(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 639 121**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)
C07K 7/00	(2006.01)
C07K 14/00	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2013 PCT/KR2013/006009**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14007584**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2013 E 13812631 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2870171**

(54) Título: **Péptidos señuelo que inhiben la desfosforilación de fosfolambano mediada por la proteína fosfatasa 1**

(30) Prioridad:

05.07.2012 US 201261668034 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2017

(73) Titular/es:

GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (100.0%)
261 Cheomdan - gwagiro (Oryong-dong)
Buk-gu, Gwangju 500-712, KR

(72) Inventor/es:

PARK, WOO JIN;
HAJJAR, ROGER J. y
OH, JAE GYUN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 639 121 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos señuelo que inhiben la desfosforilación de fosfolambano mediada por la proteína fosfatasa 1

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad a partir de la Solicitud de Patente Estadounidense Provisional No. 61/668.034 presentada el 5 de julio de 2012.

DECLARACIÓN SOBRE INVESTIGACIÓN CON FINANCIACIÓN FEDERAL

Esta invención fue apoyada por el Programa de Laboratorio de Investigación Global (M6-0605-00-0001) financiado por el Gobierno Coreano (MEST), una subvención de Systems Biology Infrastructure Establishment Grant otorgada por GIST y la subvención NIH (HL- 080498-01).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un péptido o polipéptido señuelo de fosfolambano capaz de inhibir la desfosforilación mediada por la proteína fosfatasa 1 de fosfolambano y su uso así como un método para preparar el péptido o polipéptido señuelo.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

La insuficiencia cardíaca sigue siendo una causa principal de mortalidad y morbilidad en todo el mundo [1-3]. Se caracteriza por un aumento en el tamaño de la cámara ventricular y una reducción de la función sistólica del corazón. Estudios anteriores apoyan la noción de que las anormalidades en la contractilidad cardiaca causan la iniciación y la progresión de la insuficiencia cardíaca [4-6]. La contractilidad de los cardiomiocitos se regula directamente por el ciclo intracelular de Ca^{2+} [7, 8]. Una pequeña cantidad de Ca^{2+} extracelular ingresa a los cardiomiocitos a través del canal de Ca^{2+} tipo L dependiente del voltaje, y luego es seguida por una liberación grande de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SR) a través del receptor ryanodina (RyR) [9]. Este aumento de Ca^{2+} intracelular desencadena la contracción de los miofilamentos. La reabsorción de Ca2 + de nuevo en la SR a través de SR Ca^{2+} -ATPasa (SERCA) 2a y el intercambiador de Na^{+}/Ca^{2+} en el sarcolema inicia entonces la relajación de los miofilamentos.

Estudios anteriores mostraron que la disminución de la expresión y la actividad de SERCA2a se asocian con insuficiencia cardíaca en humanos y modelos animales [10-12]. Por lo tanto, la restauración de los niveles de SERCA2a mediante el aumento de la dosificación génica se pensó que era un enfoque racional para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Esto resultó ser el caso cuando se utilizan modelos de insuficiencia cardíaca de ratas [13-15] y cerdos [16]. Además, recientemente se demostró que la administración de SERCA2a mediada por virus adenoasociados es una modalidad segura y eficaz para mejorar las funciones cardíacas en pacientes con insuficiencia cardíaca [17, 18].

La actividad de SERCA2a está regulada negativamente por un inhibidor endógeno, PLB (fosfolambano), que a su vez está regulado por PKA (proteína quinasa A), CaMKII (Ca^{2+}/calmodulina dependiente de proteína quinasa II) y PP1 (proteína fosfatasa 1). La fosforilación en Ser^{16} y Thr^{17} de PLB por PKA y CaMKII, respectivamente, provoca la disociación de PLB de SERCA2a, lo que permite actividad casi máxima Ca^{2+}-ATPasa de SERC2a [19-21]. Por el contrario, la desfosforilación de PLB en Ser^{16} o Thr^{17} por PP1 aumenta la asociación entre PLB y SERCA2a y la inhibición de SERCA2a por PLB [22, 23]. Curiosamente, la fosforilación reducida de PLB [24-26] concomitantemente con un aumento de la actividad PP1 [27, 28] se ha observado en modelos animales y la etapa final de insuficiencia cardíaca humana. Por lo tanto, la normalización de la actividad de PP1 y la fosforilación de PLB serían un enfoque razonable para mejorar la función cardíaca y suprimir la progresión de la insuficiencia cardíaca.

Los señuelos moleculares tales como péptidos pequeños que imitan las proteínas diana se han utilizado con éxito para interferir con las interacciones proteína-proteína [29], fosforilación de proteínas diana por proteínas quinasas [30], y desfosforilación de las proteínas fosforiladas por las fosfatasas [31, 32].

A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas patentes y publicaciones, y se proporcionan citaciones entre paréntesis.

Karczewski et al. 1997 (37) revela que el fosfolambano (PLB), el regulador de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico cardíaco (SR) es fosforilado específicamente en Ser^{16} y Thr^{17} por la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) y la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina (CaMK), respectivamente. Para estudiar la fosforilación específica del sitio de PLB, los autores utilizaron un péptido sintético (PLB-24) correspondiente a la parte citosólica del monómero PLB con los sitios de fosforilación como sustrato modelo.

