canales de calcio generados por las subunidades $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$ y todas sus variantes de corte y empalme en asociación con sus subunidades reguladoras o no.

Preferiblemente, el péptido se usa como antagonista y/o agonista inverso de los canales de calcio de tipo T.

Aún más preferiblemente, el péptido es un antagonista y/o agonista inverso de los canales de calcio $Ca_v3.2$ y/o de los canales de calcio $Ca_v3.1$ y/o $Ca_v3.3$.

La presente invención se refiere igualmente al péptido antagonista de un canal de calcio de tipo T de secuencia de aminoácidos: YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO:1), siendo dicho canal un canal elegido del grupo que comprende el canal Cav3.2 y el canal Cav3.1.

La invención tiene igualmente como objeto el uso del péptido de secuencia YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) y/o de un ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) para la fabricación de un medicamento. Este medicamento puede ser para uso humano o veterinario.

En la presente, el péptido puede estar asociado a cualquier soporte farmacológicamente aceptable con el fin, por ejemplo, de mejorar su biodisponibilidad, su solubilidad, su estabilidad en solución y/o la fabricación del medicamento.

La presente invención se refiere igualmente al péptido de secuencia de aminoácidos: YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO:1), para su uso como medicamento.

La presente invención se refiere igualmente al péptido de secuencia de aminoácidos: YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO:1), para su uso en el tratamiento del dolor.

La presente invención se refiere igualmente al péptido de secuencia de aminoácidos: YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO:1), para su uso como medicamento analgésico.

En la presente, se entiende por "soporte farmacéuticamente aceptable" cualquier compuesto conocido por el especialista en la materia por usarse en medicamentos. Puede tratarse, por ejemplo, de los compuestos citados en la obra "Pharmacie galénique" de A. LEHIR (Ed. Masson, 1992 (6ª edición)) (Ref 7).

En la presente, se entiende por "asociación" un enlace covalente con el soporte, un enlace por interacciones iónicas o la presencia de una solución del soporte y del péptido de la invención.

El medicamento que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO 1 puede formularse de cualquier forma que permita su administración a un paciente o animal. Puede tratarse, por ejemplo, de una formulación que permita una administración por vía oral, intravenosa, peridural, cutánea o transdérmica.

En la presente, se entiende por "formulación" una formulación inyectable (por ejemplo, como por Octaplex (marca registrada) o Synergon (marca registrada)), una formulación oral, por ejemplo un jarabe, un polvo (por ejemplo, como por Octaplex (marca registrada)), gránulos, un comprimido (como, por ejemplo, por Estima (marca registrada), un comprimido con película (como por ejemplo por Provames (marca registrada)), una cápsula, un pulverizador, una formulación local como por ejemplo una crema (como por ejemplo por la crema Trophicrème (marca registrada)), una loción, un gel, una formulación ocular, por ejemplo un colirio, una formulación para inyección intravenosa, una formulación inyectable por dispositivos de autoinyección de tipo lápiz de insulina, un parche transdérmico, comprimidos disponibles orales, una formulación para ingestión sublingual o una formulación para inyección peridural.

Por ejemplo, puede tratarse igualmente de las diferentes composiciones farmacéuticas descritas en la obra "Pharmacie galénique" de A. LEHIR (Ed. Masson, 1992 (6ª edición)) (Ref 7).

El medicamento puede administrarse, por ejemplo, en forma de cápsulas, comprimidos, parches, soluciones inyectables, supositorios y/o polvos.

La concentración del péptido de la invención en el medicamento y/o el producto veterinario puede ser cualquier concentración eficaz desde el punto de vista farmacéutico y aceptable por el paciente o animal tratado, incluyendo por ejemplo entre 1 nM y 1000 nM.

El medicamento que comprende el péptido de la invención se administra de preferencia con el fin de obtener una concentración intravenosa que permita un efecto biológico. Esta concentración plasmática eficaz puede determinarse igualmente, por ejemplo, según el tiempo de semivida del péptido de la invención después de su inyección por vía intravenosa en un mamífero y por medida de su concentración por espectrometría de masas. El tiempo de semivida corresponde al tiempo necesario para que la concentración de dicho medicamento sea igual a la mitad de la concentración inicial.

El medicamento y/o el producto veterinario que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO 1 puede acondicionarse para una administración de una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cada dos días, cada tres días o una vez por semana.

El modo de administración y la cantidad administrada pueden adaptarse a cada individuo y pueden determinarse por el facultativo, especialmente en función de las características fisiológicas del individuo tratado.

En la presente, el medicamento puede ser un producto para el tratamiento de dolor, migraña, epilepsia, enfermedad de Parkinson, disritmias talámicas, trastornos del sueño y la vigilia, trastornos bipolares, patologías cardiovasculares (hipertrofia cardiaca, hipertensión), patologías ligadas a la liberación de aldosterona, disfunciones eréctiles y patologías cancerosas.

De preferencia, el medicamento de la presente invención es un producto para el tratamiento del dolor, por ejemplo un antálgico, un analgésico o un antialodínico.

Preferiblemente, el medicamento y/o el producto veterinario de la presente invención es un analgésico.

La presente invención tiene igualmente como objeto un procedimiento de síntesis del péptido de secuencia YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) que comprende una etapa de síntesis química sobre soporte sólido o una síntesis por recombinación genética.

El procedimiento de síntesis en la presente invención es un procedimiento de síntesis química sobre soporte sólido o una síntesis por recombinación genética.

El procedimiento de síntesis por recombinación genética puede usar un sistema de expresión o un vector tal como se definen anteriormente.

El procedimiento de síntesis del péptido de la invención por recombinación genética puede comprender especialmente las etapas siguientes:

- transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención,
- cultivar la célula hospedadora transformada en condiciones de cultivo tales que fabrique el péptido de la invención a partir de dicho vector de expresión y,
- recuperar dicho péptido fabricado por la célula hospedadora.

Las etapas de transformación, de cultivo, así como de aislamiento del péptido pueden realizarse mediante técnicas habituales de la recombinación genética, por ejemplo, las técnicas descritas en el documento Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular cloning, A laboratory manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (Ref 3).

Por ejemplo, el péptido de secuencia SEQ ID NO 1 puede prepararse mediante técnicas clásicas de síntesis química en fase sólida, por ejemplo, según la metodología de síntesis peptídica sobre soporte sólido ("Fmoc solid Phase peptide synthesis, a practical approach", publicado por W.C. Chan y P. D.White, Oxford university press, 2000 (Ref 4)).

Otras características y ventajas de la invención surgirán con la lectura de la descripción siguiente, con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama que representa el perfil de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de veneno de Psp3 (columna de fase inversa) (parte superior) expresado en mUA en función del tiempo. El diagrama inferior representa el perfil de cromatografía de HPLC (columna de intercambio iónico) de las fracciones indicadas por la parte gris del diagrama superior. La parte gris del perfil de HPLC inferior corresponde a un pico puro que contiene la toxina Psp3Tx1.

La Figura 2 es un diagrama que representa la corriente generada por los canales $Ca_v3.2$ en nanoamperios (nA) en función del tiempo. La curva muestra el efecto de aplicación de una parte de la Psp3Tx1 purificada por HPLC presentado en la Figura 1 sobre la actividad del canal $Ca_v3.2$ expresado en ovocitos de *Xenopus*. La corriente se registra en una solución que contiene bario 5 mM como portador de cargas y se provoca por una despolarización a -30 mV a partir de un potencial de reposo de -100 mV.

La Figura 3 es un diagrama que representa varios registros de corrientes de tipo T en nanoamperios en función del tiempo generados por la subunidad CaV3.2 a varios potenciales antes (control) y durante la aplicación de la Psp3Tx1 (Psp3TX1).

La Figura 4 es un diagrama que representa las relaciones de corriente-potencial para los registros presentados en la Figura 3. La abscisa representa la corriente en nanoamperios en función del potencial en milivoltios (mV).

Figura 5: secuencia del plásmido pT7-7 (SEQ ID NO 4).

Figura 6: secuencia del plásmido de la serie pGEX (SEQ ID NO 5).

Figura 7: secuencia del plásmido de la serie pET32 (SEQ ID NO 6).