Lockamy et al. 2011 (38) utiliza la correconstitución funcional del retículo sarcoplásmico purificado (SR) Ca^{2+}-ATPasa (SERCA) con fosfolambano (PLB), su inhibidor en el corazón, para probar la hipótesis de que la pérdida de función de los mutantes PLB (LOF) PLBM) puede competir con PLB de tipo salvaje (PLBW) para aliviar la inhibición de SERCA.

El documento US 2004/121942 describe un método para el tratamiento de insuficiencia cardíaca mediante el uso de pequeños complejos peptídicos y proteínas recombinantes que funcionan para aumentar la contractilidad en corazones que fallan y reducir la presión sanguínea en individuos con hipertensión inhibiendo la interacción entre fosfolambano y Ca^{2+} ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA2a) dentro de los cardiomiocitos. Además, el documento US 2004/121942 también describe un medio para el transporte de tales agentes terapéuticos en el citoplasma y el núcleo de cardiomiocitos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Los presentes inventores han realizado investigaciones intensivas con relación a un péptido o polipéptido señuelo para el tratamiento de enfermedades asociadas con PBL, en particular, causadas por una actividad disminuida de SERCA2a por niveles de desfosforilación de PLB. Como resultado, hemos sintetizado un péptido señuelo que eleva significativamente los niveles de fosforilación de PLB.

Además, hemos descubierto que el péptido señuelo aumenta los parámetros contráctiles in vitro y mejora la presión ventricular izquierda desarrollada ex vivo. Es decir, se ha descubierto que el péptido o polipéptido señuelo proporciona efectos cardioprotectores restableciendo la actividad de SERCA2a y el efecto inotrópico de potenciar la contractilidad miocárdica y por lo tanto el péptido o polipéptido señuelo se usaría para tratar las enfermedades asociadas con PLB inhibiendo la desfosforilación de PLB.

La invención se refiere a un péptido o polipéptido señuelo que consiste en una secuencia peptídica representada por la siguiente Fórmula I:

X1-Ala-X2-X3-Ile-Glu-X4 (I)

en la que X_1 representa 0-1 residuos de aminoácidos, X_2 representa Ser, Glu o Asp, X_3 representa Thr, Glu o Asp y X_4 representa 0-3 residuos de aminoácidos, con la condición de que X_2 no sea Ser cuando X_3 es Thr;

en la que el péptido o polipéptido señuelo inhibe la desfosforilación de PLB (fosfolambano) mediada por PP1 (proteína fosfatasa 1) por una inhibición competitiva,

en la que ni X_1 ni X_4 contienen dominios que abarcan la membrana con la condición de que el péptido no sea Tyr Ala Asp Asp Ile Glu Lys Lys Ile. La invención se refiere además a una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades asociadas con PLB, que comprende

(a) una cantidad farmacéuticamente efectiva del péptido o polipéptido señuelo que consiste en una secuencia peptídica representada por la Fórmula I siguiente:

X_1-Ala-X_2-X_3-Ile-Glu-X_4 (I)

en la que X_1 representa 0-1 residuos de aminoácidos, X_2 representa Ser, Glu o Asp, X_3 representa Thr, Glu o Asp y X_4 representa 0-3 residuos de aminoácidos, con la condición de que X_2 no sea Ser cuando X_3 es Thr;

en el que el péptido o polipéptido señuelo inhibe la desfosforilación de PLB (fosfolambano) mediada por PP1 (proteína fosfatasa 1) por una inhibición competitiva,

en la que ni X_1 ni X_4 contienen dominios que abarcan la membrana, y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a un método para preparar un péptido o polipéptido señuelo de PLB capaz de inhibir la desfosforilación mediada por PP1 de PLB por una inhibición competitiva, que comprende:

(a) diseñar el péptido o polipéptido señuelo de PLB sustituyendo un residuo de Ser en la posición de aminoácido 16 y/o un residuo de Thr en la posición de aminoácido 17 de la secuencia de aminoácidos de PLB (SEQ ID NO: 10) con un Glu o Asp y seleccionar 0-4 residuos de aminoácidos circundantes alrededor de la posición de aminoácidos 15-19 de la secuencia de aminoácidos de PLB (SEQ ID NO: 10), de manera que el péptido o polipéptido señuelo se compone de una secuencia peptídica representada por la Fórmula I siguiente:

X_1-Ala-X_2-X_3-Ile-Glu-X_4 (I)

en la que X_1 representa 0-1 residuos de aminoácidos, X_2 representa Ser, Glu o Asp, X_3 representa Thr, Glu o Asp y X_4 representa 0-3 residuos de aminoácidos, con la condición de que X_2 no sea Ser cuando X_3 es Thr, donde ni X1 ni X_4 contienen dominios que abarcan la membrana; y

(b) preparar el péptido o polipéptido señuelo diseñado en la etapa (a).

Otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue tomada en conjugación con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1a representa la estructura de PLB monomérico (izquierda) y las secuencias de aminoácidos de péptidos señuelo (derecha); la estructura en "L" del PLB monomérico está compuesta de hélice citoplásmica, un bucle corto de conexión y una hélice transmembrana. Los péptidos se derivaron de los nueve aminoácidos que componen el bucle de conexión. En los péptidos señuelo, los residuos Ser (S, serina) o Thr (T, treonina) se reemplazaron con Glu (E, ácido glutámico) para imitar la fosforilación. Los residuos de ácido glutámico reemplazados están subrayados.

La Fig. 1b representa la captación intracelular de péptidos señuelo en cardiomiocitos. Los cardiomiocitos aislados se incubaron con 1 μM de solución de péptido durante 1 hora a 37ºC. Con, célula no tratada; ψPLB-SE, péptidos señuelo marcados con FITC; DIC, contraste diferencial de imágenes por interferencia; FITC, imagen fluorescente FITC.

Las Figs. 1c-1d representan el aumento de la fosforilación de PLB por los péptidos señuelo (Figura 1c) y los péptidos señuelo acortados (Figura 1d). Los cardiomiocitos adultos aislados se trataron con 1 μM de péptidos indicados durante 45 min, y luego con 1 μM de PMA durante 15 min. Las transferencias de Western de lisados celulares fueron entonces sondeadas con anticuerpos contra fosfo-PLB (S^{16}), fosfo-PLB (T^{17}), PLB total o GAPDH. Los péptidos señuelo contienen las siguientes secuencias: ψPLB-SE, RAETIEMPQ (SEQ ID NO: 1); ΨPLB-SD, RADTIEMPQ (SEQ ID NO: 3); ΨPLB-TE, RASEIEMPQ (SEQ ID NO: 2). Los péptidos de señuelo acortados contienen las siguientes secuencias: ψPLB-8-mero, AETIEMPQ (SEQ ID NO: 4); ΨPLB-7-mero, RAETIEM (SEQ ID NO: 5); ΨPLB-6-mero, RAETIE (SEQ ID NO: 6); ΨPLB-5-mero: RAETI (SEQ ID NO: 7). PMA, 13-acetato 12-miristato de forbol.

Las Figs. 2a-2d representan el aumento de la contractilidad cardiaca por los péptidos señuelo. Los cardiomiocitos adultos aislados se trataron con 1 μM de péptidos indicados durante 45 min, y luego con 1 μM de PMA durante 15 min. Luego se determinaron los parámetros contráctiles. Las Figs. 2a y 2b muestran parámetros contráctiles. Acortamiento celular máximo, porcentaje de longitudes de células acortadas; -dL/dt, tasa máxima de acortamiento celular; -dL/dt, tasa máxima de refuerzo celular. Las Figs. 2c y 2d muestran parámetros promedio de las propiedades transitorias de Ca^{2+} determinadas con Fura2/AM. Línea base de $[Ca^{2+}]i$, niveles basales de Ca^{2+} intracelular; Δ $[Ca^{2+}]i$ (340/380), aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a estímulos eléctricos; τ (ms), Ca^{2+} tasa de decaimiento transitorio. Se seleccionaron aproximadamente 500 células para la contractilidad y se tomaron mediciones transitorias de Ca^{2+} de ocho corazones individuales. #, $P < 0,05$; *, $P <0,01$ en comparación con el control; Las barras de error representan SD.

Las Figs. 3a-3b representan el rendimiento cardiaco postisquémico ex vivo. La Fig. 3a muestra corazones de rata que fueron perfundidos con Langendorff, y se sometieron a 20 minutos de ausencia de flujo para inducir la isquemia global, y a continuación a 30 minutos de reperfusión con coadministración de 1 μM de TAT o de ψPLB-SE. Se muestran los cambios en la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (LVDP). N = 4. *, $P <0,01$ en comparación con TAT; las barras de error representan SEM. La Fig. 3b muestra lisados de proteínas que se prepararon después de la reperfusión. Se muestran las transferencias Western sondeadas con anticuerpos contra fosfo-PLB (S^{16}), fósforo-PLB (T^{17}), PLB total, Caspasa 3 o GAPDH.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ESTA INVENCIÓN

En un aspecto de la invención, se proporciona un péptido o polipéptido señuelo que consiste en una secuencia peptídica representada por la Fórmula I siguiente:

$$X_1\text{-Ala-}X_2\text{-}X_3\text{-Ile-Glu-}X_4 \quad (I)$$

en la que X_1 representa 0-1 residuos de aminoácidos, X_2 representa Ser, Glu o Asp, X_3 representa Thr, Glu o Asp y X_4 representa 0-3 residuos de aminoácidos, con la condición de que X_2 no sea Ser cuando X_3 es Thr;

en el que el péptido o polipéptido señuelo inhibe la desfosforilación de PLB (fosfolambano) mediada por PP1 (proteína fosfatasa 1) por una inhibición competitiva,

en la que ni X_1 ni X_4 contienen dominios que abarcan la membrana.

Los presentes inventores han hecho investigaciones intensivas con relación a un péptido o polipéptido señuelo para el tratamiento de enfermedades asociadas con PBL, en particular, causadas por una actividad disminuida de SERCA2a por niveles de desfosforilación de PLB. Como resultado, hemos sintetizado un péptido señuelo que eleva significativamente los niveles de fosforilación de PLB. Además, hemos descubierto que el péptido señuelo aumenta los parámetros contráctiles in vitro y mejora la presión ventricular izquierda desarrollada ex vivo. Es decir, se ha descubierto que el péptido o polipéptido señuelo proporciona efectos cardioprotectores restableciendo la actividad de SERCA2a y el efecto inotrópico de potenciar la contractilidad miocárdica y por lo tanto el péptido o polipéptido señuelo se usaría para tratar las enfermedades asociadas con PLB por Inhibiendo la desfosforilación de PLB.