La Figura 8 es un diagrama que representa el porcentaje de inhibición de la corriente generada por los canales $Ca_v3.2$ en función de la concentración de la toxina. La ordenada representa el porcentaje de inhibición de la corriente generada por los canales $Ca_v3.2$ y la abscisa el logaritmo decimal de la concentración molar de la toxina. La curva

con círculos negros corresponde a la curva de inhibición con la toxina Psp3Tx1, la curva con círculos blancos corresponde a la curva de inhibición con la toxina sintética.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: caracterización del péptido de la invención

Se diluyó el veneno de PARAPHYSA SP3 a 1:1000 en la solución extracelular usada para análisis de fijación de membrana. Esta solución es de la composición siguiente (en mM): NaCl 135, TEACl 20, HEPES 10, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1 (pH 7,3 con TEAOH).

Se transfectaron células HEK293 con un plásmido de expresión pcDNA3 que contenía ADN complementario del canal de calcio Cav3.2 humano y un gen informador (CD8) con la ayuda del reactivo jetPEI™ (distribuido por la compañía Q-biogen). Después de 48 horas de expresión, se dispersaron las células transfectadas con la ayuda de tripsina y se sembraron después a baja densidad en placas de cultivo para análisis de fijación de membrana.

Se localizaron las células transfectadas positivamente con la ayuda de bolas magnéticas recubiertas con un anticuerpo anti-CD8 (Dynal) como se describe anteriormente en Jiménez, C., Bourinet, E., Leuranguer, V., Richard, S., Snutch, T.P. y Nargeot, J. (2000) "Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels." Neuropharmacology, 39, 1-10 (Ref 2). Se realizan los registros electrofisiológicos por la técnica de "fijación de membrana" en configuración "célula entera" con la ayuda de un amplificador Axopatch200B guiado por una interfaz Digidata y el software pClamp9 (Molecular Devices). Se describe anteriormente la solución de registro extracelular que contiene calcio 2 mM. Se realizan los registros con la ayuda de pipetas de borosilicato (Sutter Instruments) estiradas para tener una resistencia de 1,5 a 2,5 mΩ. La solución intrapipeta usada para los registros tiene la composición siguiente: CsCl 130 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, MgATP 4 mM, TrisGTP 0,3 mM (pH 7,3 con NaOH). Se realiza el análisis de los resultados con la ayuda del software Clampfit (marca comercial), Excel (marca comercial) y GraphPad Prism (marca comercial).

Los aparatos usados en este ejemplo para los registros electrofisiológicos son el amplificador Axopatch200B (Molecular Device), Digidata 1300 (Molecular Device), el software pClamp9 (Molecular Devices), el amplificador GeneClamp500 (Molecular Device), el microscopio inverso Olympus IX70 (Olympus France) y el micromanipulador Sutter (Sutter Instruments). Los compuestos, reactivos y células usados procedían, para los productos químicos, de la compañía Sigma-Aldrich France, siendo las células usadas células HEK293 (ATCC), las bolas Dynal anti-CD8 de la compañía Invitrogen France, el reactivo jetPEI (marca comercial) de la compañía Q-biogen France y el microorganismo *Xenopus Laevis* (CRBM - CNRS Montpellier France)

Para visualizar las corrientes de calcio de tipo T generadas por los canales $Ca_v3.2$ recombinantes expresados en las células transfectadas, se usa el protocolo de estimulación siguiente: a partir de un potencial de reposo de -100 mV, se aplica una despolarización de 100 ms a un potencial de -30 mV cada 10 segundos. Se mide la amplitud de corriente generada por esta estimulación en condiciones controladas y después de la aplicación del veneno de PARAPHYSA SP3. Para hacer esto, se aspira el veneno de PARAPHYSA SP3 en una pipeta idéntica a la pipeta de registro. Esta pipeta que contiene el veneno se conecta con un sistema de presión neumática que permite aplicar de 1 a 2 microlitros de veneno cerca de la célula registrada.

Se efectúa la caracterización de las fracciones de veneno de PARAPHYSA SP3 en un sistema de expresión diferente. Se inyecta el ADNc que codifica Cav3.2 humano en los ovocitos de *Xenopus* (*Xenopus laevis*) como se describe en Altier, C., Dubel, S.J., Barrère, C., Jarvis, S.E., Stotz, S.C., Spaetgens, R.L., Scott, J.D., Cornet, V., De Waard, M., Zamponi, G.W., Nargeot, J. y Bourinet, E. (2002) "Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79". J. Biol. Chem., 277, 33598-33603 (Ref 5) y en Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E. y Nargeot, J. (2004) "Plasma Membrane Expression of T-type Calcium Channel {alpha}1 Subunits Is Modulated by High Voltage-activated Auxiliary Subunits." J. Biol. Chem., 279, 29263-29269 (Ref 6). Se registran las corrientes mediante la técnica de voltaje impuesto por doble microelectrodo con la ayuda de un amplificador GenClamp500 (marca comercial) (Molecular Devices (marca registrada)) guiado por el software pClamp9 (marca comercial). Se disuelven las diferentes fracciones cromatográficas obtenidas a partir del veneno en la solución extracelular que contiene (en mM): 5 $BaOH_2$, 25 TEAOH, 25 NaOH, 2 CsOH, 30 NMDG, 5 HEPES (pH a 7,3 con ácido metanosulfónico). Se realizan los registros en una microcubeta de 15 µl. Se aplican manualmente las fracciones (10 µl), directamente sobre el ovocito registrado con la ayuda de una pipeta.

Desde la aplicación de la toxina purificada, se inhibe fuertemente la corriente del canal Cav3.2 al cabo de 30 segundos (Figura 2). En el lavado del efecto de la toxina, se obtiene la recuperación de la amplitud de la corriente de partida después de varios minutos.

Por otro lado, tal como se muestra en la Figura 4, la aplicación del extracto provoca un desplazamiento de aproximadamente 20 mMV hacia los potenciales positivos de la relación de corriente-potencial. Este desplazamiento es una característica de las toxinas que provocan una inhibición del "sensor de voltaje" de los canales iónicos. Este efecto clásico de la toxinas de araña se describe en Winterfield JR, Swartz KJ. (2000) "A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels". J. Gen. Physiol., 116(5): 637-44.) (Ref 10). Se trata de un bloqueo de la parte del canal que detecta la variación de potencial (el "sensor de voltaje"). La consecuencia es

que la apertura del canal se vuelve más difícil y requiere una despolarización más alta. Así, la relación de corriente-potencial se desplaza hacia potenciales más positivos.

Parece por tanto claro que el extracto consta de un antagonista de un canal de tipo T. Esta molécula es por tanto una nueva molécula que permite inhibir la señal de dolor.

Ejemplo 2: aislamiento y secuenciación del péptido de la invención

Se han aislado las fracciones de veneno que inhiben la actividad de los canales de calcio tales como se presentan en el ejemplo precedente, y se ha efectuado la búsqueda del compuesto responsable de esta inhibición mediante etapas sucesivas de ensayos de actividad acopladas con etapas de fraccionamiento.

Se obtuvo el veneno de PARAPHYSA SP mediante estimulación eléctrica de los quelíceros de hembras adultas. Se recogió el veneno en microtubos y se liofilizó.

La preparación del veneno para los análisis de actividad y para la separación cromatográfica consistió en una disolución del liofilizado en agua ultrapura a una dilución de 10 veces la del volumen de veneno inicial, una centrifugación (14.000 rpm, 20 min) y una filtración por membrana de 0,45 µm (SJHVL04NS Millipore (marca comercial)).

Purificación del componente activo del veneno por cromatografía: En una primera etapa, se fraccionó una alícuota de 100 µl de a dilución de veneno (10 µl equivalentes de veneno bruto) mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (HPLC-FI) sobre una columna semipreparativa C8 (5C8MS, 10x250 mm, Waters). El gradiente usado está compuesto por agua + 0,1 % de ácido trifluoroacético (A) / acetonitrilo + 0,1 % de ácido trifluoroacético (B). Se programa el gradiente como sigue: 0 % de B durante 5 min, 0 a 60 % de B en 60 min, 60 a 90 % de B en 10 min, caudal 2 ml/min. Se recogen manualmente las fracciones a la salida de la columna, vigilando la variación de absorbancia UV a 215 nm. Se liofilizan a continuación estas fracciones y se ensaya después su actividad sobre el canal de calcio de tipo T como se describe anteriormente.

Se realiza una segunda etapa de purificación como sigue, en las fracciones de HPLC-FI activas: se analizan estas fracciones en una segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico, sobre una columna Tosoh SP5PW (marca comercial) (4,6 x 70 mm) (Tosoh), con un gradiente lineal de acetato de amonio en agua (de 20 mM a 1 M en 50 min) con un caudal de 0,5 ml/min. Se liofilizan las fracciones recogidas y se ensaya después su actividad sobre el canal de calcio de tipo T como se describe anteriormente.