El péptido o polipéptido señuelo de la presente invención que consiste en una secuencia peptídica representada por La Fórmula I siguiente: X_1-Ala-X_2-X_3-Ile-Glu-X_4 (I).

El péptido o polipéptido señuelo diseñado para imitar la PLB fosforilada inhibe la desfosforilación mediada por PP1 de PLB y eleva significativamente los niveles de fosforilación de PLB y aumenta los parámetros contráctiles, mejorando así significativamente la presión ventricular izquierda desarrollada. El péptido o polipéptido señuelo proporciona una modalidad alternativa para la restauración de la actividad de SERCA2a en corazones que fallan.

En el péptido o polipéptido señuelo de la presente invención, la secuencia "Ala-X_2-X_3-Ile-Glu" es necesaria para sus acciones y funciones. Los residuos X_1 y X_4 pueden tener variaciones definidas en las reivindicaciones. El término utilizado aquí "péptido", significa una molécula lineal formada uniendo residuos de aminoácidos a través de enlaces peptídicos. El término utilizado aquí "polipéptido". Significa cualquier polímero de aminoácidos (iguales o diferentes) unidos a través de enlaces peptídicos.

El término utilizado aquí "péptido o polipéptido señuelo" en conjunción con PLB es el péptido o polipéptido diseñado que comprende una secuencia peptídica que imita un lazo corto de conexión de PLB fosforilado y es capaz de unirse a PP1 de una manera competitiva, bloqueando así La acción de PP1.

El término utilizado aquí "desfosforilación mediada por PP1" significa la desfosforilación de PLB por PP1.

El término utilizado aquí "inhibición competitiva" con referencia al péptido señuelo (o polipéptido) significa la inhibición de la desfosforilación uniéndose competitivamente a PP1 para formar el péptido señuelo o el complejo polipéptido-PP1. El péptido o polipéptido señuelo se une a PP1 de tal manera que compite con los sitios de fosforilación de PLB para la unión a PP1.

En ciertas realizaciones, el péptido o polipéptido señuelo de la presente invención es péptido o polipéptido citosólico. Es decir, en la Fórmula I, X_1 y X_4 no contienen un dominio de aminoácidos que impida que el péptido o polipéptido señuelo exista en el citosol. Por ejemplo, el dominio de aminoácidos incluye dominios que abarcan la membrana y dominios de orientación de organelos, pero sin limitarse a ellos. A este respecto, X_1 y X_4 abarcan cualquier residuo de aminoácido, siempre que permitan que el péptido o polipéptido señuelo se sitúe en el citosol. Se describe aquí un péptido de Fórmula I, X_1 representa 0-40, 0-30, 0-20, 0-10, 0-3 o 0-1 residuos de aminoácidos.

En la Fórmula I, cualquier aminoácido está situado en X_1. En ciertas realizaciones, X_1 consiste en una secuencia de aminoácidos que abarca 0-50, 0-40, 0-30, 0-20, 0-10, 0-3 o 0-1 residuos de aminoácidos en el extremo N- Terminal de la posición de aminoácidos 15 de la secuencia de aminoácidos de PLB (véase SEQ ID NO: 10). En otras realizaciones, X_1 consiste en 1 residuo de aminoácidos en la dirección N-terminal de la posición de aminoácidos 15 de la secuencia de aminoácidos de PLB (ver SEC ID No: 10). Se da a conocer aquí un péptido de Fórmula I, X_4 representa 0-40, 0-30, 0-20, 0-10 o 0-3 residuos de aminoácidos.

En la Fórmula I, cualquier aminoácido está situado en X_4. Se divulga en el presente documento un péptido en el que X_4 comprende una secuencia de aminoácidos que abarca 0-50, 0-40, 0-30, 0-20, 0-10 o 0-3 residuos de aminoácidos en la dirección C-terminal de la posición de aminoácido 19 de la secuencia de aminoácidos de PLB (véase SEC ID NO: 10). En otras realizaciones, X_4 consiste en una secuencia de aminoácidos que abarca 0 o 3 residuos de aminoácidos en la dirección N-terminal de la posición de aminoácido 19 de la secuencia de aminoácidos de PLB (ver SEQ ID NO: 10). En otras realizaciones, X_4 consiste en una secuencia de aminoácidos que abarca 3 residuos de aminoácidos en la dirección N-terminal de la posición de aminoácido 19 de la secuencia de aminoácidos de PLB (ver SEQ ID NO: 10).

En otras realizaciones, en las que X_1 es Arg.

En otras realizaciones, en las que X_4 es Met, Met-Pro o Met-Pro-Gln.

El residuo de Ser en la posición de aminoácido 16 (Ser^{16}) y el residuo de Thr en la posición de aminoácido 17 (Thr^{17}) de la secuencia de aminoácidos de PLB (ver SEQ ID NO: 10) son los sitios de fosforilación situados dentro de la región (la posición de aminoácidos 14-22 de la secuencia de aminoácidos de PLB (véase SEC ID NO: 10)) de PLB.

En la Fórmula I, X_2 y X_3 representan la posición de aminoácidos ocupada por los Ser^{16} y Thr^{17} en PLB, respectivamente.

En la presente invención, el péptido o polipéptido señuelo se diseña sustituyendo los residuos Ser^{16} y/o Thr^{17} con un residuo Glu o Asp. El péptido o polipéptido señuelo que comprende un residuo Glu o Asp en X_2 y/o X_3 de Fórmula I es similar a PLB fosforilado, por lo que compite con los sitios de fosforilación de PLB para la unión a PP1.

En otras realizaciones, X_2 es Glu o Asp y X_3 es Thr, Glu o Asp. En otras realizaciones, X_2 es Glu o Asp y X_3 es Thr.

En realizaciones particulares, el péptido o polipéptido señuelo consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de secuencias de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NOs: 1-6. En realizaciones particulares, el péptido o polipéptido señuelo consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de secuencias de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NOs: 1 y 3-6. En realizaciones particulares, el péptido o polipéptido señuelo está constituido por la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOs: 1, 3 y 6.

Las secuencias SEQ ID NO: 1-6 son como sigue:

La secuencia SEQ ID NO: 1 es Arg-Ala-Glu-Thr-Ile-Glu-Met-Pro-Gln.

La secuencia SEQ ID NO: 2 es Arg-Ala-Ser-Glu-Ile-Glu-Met-Pro-Gln.

La secuencia SEQ ID NO: 3 es Arg-Ala-Asp-Thr-Ile-Glu-Met-Pro-Gln.

La secuencia SEQ ID NO: 4 es Ala-Glu-Thr-Ile-Glu-Met-Pro-Gln.

La secuencia SEQ ID NO: 5 es Arg-Ala-Glu-Thr-Ile-Glu-Met.

La secuencia SEQ ID NO: 6 es Arg-Ala-Glu-Thr-Ile-Glu.

El péptido o polipéptido señuelo de la presente invención puede incluir péptido o polipéptido en el que uno o más de los aminoácidos tienen modificación de la cadena lateral. Ejemplos de modificaciones de cadenas laterales incluyen modificaciones de grupos amino tales como por alquilación reductora; amidación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2, 4, 6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido de reducción con $NaBH_4$.

El grupo guanidina de residuos de arginina puede ser modificado por la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilglioxal y glioxal. El grupo carboxilo puede ser modificado por la activación de carbodiimida por formación de O-acilisourea seguido por derivación posterior, por ejemplo, a una amida correspondiente.

Los grupos sulfhidrilo pueden ser modificados por métodos tales como carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; oxidación ácida eficaz a ácido cisteico; formación de disulfuros mixtos con otros compuestos de tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados mercuriales usando 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercuri-4-nitrofenol y otros mercuriales; carbamoilación con cianato a pH alcalino. Cualquier modificación de los residuos de cisteína no debe afectar a la capacidad del péptido para formar los enlaces disulfuro necesarios. También es posible sustituir el grupo sulfhidrilo de cisteína con equivalentes de selenio de manera que el péptido forme un enlace diselénico en lugar de uno o más de los enlaces disulfuro.

Los residuos de triptófano pueden modificarse, por ejemplo, mediante oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo de indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros de sulfenilo. Los residuos de tirosina, por otra parte, pueden ser alterados por nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

La modificación del anillo de imidazol de un residuo de histidina puede realizarse por alquilación con derivados de ácido yodoacético o N-carbetoxilación con pirocarbonato de dietilo.

El residuo de prolina puede modificarse, por ejemplo, mediante hidroxilación en la posición 4.

El péptido o polipéptido señuelo de la presente invención posee una estabilidad mucho mayor por modificaciones. Por ejemplo, el péptido o polipéptido señuelo tiene al menos un residuo de aminoácidos protegido con un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo o un polietilenglicol. En ciertas realizaciones, el péptido o polipéptido señuelo tiene al menos un residuo de aminoácidos protegido con grupo acetilo.

El término utilizado aquí "estabilidad" se refiere a estabilidad in vivo y estabilidad al almacenamiento (por ejemplo, estabilidad al almacenamiento a temperatura ambiente). El grupo de protección descrito anteriormente protege los péptidos del ataque de la proteasa in vivo.

En otras realizaciones, el péptido o polipéptido señuelo está enlazado adicionalmente a un péptido permeable a través de la membrana celular. En otras realizaciones, el extremo N-terminal y/o C-terminal del péptido o polipéptido señuelo está enlazado adicionalmente a un péptido permeable a través de la membrana celular.

Para que el péptido o polipéptido señuelo de la presente invención sea transferido a cardiomiocitos, puede contener el péptido permeable a través de la membrana celular. El término utilizado aquí "péptido permeable a través de la membrana celular" significa un péptido necesariamente requerido para introducir un péptido (o proteína) específico en una célula. Por lo general, consiste en 5-50 o más secuencias de aminoácidos.