Después de la identificación de la fracción activa, se determinan la pureza y el peso molecular del péptido constituyente de la fracción activa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización por láser asistida por matriz- tiempo de vuelo).

Se realizan las medidas de espectrometría de masas por espectrometría de masas MALDI-TOF con un espectrómetro de masas Voyager DE-Pro (marca comercial) (Applied Biosystems (marca registrada)) en modo reflector. Se mezclan los péptidos con la matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (α-CHCA, Sigma (marca registrada) 5 mg/ml en agua:acetonitrilo:TFA 50:50:0,1) y se analizan. Se calibran los espectros de masas con patrones internos y se analizan con el software Data Explorer (marca comercial).

Se determina la secuencia del péptido purificado mediante secuenciación automática usando un secuenciador en fase gaseosa (Applied Biosystems Procise) mediante degradación de Edman.

Antes del análisis, se reducen los puentes disulfuro del péptido purificado con DTT (ditiotreitol 10 mM, 55 ºC, 45 min) y se alquilan con IAA (ácido yodoacético, 50 mM, a 20 ºC, 30min) según un protocolo conocido por el especialista en la materia (véase John M. Walker. "The Protein Protocols Handbook", Humana Press 1996 (ISBN 0-89603-339-2) (Ref 14). Se somete el péptido reducido/alquilado a un desalado mediante cromatografía HPLC-FI C18 sobre una columna Merck Chromolith Speed-Rod (marca comercial) (0,46x50 mm). Se determina a continuación la secuencia del péptido reducido/alquilado mediante secuenciación N-terminal automática en fase gaseosa en un secuenciador peptídico de modelo Applied Biosystems 477A (marca comercial) (Applied Biosystems (marca registrada)).

La secuencia peptídica obtenida es YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1)

Este ejemplo demuestra claramente por tanto que la molécula antagonista de los canales de tipo T es el péptido de secuencia ID N°1.

Este péptido representa por tanto una nueva molécula susceptible de inhibir la señal de dolor.

Ejemplo 3: síntesis química del péptido de secuencia SEQ ID NO 1.

La compañía Altergen (marca registrada) sintetiza químicamente el péptido de la invención según el protocolo siguiente: síntesis en fase sólida según la técnica de Merifield, estrategia de Fmoc.

Se ensaya la actividad inhibidora del péptido identificado en el ejemplo 2 *in vitro* sobre diferentes canales de calcio de tipo T (resultados no proporcionados).

Ejemplo 4: síntesis química del péptido de secuencia SEQ ID NO 1.

La compañía Genepep (marca registrada) sintetizó químicamente el péptido de la invención según el protocolo siguiente: síntesis en fase sólida según la técnica de Merifield, estrategia de Fmoc. (Ref 4).

La compañía Synprosis (marca registrada) replicó el péptido lineal producido por la compañía Genepep según el protocolo siguiente: incubación de péptido lineal Psp3-Tx1 10 µM en un tampón que contiene glutation reducido (GSH) 1 mM, glutation oxidado (GSSG) 1 mM, trishidroximetilaminometano (TRIS) 100 mM pH 9, 25 % de glicerol. Se realizó la incubación durante 24 horas con agitación suave a temperatura ambiente. Se realizó la purificación de la toxina Psp3-Tx1 sintética en cromatografía HPLC en fase inversa sobre columna RP-C18 Chromolith (marca registrada) usando un gradiente de 10 a 50 % de acetonitrilo (ACN) en una solución con 0,1 % de trifluoroacetato (TFA).

Se realizó la verificación de la masa del péptido sintético replicado mediante espectrometría de masas, dando un valor de 3398,0 dalton (Da) de acuerdo con la formación de 3 puentes disulfuro entre las 6 cisteínas.

Ejemplo 5: caracterización del péptido sintético de la invención producido en el ejemplo 4.

Se ensayó la actividad inhibidora del péptido sintético del ejemplo 4 *in vitro* sobre el canal $Ca_v3.2$. Se realizó la comparación de inhibiciones con el péptido natural (Psp3-Tx1) en las mismas condiciones. Se diluyeron el péptido sintético y el péptido natural (toxina natural) a una concentración madre de 10^{-3} molar en agua destilada. A partir de esta concentración madre, se diluyeron los péptidos en una solución correspondiente a la solución extracelular usada para el análisis de fijación de membrana. Esta solución es de la composición siguiente (en mM): NaCl 135, TEACl 20, HEPES 10, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1 (pH 7,3 con TEAOH). Las concentraciones ensayadas fueron las siguientes: para el péptido sintético: 10^{-8}, 10^{-7} y 10^{-6} molar; para el péptido natural: 10^{-9}, 10^{-8}, $3x10^{-8}$, 10^{-7}, $3x10^{-7}$ y 10^{-6} molar.

Se usaron células HEK293 (ATCC) que expresan de manera estable la secuencia de ADN complementaria del canal de calcio Cav3.2 humano. A cada pasada de la línea celular, se sembraron células a baja densidad sobre placas de cultivo para análisis de "fijación de membrana" (electrofisiología molecular).

Se localizaron las células transfectadas positivamente con la ayuda de bolas magnéticas recubiertas con un anticuerpo anti-CD8 (Dynal) como se describe anteriormente en Jiménez, C., Bourinet, E., Leuranguer, V., Richard, S., Snutch, T.P. y Nargeot, J. (2000) "Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels." Neuropharmacology, 39, 1-10 (Ref 2).

Se realizan los registros electrofisiológicos por la técnica de "fijación de membrana" en configuración de "célula entera" con la ayuda de un amplificador Axopatch200B guiado por una interfaz Digidata y el software pClamp10 (Molecular Devices). Se describe anteriormente la solución de registro extracelular que contiene calcio 2 mM.

Se realizan los registros con la ayuda de pipetas de borosilicato (Sutter Instruments) estiradas para tener una resistencia de 1,5 a 2,5 mΩ.

La solución intrapipeta usada para los registros es de la composición siguiente: CsCl 130 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, MgATP 4 mM, TrisGTP 0,3 mM (pH 7,3 con NaOH). Se realiza el análisis de los resultados con la ayuda del software Clampfit (marca comercial), Excel (marca comercial) y GraphPad Prism (marca comercial).

Los aparatos usados en este ejemplo para los registros electrofisiológicos son el amplificador Axopatch200B (Molecular Device), Digidata 1440 (Molecular Device), el software pClamp10 (Molecular Devices), el amplificador GeneClamp500 (Molecular Device), el microscopio inverso Olympus IX70 (Olympus France) y el micromanipulador Sutter (Sutter Instruments). Los compuestos, reactivos y células usados procedían, para los productos químicos, de la compañía Sigma-Aldrich France, siendo las células usadas células HEK293 (ATCC), las bolas Dynal anti-CD8 de la compañía Invitrogen France y el reactivo jetPEI (marca comercial) de la compañía Q-biogen France.

Para visualizar las corrientes de calcio de tipo T generadas por los canales $Ca_v3.2$ recombinantes expresados en las células transfectadas, se usa el protocolo de estimulación siguiente: a partir de un potencial de reposo de -100 mV, se aplica una despolarización de 100 ms a un potencial de -30 mV cada 10 segundos.

Se mide la amplitud de la corriente generada por esta estimulación en condiciones controladas desde la aplicación de concentraciones crecientes del péptido sintético del ejemplo 4, o de concentraciones creciente de la toxina nativa Psp3-Tx1. Para hacer esto, se reparten las soluciones que contienen las diferentes concentraciones del péptido sintético o la toxina Psp3-Tx1 en tubos de perfusión conectados con un colector que permite aplicar estas diferentes soluciones cerca de la célula registrada.

Se asimila así la actividad inhibidora de cada concentración de péptido sintético o de toxina nativa midiendo la amplitud de la corriente CaV3.2 de la célula registrada en la meseta del efecto.

Se presentaron los efectos inhibidores del péptido sintético y del péptido natural en forma de porcentaje de bloqueo de cada concentración para construir las curvas de "efecto-dosis" presentadas en la Figura 8. Estas curvas de "efecto-dosis" se analizaron con el software GrapPad Prism (marca comercial) con la función de análisis sigmoideo "log(antagonista) frente a respuesta - pendiente variable". que permite calcular la dosis que inhibe un 50 % de la corriente (CE_{50}), así como la pendiente de la curva correspondiente o número de Hill.