El péptido permeable a través de la membrana celular es un péptido capaz de pasar a través de la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular tal como es. Por ejemplo, incluye un péptido derivado de Tat, un péptido de señalización (por ejemplo, un péptido que penetra en las células), un péptido rico en arginina, un transportan, o un portador péptido anfifático, pero no limitado a (Morris, M.C. et al., Nature Biotechnol, 19: 1173-1176 (2001), Dupont, A.J. y Prochiantz, A., CRC Handbook on Cell Penetrating Peptides, Langel, Editor, CRC Press (2002), Chaloin, L. et al., Biochemistry 36 37): 11179-87 (1997) y Lundberg, P. y Langel, U., J. Mol. Recognit 16 (5): 227-233 (2003)). Además de estos péptidos naturales, se conocen varios péptidos basados en antennapedia capaces de atravesar la membrana celular, incluyendo péptidos retroinversos e isómeros D (Brugidou, J. et al., Biochem Biophys Res. Commun. 214 (2): 685-93 1995), Derossi, D. et al., Trends Cell Biol. 8: 84-87 (1998)).

En ciertas realizaciones, el péptido TAT (péptido derivado de Tat) puede usarse como el péptido permeable a través de la membrana celular.

La proteína Tat, que se origina a partir del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), consiste en 86 aminoácidos y tiene dominios de unión a integrina y complejos ricos en cisteína como dominios proteicos principales. Aunque el péptido TAT tiene una propiedad penetrante de membrana celular sólo con la secuencia YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:11) (es decir, los 48 a 60 aminoácidos de la proteína Tat), se sabe que es posible una penetración más eficiente cuando tiene una estructura ramificada que incluye varias copias de la secuencia RKKRRQRRR (Tung, CH et al., Bioorg. Med. Chem. 10: 3609-3614 (2002)). Los diversos péptidos Tat que tienen capacidad de penetrar en la membrana celular se describen en Schwarze, S.R. et al., Science 285: 1569-1572 (1999). En ciertas realizaciones, el péptido TAT comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 11.

Además, el péptido o polipéptido señuelo de la presente invención puede comprender además la proteína de fusión para una purificación conveniente, que incluye, pero sin limitarse a, glutatión S-transferasa (Pharmacia, EE.UU.), proteína de unión a maltosa (NEB, EE.UU.), FLAG (IBI, EE.UU.), o 6X His (hexahistidina, Quiagen, EE.UU.). En ciertas realizaciones, la proteína de fusión puede purificarse por cromatografía de afinidad. Por ejemplo, se emplea un amortiguador de elución que contiene glutatión para proteínas de fusión con glutatión S-transferasa y resina de unión His Ni-NTA (Novagen, EE.UU.) para proteínas de fusión con 6X His para purificar la proteína de fusión de interés de una manera rápida y factible.

En otras realizaciones, PLB se deriva de humanos y sus secuencias de aminoácidos se describen en NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ejemplos de Números de Acceso de las secuencias de aminoácidos de PLB humano en NCBI son AAA60109.1, AAA60083.1 y AAD55950.1.

En otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad asociada con PLB, que comprende (a) una cantidad farmacéuticamente efectiva del péptido o polipéptido señuelo que consiste en una secuencia peptídica representada por la siguiente Fórmula I:

$$X_1\text{-Ala-}X_2\text{-}X_3\text{-Ile-Glu-}X_4 \quad (I)$$

en la que X_1 representa 0-1 residuos de aminoácidos, X_2 representa Ser, Glu o Asp, X_3 representa Thr, Glu o Asp y X_4 representa 0-3 residuos de aminoácidos, con la condición de que X_2 no sea Ser cuando X_3 es Thr;

en la que el péptido o polipéptido señuelo inhibe la desfosforilación de PLB (fosfolambano) mediada por PP1 (proteína fosfatasa 1) por una inhibición competitiva,

en la que ni X_1 ni X_4 contienen dominios que abarcan la membrana y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término utilizado aquí como "prevención" con referencia a una enfermedad asociada con PLB se refiere a la prevención completa de una enfermedad asociada con PLB, a la prevención de la aparición de síntomas en un sujeto con la enfermedad o a la prevención de la recurrencia de los síntomas en un sujeto con la enfermedad.

El término utilizado en la presente memoria "tratar" con referencia a una enfermedad asociada con PLB se refiere a la eliminación parcial o total de síntomas o disminución en la gravedad de los síntomas de una enfermedad asociada con PLB en el sujeto.

El término utilizado aquí "cantidad farmacéuticamente efectiva" con referencia a una enfermedad asociada con PLB significa una dosis suficiente en el sujeto al que se administra, para prevenir o tratar los síntomas, afecciones o enfermedades asociadas con PLB.

El término utilizado aquí "sujeto" pretende abarcar humano, mamífero no humano o animal. Los mamíferos no humanos incluyen animales de ganado y animales de compañía, tales como ganado vacuno, ovejas, cabras, equinos, cerdos, perros y gatos.

De acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica que comprende el péptido o polipéptido señuelo como ingrediente activo se usaría para prevenir o tratar una enfermedad asociada con PLB.

La contractilidad de los cardiomiocitos está regulada directamente por el ciclo intracelular de Ca^{2+}, y la SERCA2a desempeña un papel crucial en el manejo de Ca^{2+} en cardiomiocitos. El PLB es un inhibidor endógeno de SERCA2a y su actividad inhibitoria se incrementa mediante la desfosforilación por PP1.

En la presente invención, el péptido señuelo eleva significativamente los niveles de fosforilación de PLB (ver Fig. 1c y 1d). Además, el péptido señuelo aumenta los parámetros contráctiles in vitro (ver Figuras 2a-2d) y mejora la presión ventricular izquierda desarrollada ex vivo (véanse las Figuras 3a y 3b). Es decir, el péptido o polipéptido señuelo proporciona efectos cardioprotectores restableciendo la actividad de SERCA2a y el efecto inotrópico de potenciar la contractilidad miocárdica y por lo tanto el péptido o polipéptido señuelo se usaría para prevenir o tratar las enfermedades asociadas con PLB inhibiendo la desfosforilación mediada por PP1 De PLB.

En ciertas realizaciones, la enfermedad asociada con PLB es una enfermedad cardíaca. En ciertas realizaciones, la enfermedad cardíaca es insuficiencia cardíaca, isquemia, arritmia, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, rechazo de trasplante, contractilidad anormal del corazón o metabolismo anómalo de Ca^{2+}. En ciertas realizaciones, la enfermedad cardíaca es insuficiencia cardíaca o isquemia. En realizaciones particulares, la enfermedad cardíaca es insuficiencia cardíaca.

El término utilizado aquí "insuficiencia cardiaca" significa un síntoma clínico en el que el volumen sistólico del corazón disminuye por debajo de un valor normal y el corazón deja de suministrar suficiente sangre a los tejidos periféricos. En otras palabras, insuficiencia cardíaca significa el estado en el que la capacidad del corazón para bombear la sangre disminuye debido a varias causas o suficiente sangre no puede ser suministrado al cuerpo, incluso cuando el corazón late normalmente.

En otras realizaciones, la insuficiencia cardíaca es inducida por hipertrofia cardíaca, arteriosclerosis coronaria, infarto de miocardio, cardiopatía valvular, hipertensión o cardiomiopatía.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica inotrópica.

De acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica puede contener vehículos farmacéuticamente aceptables. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser convencional para la formulación, incluyendo lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, caucho arable, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, y aceites minerales, pero sin limitarse a ellos. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede incluir además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Detalles de portadores y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª edición, 1995), que se incorpora aquí como referencia.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra parenteralmente, puede hacerse por administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, abdominal o transdérmica.

Una cantidad de dosificación adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de los métodos de formulación farmacéutica, métodos de administración, edad del paciente, peso corporal, sexo, estado patogénico, dieta, tiempo de administración, vía de administración, velocidad de excreción y sensibilidad para una composición farmacéutica usada y los médicos con conocimientos ordinarios en la técnica pueden determinar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica para el tratamiento deseado. Generalmente, la unidad de dosificación adecuada para el huésped humano es administrar con la composición farmacéutica en 0,0001-100 mg/kg (peso corporal).

De acuerdo con las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, la composición farmacéutica puede formularse con vehículo y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como se ha descrito anteriormente, proporcionando finalmente varias formas incluyendo una forma de dosis unitaria y una forma de dosis múltiple. La formulación puede ser aceite o medio acuoso, resuspensión o emulsión, extracto, polvo, gránulo, tableta y cápsula y comprende además dispersante o estabilizante.

En otro aspecto de esta invención, se proporciona un método para preparar un péptido o polipéptido señuelo de PLB capaz de inhibir la desfosforilación mediada por PP1 de PLB mediante una inhibición competitiva, que comprende (a) diseñar el péptido o polipéptido señuelo de PLB Sustituyendo un residuo de Ser en la posición de aminoácido 16 y/o un residuo de Thr en la posición de aminoácido 17 de la secuencia de aminoácidos de PLB (SEQ ID NO: 10) con un residuo de Glu o Asp y seleccionando 0-4 amino ácido(s) circundante(s) alrededor de la posición de aminoácido (15-19) de la secuencia de aminoácidos de PLB (SEQ ID NO: 10), de manera que el péptido o polipéptido señuelo se compone de una secuencia peptídica representada por la Fórmula I siguiente: X_i-Ala-X_2-X_3-Ile-Glu-X_4 (1) en la que X_1 representa 0-1 residuos de aminoácidos, X_2 representa Ser, Glu o Asp, X_3 representa Thr, Glu o Asp y X_4 representa 0-3 (S) de aminoácido, con la condición de que X_2 no sea Ser cuando X_3 es Thr, con la condición de que el péptido sea No Tyr Ala Asp Asp Ile Glu Lys Lys Ile; y (b) preparar el péptido o polipéptido señuelo diseñado en la etapa (a).

La presente invención se describirá con más detalle como sigue:

En el péptido o polipéptido señuelo de la presente invención, los residuos de aminoácidos en la posición de aminoácidos 15, 18 y 19 de la secuencia de aminoácidos de PLB son Ala, Ile y Glu (véase SEC ID NO: 10).