La Figura 8 representa la curvas de dosis-respuesta para el péptido natural (Psp3Tx1) (curva con círculos negros) y el péptido sintético (curva con círculos blancos).

Así, en la Figura 8, la CE_{50} para la toxina natural es de 1,1 µM con un número de Hill de 0,87 (el número de células analizadas es de 6), y la CE_{50} para el péptido sintético es de 2,01 µM con un número de Hill de 0,89 (el número de células analizadas es igual a 20).

Los resultados muestran por tanto que el péptido sintético y el péptido nativo inhiben las corrientes del canal $Ca_v3.2$. Los resultados se describen con un coeficiente de Hill igual a aproximadamente 1, lo que implica una interacción 1:1 entre canal y péptidos.

Este ejemplo demuestra por tanto claramente que el péptido de secuencia ID NO 1, extraído de veneno de araña como se presenta en el ejemplo 1 y/o sintetizado químicamente, inhibe las corrientes del canal $Ca_v3.2$

Ejemplo 6: efecto analgésico del péptido de la invención

Se usaron ratones con el fin de observar el efecto analgésico del péptido de la invención frente a dolores inducidos por estímulos térmicos.

Los ratones son ratones C57BL/6J silvestres y ratones C57BL/6J CaV3.2-/-. El número total de ratones es de 10 silvestres y 10 CaV3.2-/-.

Se usan dos grupos de ratones (C57BL/6J), un grupo en el que se ha inyectado por vía intratecal una solución fisiológica que comprende el péptido de la invención a una concentración de 10 y 100 nM y un segundo grupo (grupo testigo) que solo recibe la inyección intratecal de la solución fisiológica sola. Se someten a continuación los ratones al ensayo de inmersión de la cola en baño María a 46 ºC. Este experimento tiene como objetivo determinar el tiempo al cabo del cual reaccionan los ratones al calor doloroso, mostrando así el umbral de aparición de la señal de dolor ligado a la percepción del calor. Se realiza el mismo experimento en paralelo con otros dos grupos de ratones C57BL/6J desprovistos del gen que codifica el canal de calcio de tipo T codificado por la subunidad CaV3.2. Este experimento tiene como objetivo mostrar la selectividad del péptido de la invención.

Los resultados muestran una diferencia significativa del tiempo de reacción al calor entre el grupo de ratones en el que se ha inyectado el péptido y el grupo de ratones testigo, siendo el tiempo de reacción al calor significativamente mayor en los ratones que reciben el péptido de secuencia SEQ ID NO 1.

Se usaron ratones con el fin de observar el efecto analgésico del péptido de la invención frente estímulos mecánicos.

Los ratones son ratones C57BL/6J silvestres y ratones C57BL/6J CaV3.2-/-. El número total de ratones es de 10 silvestres y 10 CaV3.2-/-.

Se usan dos grupos de ratones (C57BL/6J), un grupo en el que se ha inyectado por vía intratecal una solución fisiológica que comprende el péptido de la invención a una concentración de 10 y 100 nM y un segundo grupo (grupo testigo) que solo recibe la inyección intratecal de la solución fisiológica sola. Se sometieron a continuación los ratones al experimento de estimulación mecánica por filamentos de von Frey. Este experimento tiene como objetivo determinar el umbral de reacción a un estímulo mecánico de intensidad creciente aplicado sobre la bóveda plantar. El umbral de reacción de los animales está correlacionado con la aparición de la señal de dolor ligada a la percepción de la presión mecánica. Se realiza el mismo experimento en paralelo con otros dos grupos de ratones C57BL/6J desprovistos del gen que codifica el canal de calcio de tipo T codificado por la subunidad CaV3.2. Este experimento tiene como objetivo mostrar la selectividad del péptido de la invención.

Los resultados muestran una diferencia significativa del umbral de percepción a la presión mecánica entre el grupo de ratones en el que se ha inyectado el péptido y el grupo de ratones testigo, siendo el umbral de presión significativamente más elevado en los ratones que reciben el péptido de secuencia SEQ ID NO 1.

El péptido de la invención tiene por tanto el efecto analgésico esperado frente a los estímulos dolorosos térmicos y mecánicos.

Este ejemplo demuestra por tanto que el péptido de secuencia SEQ ID NO 1, identificado en el ejemplo 2, es una nueva molécula para el tratamiento del dolor.

Ejemplo 7: comparación del efecto analgésico del péptido de la invención con el de un analgésico de referencia.

Los ratones y el protocolo experimental usados en el presente ejemplo son idénticos a los descritos en el ejemplo 4.

Se ensayan dos grupos de ratones suplementarios:

- un grupo en el que se ha inyectado por vía intratecal una dosis de morfina (1 µg/kg), y
- un grupo en que lo ha sido el péptido de secuencia SEQ ID NO 1 (10 nM).

Ejemplo 8: efecto antihipertensivo del péptido de la invención

Los ratones usados en el presente ejemplo son idénticos a los descritos en el ejemplo 4.

Se usan ratones con el fin de observar el efecto antihipertensivo del péptido de la invención. Se usan dos grupos de ratones (C57BL/6J), un grupo en el que se inyecta por vía intravenosa una solución fisiológica que comprende el péptido de la invención a una concentración de 10 y 100 nM y un segundo grupo (grupo testigo) que solo recibe la inyección intravenosa de la solución fisiológica sola. Se realiza la medida de la presión arterial por el principio del método del manguito caudal (Plehm, R., Barbosa, M.E. y Bader, M. (2006) "Animal models for hypertension/blood pressure recording". Methods Mol. Med., 129, (Ref 15)).

Ejemplo 9: efecto antiproliferativo del péptido de la invención

Se usan células cancerosas de próstata LNCAP con el fin de observar el efecto antiproliferativo del péptido de la invención.

El medio de cultivo usado es el medio RPMI 1640 (BioWhittaker SA, Verviers, Bélgica), suplementado con L-glutamina 5 mM (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, Francia) y 10 % de FBS (Applera France SA, Courtaboeuf, Francia) como se indica en el documento Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoï-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P. (2008) "CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells". J. Biol. Chem., 283(15): 10162-73. (Ref 16).

Se usan dos condiciones de células:

- una condición en la que las células se cultivan en diferentes ensayos en presencia del péptido de la invención a concentraciones de 10, 30, 100, 300, 1000 nM, y
- una segunda condición (testigo) sin péptido.

Se realiza la medida de la proliferación celular mediante el método CellTrace (marca comercial) CFSE (Invitrogen (marca registrada)) basado en la incorporación del trazador fluorescente CFSE por las células cultivadas y por una medida por citometría de flujo de las células marcadas.

Listas de referencias

Ref 1 Bourinet, E., *et al.*, "Silencing of the CaV3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception". Embo J., 2005. 24(2) : pág. 315-24.

Ref 2 Jiménez, C., Bourinet, E., Leuranguer, V., Richard, S., Snutch, T.P. y Nargeot, J. (2000) "Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels". Neuropharmacology, 39, 1-10.

Ref 3 Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular cloning, A laboratory manual" 2ª edición, Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Ref 4 "Fmoc solid Phase peptide synthesis, a practical approach", publicado por W.C. Chan et P. D. White, Oxford university press, 2000.

Ref 5 Altier, C., Dubel, S.J., Barrère, C., Jarvis, S.E., Stotz, S.C., Spaetgens, R.L., Scott, J.D., Cornet, V., De Waard, M., Zamponi, G.W., Nargeot, J. y Bourinet, E. (2002) "Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79". J. Biol. Chem., 277, 33598-33603.

Ref 6 Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E. and Nargeot, J. (2004) "Plasma Membrane Expression of T-type Calcium Channel {alpha}1 Subunits Is Modulated by High Voltage-activated Auxiliary Subunits". J. Biol. Chem., 279, 29263-29269.

Ref 7 "Pharmacie galénique" de A. LEHIR (Ed. Masson, 1992 (6ª edición).

Ref 8 Taylor, J.T., Zeng, X.B., Pottle, J.E., Lee, K., Wang, A.R., Yi, S.G., Scruggs, J.A., Sikka, S.S. y Li, M. (2008) "Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling". World J. Gastroenterol., 14, 4984-4991.

Ref 9 Chen, C.C., Lamping, K.G., Nuno, D.W., Barresi, R., Prouty, S.J., Lavoie, J.L., Cribbs, L.L., England, S.K., Sigmund, C.D., Weiss, R.M., Williamson, R.A., Hill, J.A. y Campbell, K.P. (2003) "Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca2+ channels". Science, 302, 1416-1418.

Ref 10 Winterfield JR, Swartz KJ. (2000) "A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels". J. Gen. Physiol., 116(5): 637-44.)

Ref 11 Panner A, Cribbs LL, Zainelli GM, Origitano TC, Singh S, Wurster RD. (2005) "Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells". Cell Calcium, 37(2): 105-19.

Ref 12 Lu F, Chen H, Zhou C, Liu S, Guo M, Chen P, Zhuang H, Xie D, Wu S. (2008) "T-type Ca2+ channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation" Cell Calcium. 43(1): 49-58.

Ref 13 Taylor JT, Huang L, Pottle JE, Liu K, Yang Y, Zeng X, Keyser BM, Agrawal KC, Hansen JB, Li M (2008) "Selective blockade of T-type Ca2+ channels suppresses human breast cancer cell proliferation". Cancer Lett., 18; 267(1): 116-24.

Ref 14 John M. Walker. "The Protein Protocols Handbook", Humana Press 1996 (ISBN 0-89603-339-2).

Ref 15 Plehm, R., Barbosa, M.E. yBader, M. (2006) "nimal models for hypertension/blood pressure recording" Methods Mol. Med. 129.

Ref 16 Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoï-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P.(2008) "CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells". J. Biol. Chem., 283(15): 10162-73.

Ref 17 Han KK, Martinage A (1992) "Post-translational chemical modification(s) of proteins". Int. J. Biochem. 24(1): 19-28; Walsh G, Jefferis R (2006) "Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins", Nature Biotechnology - 24, 1241-1252.

Ref 18 Escoubas P. (2006) "Molecular diversification in spider venoms: a web of combinatorial peptide libraries". Mol Divers. 10(4): 545-54.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CNRS
Université de Nice Sophia-Antipolis
BOURINET, Emmanuel
ESCOUBAS, Pierre
MARGER, Fabrice
NARGEOT, Joîl
LAZDUNSKI, Michel

<120> Identificación de una nueva toxina antagonista de canales de calcio de tipo T de aplicación analgésica

<130> BIP133347PC00

<150> FR09001274
<151> 15-01-2009

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido analgésico

<400> 1

Tyr Cys Gln Lys Phe Leu Trp Thr Cys Asp Ser Glu Arg Pro Cys Cys
1 5 10 15

Glu Gly Leu Val Cys Arg Leu Trp Cys Lys Ile Asn
20 25

<210> 2
<211> 84
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácidos nucleicos que codifican el péptido analgésico

<400> 2

tattgccaga aatttctgtg gacctgcgat agcgaacgcc cgtgctgcga aggcctggtg 60
tgccgcctgt ggtgcaaaat taac 84

<210> 3
<211> 84
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia que codifica un péptido analgésico

<220>
<221> característica_misc
<222> (3)..(3)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (6)..(6)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (9)..(9)
<223> R es A o G

<220>
<221> característica_misc
<222> (12)..(12)
<223> R es A o G

<220>
<221> característica_misc
<222> (15)..(16)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (18)..(18)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (24)..(24)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (27)..(27)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (30)..(30)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (31)..(31)
<223> W es A o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (32)..(32)
<223> S es C o G

<220>
<221> característica_misc
<222> (33)..(33)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (36)..(36)
<223> R es A o G

<220>
<221> característica_misc
<222> (37)..(37)
<223> M es A o C

<220>

<221> característica_misc
<222> (39)..(39)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (42)..(42)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (45)..(45)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (48)..(48)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (51)..(51)
<223> R es A o G

<220>
<221> característica_misc
<222> (54)..(54)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (55)..(55)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (57)..(57)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (60)..(60)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (63)..(63)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (64)..(64)
<223> M es A o C

<220>
<221> característica_misc
<222> (66)..(66)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (67)..(67)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc

<222> (69)..(69)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (75)..(75)
<223> Y es C o T

<220>
<221> característica_misc
<222> (78)..(78)
<223> R es A o G

<220>
<221> característica_misc
<222> (81)..(81)
<223> H es A o C

<220>
<221> característica_misc
<222> (84)..(84)
<223> Y es C o T

<400> 3

taytgycara arttyytntg gacntgygay wsngarmgnc cntgytgyga rggnytngtn 60

tgymgnytnt ggtgyaarat haay 84

<210> 4
<211> 2481
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plásmido pT7-7

<220>
<221> característica_misc
<222> (428)..(428)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (435)..(435)
<223> n es a, c, g o t

<400> 4

aattctcatg tttgacagct tatcatcgat aagcttgggc tgcaggtcga ctctagagga 60

tccccgggcg cgaattctag ccatatgtat atctccttct taaagttaaa caaaattatt 120

tctagaggga aaccgttgtg gtctccctat agtgagtcgt attaatttcg aagtctatca 180

gaagttcgaa tcgctgggcc tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat 240

gcagctcccg gagacggtca cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg 300

tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggcgca gccatgaccc agtcacgtag 360

cgatagcgga gtgtatatac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag 420

tgcaccanag atctntgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 480

tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc 540

gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg 600

caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 660

tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 720

gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 780

ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 840

cttcgggaag cgtggcgctt tctcaatgct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg 900

tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct 960

tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag 1020

cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga 1080

agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga 1140

agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg 1200

gtagcggtgg ttttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag 1260

aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag 1320

ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta attcttgaag 1380

acgaaagggc ctcgtgatac gcctattttt ataggttaat gtcatgataa taatggtttc 1440

ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt 1500

ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 1560

atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttccctttt 1620

tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 1680

tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat 1740

ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 1800

atgtggcgcg gtattatccc gtgttgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 1860

ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 1920

catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 1980

cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gctttttgc acaacatggg 2040

ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 2100

cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 2160

cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 2220

tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 2280

agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 2340

ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 2400

gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 2460

atatatactt tagattgatt t 2481

<210> 5
<211> 4969
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plásmido pGex-4-T1

<400> 5

acgttatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc ggaagctgtg 60

gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc gcactcccgt 120

tctggataat gtttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc tgaaatgagc 180

tgttgacaat taatcatcgg ctcgtataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca 240

cacaggaaac agtattcatg tcccctatac taggttattg gaaaattaag ggccttgtgc 300

aacccactcg acttcttttg gaatatcttg aagaaaaata tgaagagcat ttgtatgagc 360

gcgatgaagg tgataaatgg cgaaacaaaa agtttgaatt gggtttggag tttcccaatc 420

ttccttatta tattgatggt gatgttaaat taacacagtc tatggccatc atacgttata 480

tagctgacaa gcacaacatg ttgggtggtt gtccaaaaga gcgtgcagag atttcaatgc 540

ttgaaggagc ggttttggat attagatacg gtgtttcgag aattgcatat agtaaagact 600

ttgaaactct caaagttgat tttcttagca agctacctga aatgctgaaa atgttcgaag 660

atcgtttatg tcataaaaca tatttaaatg gtgatcatgt aacccatcct gacttcatgt 720

tgtatgacgc tcttgatgtt gttttataca tggacccaat gtgcctggat gcgttcccaa 780

aattagtttg ttttaaaaaa cgtattgaag ctatcccaca aattgataag tacttgaaat 840

ccagcaagta tatagcatgg cctttgcagg gctggcaagc cacgtttggt ggtggcgacc 900

atcctccaaa atcggatctg gttccgcgtg gatccccgga attcccgggt cgactcgagc 960

ggccgcatcg tgactgactg acgatctgcc tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc 1020

tctgacacat gcagctcccg gagacggtca cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca 1080

gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggcgca gccatgaccc 1140

agtcacgtag cgatagcgga gtgtataatt cttgaagacg aaagggcctc gtgatacgcc 1200

tatttttata ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc 1260

ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc 1320

cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga 1380

gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc cctttttttgc ggcattttgc cttcctgttt 1440

ttgctcaccc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag 1500

tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag 1560

aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg 1620

ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg 1680

agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca 1740

gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag 1800

gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc 1860

gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg 1920

cagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc 1980

ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg 2040

cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggtctcgcg 2100

gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga 2160

cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 2220

tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa 2280

aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 2340

aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 2400

gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac 2460

cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 2520

ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc 2580

accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag 2640

tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 2700

cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc 2760

gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 2820

ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca 2880

cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc 2940

tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 3000

ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gcctttgct cacatgttct 3060

ttcctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata 3120

ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 3180

gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc ataaattccg 3240

acaccatcga atggtgcaaa acctttcgcg gtatggcatg atagcgcccg gaagagagtc 3300

aattcagggt ggtgaatgtg aaaccagtaa cgttatacga tgtcgcagag tatgccggtg 3360

tctcttatca gaccgtttcc cgcgtggtga accaggccag ccacgtttct gcgaaaacgc 3420

gggaaaaagt ggaagcggcg atggcggagc tgaattacat tcccaaccgc gtggcacaac 3480

aactggcggg caaacagtcg ttgctgattg gcgttgccac ctccagtctg gccctgcacg 3540

cgccgtcgca aattgtcgcg gcgattaaat ctcgcgccga tcaactgggt gccagcgtgg 3600

tggtgtcgat ggtagaacga agcggcgtcg aagcctgtaa agcggcggtg cacaatcttc 3660

tcgcgcaacg cgtcagtggg ctgatcatta actatccgct ggatgaccag gatgccattg 3720

ctgtggaagc tgcctgcact aatgttccgg cgttatttct tgatgtctct gaccagacac 3780

ccatcaacag tattattttc tcccatgaag acggtacgcg actgggcgtg gagcatctgg 3840

tcgcattggg tcaccagcaa atcgcgctgt tagcgggccc attaagttct gtctcggcgc 3900

gtctgcgtct ggctggctgg cataaatatc tcactcgcaa tcaaattcag ccgatagcgg 3960

aacgggaagg cgactggagt gccatgtccg gttttcaaca aaccatgcaa atgctgaatg 4020

agggcatcgt tcccactgcg atgctggttg ccaacgatca gatggcgctg ggcgcaatgc 4080

gcgccattac cgagtccggg ctgcgcgttg gtgcggatat ctcggtagtg ggatacgacg 4140

ataccgaaga cagctcatgt tatatcccgc cgttaaccac catcaaacag gattttcgcc 4200

tgctggggca aaccagcgtg gaccgcttgc tgcaactctc tcagggccag gcggtgaagg 4260

gcaatcagct gttgcccgtc tcactggtga aaagaaaaac caccctggcg cccaatacgc 4320

aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc 4380

gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca 4440

ccccaggctt tacactttat gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa 4500

caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacggat tcactggccg tcgttttaca 4560

acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag cacatccccc 4620

tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg 4680

cagcctgaat ggcgaatggc gctttgcctg gtttccggca ccagaagcgg tgccggaaag 4740

ctggctggag tgcgatcttc ctgaggccga tactgtcgtc gtcccctcaa actggcagat 4800

gcacggttac gatgcgccca tctacaccaa cgtaacctat cccattacgg tcaatccgcc 4860

gtttgttccc acggagaatc cgacgggttg ttactcgctc acatttaatg ttgatgaaag 4920

ctggctacag gaaggccaga cgcgaattat ttttgatggc gttggaatt 4969

<210> 6
<211> 5900

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plásmido pET32

<400> 6

atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aacccctcaa gacccgttta gaggccccaa 60

ggggttatgc tagttattgc tcagcggtgg cagcagccaa ctcagcttcc tttcgggctt 120

tgttagcagc cggatctcag tggtggtggt ggtggtgctc gagtgcggcc gcaagcttgt 180

cgacggagct cgaattcgga tccgatatca gccatggcct tgtcgtcgtc gtcggtaccc 240

agatctgggc tgtccatgtg ctggcgttcg aatttagcag cagcggtttc tttcatacca 300

gaaccgcgtg gcaccagacc agaagaatga tgatgatgat ggtgcatatg gccagaacca 360

gaaccggcca ggttagcgtc gaggaactct ttcaactgac ctttagacag tgcacccact 420

ttggttgccg ccacttcacc gtttttgaac agcagcagag tcgggatacc acggatgcca 480

tatttcggcg cagtgccagg gttttgatcg atgttcagtt ttgcaacggt cagtttgccc 540

tgatattcgt cagcgatttc atccagaatc ggggcgatca ttttgcacgg accgcaccac 600

tctgcccaga aatcgacgag gatcgccccg tccgctttga gtacatccgt gtcaaaactg 660

tcgtcagtca ggtgaataat tttatcgctc atatgtatat ctccttctta aagttaaaca 720

aaattatttc tagaggggaa ttgttatccg ctcacaattc ccctatagtg agtcgtatta 780

atttcgcggg atcgagatcg atctcgatcc tctacgccgg acgcatcgtg gccggcatca 840

ccggcgccac aggtgcggtt gctggcgcct atatcgccga catcaccgat ggggaagatc 900

gggctcgcca cttcgggctc atgagcgctt gtttcggcgt gggtatggtg gcaggccccg 960

tggccggggg actgttgggc gccatctcct tgcatgcacc attccttgcg gcggcggtgc 1020

tcaacggcct caacctacta ctgggctgct tcctaatgca ggagtcgcat aagggagagc 1080

gtcgagatcc cggacaccat cgaatggcgc aaaacctttc gcggtatggc atgatagcgc 1140

ccggaagaga gtcaattcag ggtggtgaat gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca 1200

gagtatgccg gtgtctctta tcagaccgtt tcccgcgtgg tgaaccaggc cagccacgtt 1260

tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtggaagcg gcgatggcgg agctgaatta cattcccaac 1320

cgcgtggcac aacaactggc gggcaaacag tcgttgctga ttggcgttgc cacctccagt 1380

ctggccctgc acgcgccgtc gcaaattgtc gcggcgatta aatctcgcgc cgatcaactg 1440

ggtgccagcg tggtggtgtc gatggtagaa cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg 1500

gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt gggctgatca ttaactatcc gctggatgac 1560

caggatgcca ttgctgtgga agctgcctgc actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc 1620

tctgaccaga cacccatcaa cagtattatt ttctcccatg aagacggtac gcgactgggc 1680

gtggagcatc tggtcgcatt gggtcaccag caaatcgcgc tgttagcggg cccattaagt 1740

tctgtctcgg cgcgtctgcg tctggctggc tggcataaat atctcactcg caatcaaatt 1800

cagccgatag cggaacggga aggcgactgg agtgccatgt ccggttttca acaaaccatg 1860

caaatgctga atgagggcat cgttcccact gcgatgctgg ttgccaacga tcagatggcg 1920

ctgggcgcaa tgcgcgccat taccgagtcc gggctgcgcg ttggtgcgga catctcggta 1980

gtgggatacg acgataccga agacagctca tgttatatcc cgccgttaac caccatcaaa 2040

caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc gtggaccgct tgctgcaact ctctcagggc 2100

caggcggtga agggcaatca gctgttgccc gtctcactgg tgaaaagaaa aaccaccctg 2160

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 2220

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg taagttagct 2280

cactcattag gcaccgggat ctcgaccgat gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc 2340

cttccggtgg gcgcggggca tgactatcgt cgccgcactt atgactgtct tctttatcat 2400

gcaactcgta ggacaggtgc cggcagcgct ctgggtcatt ttcggcgagg accgctttcg 2460

ctggagcgcg acgatgatcg gcctgtcgct tgcggtattc ggaatcttgc acgccctcgc 2520

tcaagccttc gtcactggtc ccgccaccaa acgtttcggc gagaagcagg ccattatcgc 2580

cggcatggcg gccccacggg tgcgcatgat cgtgctcctg tcgttgagga cccggctagg 2640

ctggcggggt tgccttactg gttagcagaa tgaatcaccg atacgcgagc gaacgtgaag 2700

cgactgctgc tgcaaaacgt ctgcgacctg agcaacaaca tgaatggtct tcggtttccg 2760

tgtttcgtaa agtctggaaa cgcggaagtc agcgccctgc accattatgt tccggatctg 2820

catcgcagga tgctgctggc taccctgtgg aacacctaca tctgtattaa cgaagcgctg 2880

gcattgaccc tgagtgattt ttctctggtc ccgccgcatc cataccgcca gttgtttacc 2940

ctcacaacgt tccagtaacc gggcatgttc atcatcagta acccgtatcg tgagcatcct 3000

ctctcgtttc atcggtatca ttacccccat gaacagaaat cccccttaca cggaggcatc 3060

agtgaccaaa caggaaaaaa ccgcccttaa catggcccgc tttatcagaa gccagacatt 3120

aacgcttctg gagaaactca acgagctgga cgcggatgaa caggcagaca tctgtgaatc 3180

gcttcacgac cacgctgatg agctttaccg cagctgcctc gcgcgtttcg gtgatgacgg 3240

tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc 3300

cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggcgcagc 3360

catgacccag tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc ttaactatgc ggcatcagag 3420

cagattgtac tgagagtgca ccatatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga 3480

gaaaataccg catcaggcgc tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg 3540

ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat 3600

caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 3660

aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa 3720

atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 3780

cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt 3840

ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca 3900

gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg 3960

accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat 4020

cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 4080

cagagttctt gaagtggtgg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct 4140

gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 4200

aaaccaccgc tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 4260

aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 4320

actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 4380

taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca 4440

gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca 4500

tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc 4560

ccagtgctgc aatgataccg cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa 4620

accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc 4680

agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 4740

acgttgttgc cattgctgca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat 4800

tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag 4860

cggttagctc cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 4920

tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 4980

ctgtgactgg tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt 5040

gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 5100

tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 5160

ccagttcgat gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca 5220

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 5280

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 5340

gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 5400

ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgaaattgt aaacgttaat attttgttaa 5460

aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct catttttaa ccaataggcc gaaatcggca 5520

aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt gagtgttgtt ccagtttgga 5580

acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc 5640

agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag ttttttgggg tcgaggtgcc 5700

gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gcccccgatt tagagcttga cggggaaagc 5760

cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg agcgggcgct agggcgctgg 5820

caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc cgcgcttaat gcgccgctac 5880

agggcgcgtc ccattcgcca 5900

REIVINDICACIONES

1. Péptido de secuencia aminoacídica

YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1).

2. Ácidos nucleicos que codifican el péptido definido en la reivindicación 1.

3. Ácido nucleico según la reivindicación 2, en el que la secuencia de ácido nucleico es

5' TAY TGY CAR AAR TTY YTN TGG ACN TGY GAY WSN GAR MGN CCN TGY TGY GAR GGN YTN GTN TGY MGN YTN TGG TGY AAR ATH AAY 3' (SEQ ID N°3)

en las que A es adenosina, C es citidina, G es guanosina, T es timidina y H es A o C o T, M es A o C, N es A o C o G o T, R es A o G, S es C o G, W es A o T e Y es C o T:

4. Sistema de expresión que comprende un plásmido y/o un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 2.

5. Péptido antagonista de un canal de calcio de tipo T de secuencia aminoacídica:

YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1).

6. Péptido antagonista de un canal de calcio de tipo T según la reivindicación 5, en el que dicho canal es un canal elegido del grupo que comprende el canal Cav3.2 y el canal Cav3.1.

7. Péptido según la reivindicación 1, para su uso como medicamento.

8. Péptido según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento del dolor.

9. Péptido según la reivindicación 1, para su uso como medicamento analgésico.

10. Procedimiento de síntesis del péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una etapa de síntesis química sobre soporte sólido o una etapa de síntesis por recombinación genética.

Figura 1

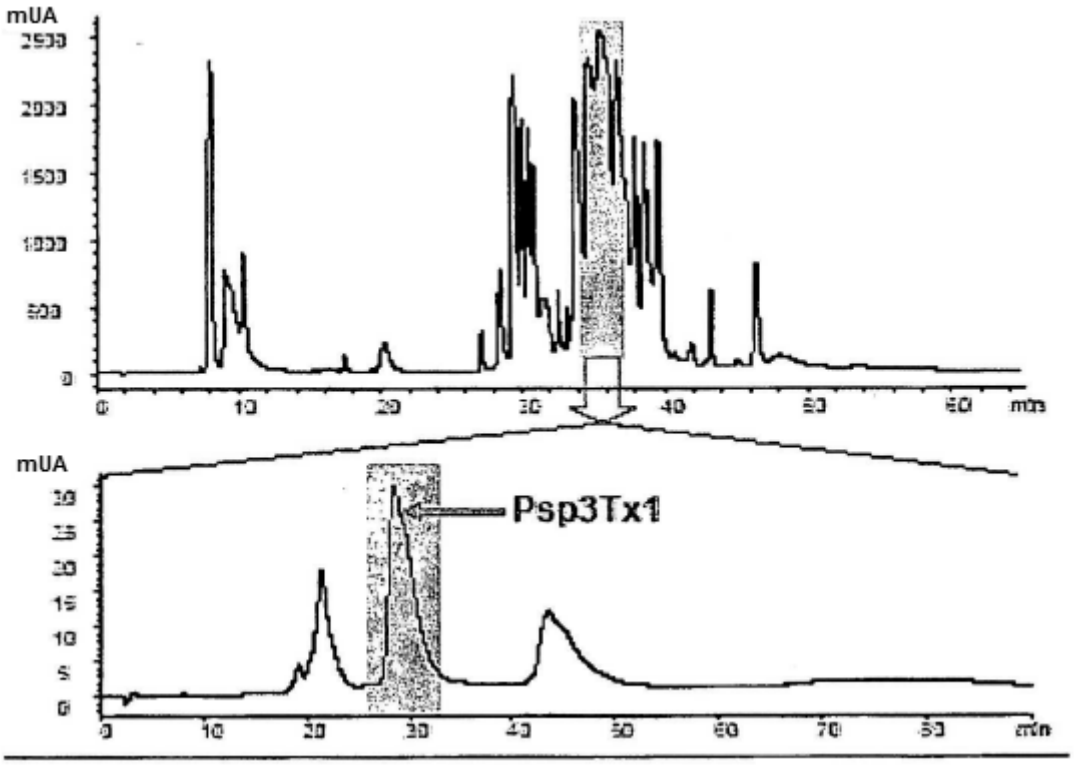


Figura 2

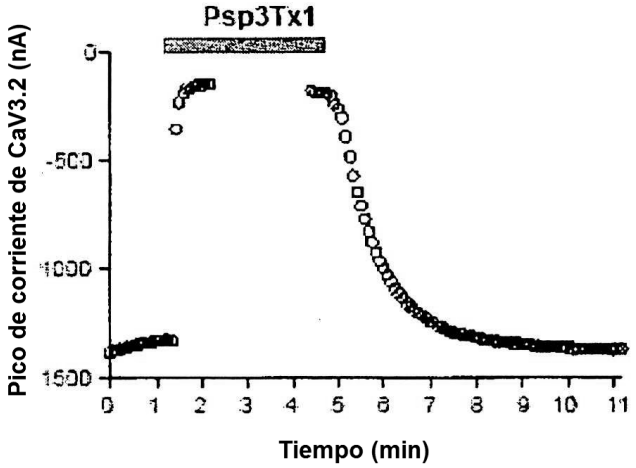


Figura 3

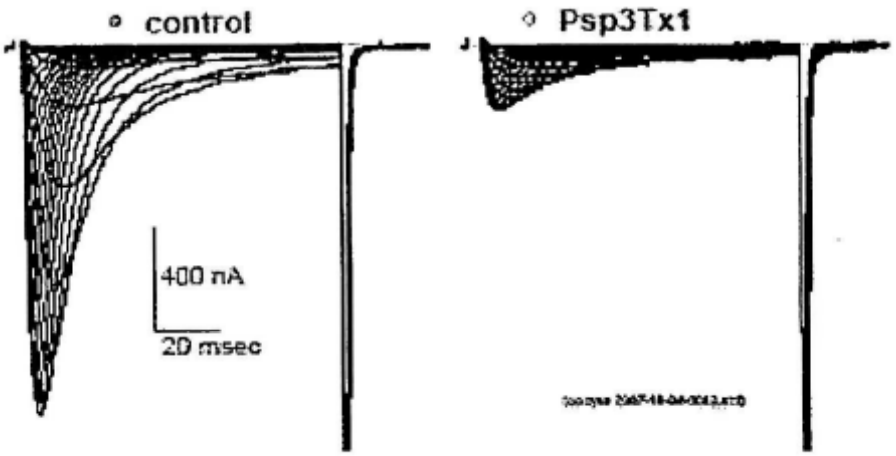


Figura 4

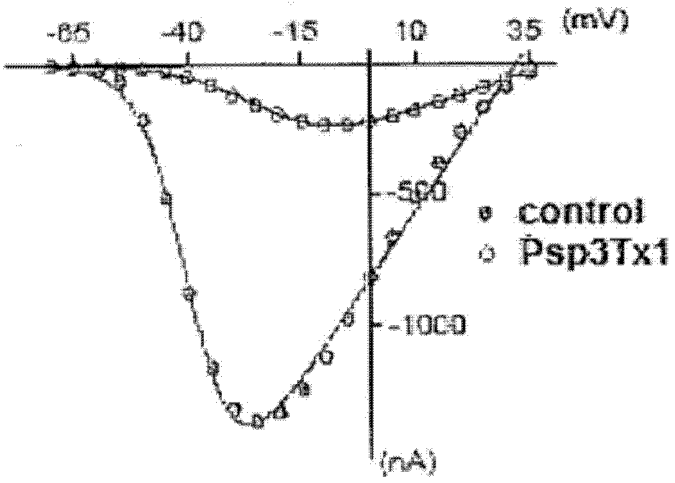


Figura 5

Secuencia de pT7-7:

AATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCGCGAAT
TCTAGCCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGAAACCGTTGTGGTCTCCCTAT
AGTGAGTCGTATTAATTTCGAAGTCTATCAGAAGTTCGAATCGCTGGGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGA
AAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCG
TCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTA
TATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCANAGATCTNTGCGGTGTGAAATAC
CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG
TCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACG
CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTAT
AAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACC
TGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC
GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTA
TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTG
GTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT
TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGA
TCTTCACCTAGATCCTTTTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCAT
GATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTT
CTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA
GAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCA
CCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT
CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCT
ATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA
CTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGC
CATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTT
TTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGA
CGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCT
AGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCC
GGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC
AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA
GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGAT
TGATTT

Figura 6 (1/2)

Secuencia de pGex-4-T1:

ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGG
TCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCGACATCAT
AACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAG
CGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGTATTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGC
AACCCACTCGACTTCTTTTGGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATA
AATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAAT
TAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTG
CAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACT
TTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTCGAAGATCGTTTATGTCATA
AAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACA
TGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCCACAAATTG
ATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACC
ATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGGAATTCCCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACT
GACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
CAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGG
GCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCC
TATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCG
GAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGC
TTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCAT
TTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGA
TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCC
GCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAG
TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAG
GACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC
TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTAT
TAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC
CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG
GTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAG
TTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG
ATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGG
TTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA

Figura 6 (2/2)

CTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGC

TAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTAC

CGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG

AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG

TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTG

TCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG

CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCC

CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCA

GCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCAC

ACCGCATAAATTCCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTC

AATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCG

TTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGC

TGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCA

GTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGG

TGGTGTCGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCA

GTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGG

CGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGG

GCGTGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTCACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGC

GTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACT

GGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTG

CCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGATATCTCGG

TAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCC

TGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGC

CCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATT

CATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAG

CTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA

CAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA

AAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC

CCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGA

AGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGCAGAT

GCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGA

GAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTAT

TTTTGATGGCGTTGGAATT

Figura 7 (1/3)

Secuencia de pET32

atccggatatagttcctcctttcagcaaaaaaccccctcaagacccgtttagaggccccaaggggttatgctagtt
attgctcagcggtggcagcagccaactcagcttcctttcgggctttgttagcagccggatctcagtggtggtggt
ggtggtgctcgagtgcggccgcaagcttgtcgacggagctcgaattcggatccgatatcagccatggccttgtcg
tcgtcgtcggtacccagatctgggctgtccatgtgctggcgttcgaatttagcagcagcggtttctttcatacca
gaaccgcgtggcaccagaccagaagaatgatgatgatgatggtgcatatggccagaaccagaaccggccaggtta
gcgtcgaggaactctttcaactgacctttagacagtgcacccactttggttgccgccacttcaccgtttttgaac
agcagcagagtcgggataccacggatgccatatttcggcgcagtgccagggttttgatcgatgttcagttttgca
acggtcagtttgccctgatattcgtcagcgatttcatccagaatcggggcgatcattttgcacggaccgcaccac
tctgcccagaaatcgacgaggatcgccccgtccgctttgagtacatccgtgtcaaaactgtcgtcagtcaggtga
ataattttatcgctcatatgtatatctccttcttaaagttaaacaaaattatttctagaggggaattgttatccg
ctcacaattcccctatagtgagtcgtattaatttcgcgggatcgagatcgatctcgatcctctacgccggacgca
tcgtggccggcatcaccggcgccacaggtgcggttgctggcgcctatatcgccgacatcaccgatggggaagatc
gggctcgccacttcgggctcatgagcgcttgtttcggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgggggactgt
tgggcgccatctccttgcatgcaccattccttgcggcggcggtgctcaacggcctcaacctactactgggctgct
tcctaatgcaggagtcgcataagggagagcgtcgagatcccggacaccatcgaatggcgcaaaacctttcgcggt
atggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgca
gagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgg
gaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacag
tcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatct
cgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcg
gtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgct
gtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatt
ttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgtta
gcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaatt
cagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgag
ggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtcc
gggctgcgcgttggtgcggacatctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccg
ttaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggc
caggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaa
accgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcag
tgagcgcaacgcaattaatgtaagttagctcactcattaggcaccgggatctcgaccgatgcccttgagagcctt
caacccagtcagctccttccggtgggcgcggggcatgactatcgtcgccgcacttatgactgtcttctttatcat
gcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgaggaccgctttcgctggagcgcgacgat

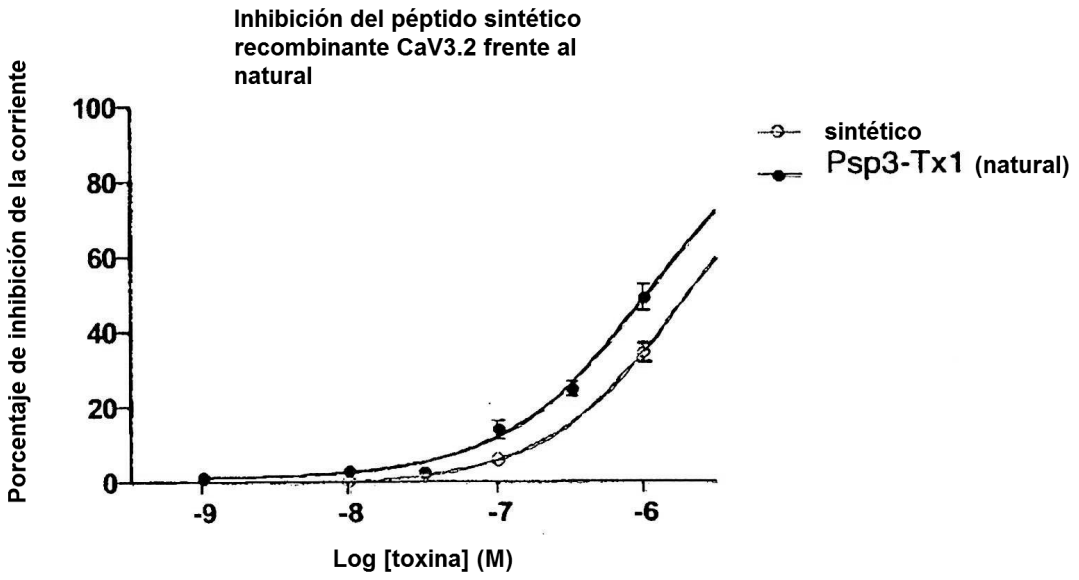
Figura 7 (2/3)

gatcggcctgtcgcttgcggtattcggaatcttgcacgccctcgctcaagccttcgtcactggtcccgccaccaa
acgtttcggcgagaagcaggccattatcgccggcatggcggccccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgtcgtt
gaggacccggctaggctggcggggttgccttactggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaag
cgactgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcggtttccgtgtttcgtaaagtct
ggaaacgcggaagtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggctaccctgtgg
aacacctacatctgtattaacgaagcgctggcattgaccctgagtgatttttctctggtcccgccgcatccatac
cgccagttgtttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaacccgtatcgtgagcatcct
ctctcgtttcatcggtatcattacccccatgaacagaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaacagga
aaaaaccgcccttaacatggcccgctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaacgagctgga
cgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgcg
tttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgc
cgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacg
tagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatatgc
ggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgact
cgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaat
caggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgc
tggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacc
cgacaggactataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgc
ttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctca
gttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttat
ccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacagga
ttagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagga
cagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaac
aaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaag
atcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagat
tatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagt
aaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatcca
tagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatga
taccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaa
gtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccag
ttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctgcaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcat
tcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcg
gtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctc
ttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgta
tgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgc

Figura 7 (3/3)

tcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaac
ccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggc
aaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttcaatattatt
gaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggg
ttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgaaattgtaaacgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatt
tttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccg
agatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggc
gaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcaccctaatcaagtttttggggtcgaggtgcc
gtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcga
gaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaacca
ccacacccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtcccattcgcca

Figura 8

Inhibición de Cav3.2 recombinante

Péptido sintético frente al natural