De acuerdo con la presente invención, "Ala-X_2-X_3-Ile-Glu" del péptido señuelo o secuencia de polipéptido es necesaria para sus acciones y funciones. El (los) residuos de aminoácidos circundante(s) puede tener variaciones de acuerdo con las reivindicaciones. En otras realizaciones, el residuo o residuos de aminoácidos circundante consiste en (i) una secuencia de aminoácidos que abarca 0-1 residuos de aminoácidos en la dirección N-terminal de la posición de aminoácido 15 y (ii) un aminoácido secuencia que abarca 0-3 residuos de aminoácidos en la dirección C-terminal de la posición de aminoácido 19 de la secuencia de aminoácidos de PLB (SEQ ID NO: 10). En otras realizaciones, el residuo de aminoácidos en la dirección N-terminal de la posición de aminoácido 15 es 1 residuo de aminoácidos y el residuo de aminoácidos en la dirección C-terminal de la posición de aminoácido 19 es 0 o 3 residuos de aminoácidos.

En otra realización, el residuo de aminoácidos en la dirección N-terminal de la posición de aminoácido 15 es Arg. En otras realizaciones, el residuo de aminoácidos en la dirección C-terminal de la posición de aminoácido 19 es Met, Met-Pro o Met-Pro-Gln.

En la presente invención, el péptido o polipéptido señuelo sustituido con el residuo de Ser^{16} o Thr^{17} con un residuo Glu o Asp aumenta la fosforilación de PLB (ver Fig. 1c y 1d). Por lo tanto, incluso si el único de los residuos Ser^{16} y Thr^{17} se sustituye con residuo Glu o Asp, el péptido o polipéptido señuelo podría inhibir la desfosforilación mediada por PP1 de PLB.

En ciertas realizaciones, el péptido o polipéptido señuelo se diseña sustituyendo el residuo Ser o ambos residuos Ser y Thr con un residuo Glu o Asp. En ciertas realizaciones, el péptido o polipéptido señuelo se diseña sustituyendo solamente el residuo Ser por un residuo Glu o Asp.

En realizaciones particulares, el péptido o polipéptido señuelo está diseñado de manera que consista en la secuencia de aminoácidos seleccionada de secuencias de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 1-6. En realizaciones particulares, el péptido o polipéptido señuelo está diseñado de tal manera que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de secuencias de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 1 y 3-6. En realizaciones particulares, el péptido o polipéptido señuelo está diseñado de tal manera que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de secuencias de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 1, 3 y 6.

Después de la etapa (a), se prepara el péptido o polipéptido señuelo diseñado en la etapa (a).

El péptido o polipéptido señuelo de la presente invención puede prepararse de acuerdo con tecnologías de ADN recombinante o la técnica de síntesis en fase sólida comúnmente empleada en la técnica (Merrifield, RB, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149- 2154 (1963), Kaiser, E., Colescot, RL, Bossinger, CD, Cook, PI, Anal. Biochem., 34: 595-598 (1970)). Los aminoácidos con grupos α-amino y de cadena lateral protegidos están unidos a una resina. Después, de eliminar los grupos protectores de α-amino, los aminoácidos se acoplan sucesivamente para obtener un intermedio.

En ciertas realizaciones, la enfermedad asociada con PLB es una enfermedad del corazón. En ciertas realizaciones, la enfermedad cardíaca es insuficiencia cardíaca, isquemia, arritmia, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, rechazo de trasplante, contractilidad anormal del corazón o metabolismo anómalo de Ca^{2+}. En ciertas

realizaciones, la enfermedad cardíaca es insuficiencia cardíaca o isquemia. En realizaciones particulares, la enfermedad cardíaca es insuficiencia cardíaca.

En otras realizaciones, la insuficiencia cardíaca es inducida por hipertrofia cardiaca, arteriosclerosis coronaria, infarto de miocardio, cardiopatía valvular, hipertensión o cardiomiopatía.

Las características y ventajas de esta invención se resumirán de la siguiente manera:

(a) La presente invención proporciona un péptido o polipéptido señuelo capaz de inhibir la desfosforilación mediada por PP1 de PLB por una inhibición competitiva y una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad asociada con PLB que comprende el péptido o polipéptido señuelo de la presente invención como un ingrediente activo.

(b) La presente invención proporciona un método para preparar el péptido o polipéptido señuelo de PLB y prevenir o tratar una enfermedad asociada con PLB.

(c) Es digno de mención que el péptido o polipéptido señuelo de la presente invención eleve significativamente los niveles de fosforilación de PLB inhibiendo la desfosforilación mediada por PP1. Además, el péptido o polipéptido señuelo proporciona efectos cardioprotectores restableciendo la actividad de SERCA2a y el efecto inotrópico de potenciar la contractilidad miocárdica.

(d) La presente invención contribuirá en gran medida a la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con PLB.

La presente invención se describirá ahora con más detalle mediante ejemplos. Sería obvio para los expertos en la técnica que estos ejemplos pretenden ser más concretamente ilustrativos y el alcance de la presente invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas no está limitado a, ni por los ejemplos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Péptidos señuelo

Los péptidos señuelo se derivaron de la secuencia de la proteína PLB (SEQ ID NO: 10) que rodea los sitios de fosforilación Ser^{16} y Thr^{17}: $RAS^{16}T^{17}IEMPQ$. Los péptidos se conjugaron mediante un enlace cisteína-cisteína en sus extremos N al péptido penetrante de células TAT (YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 11)) para facilitar la captación en las células. Los péptidos utilizados en esta invención fueron los siguientes: ψPLB-wt, RASTIEMPQ (SEQ ID NO: 8); ΨPLB-SE, RAETIEMPQ (SEQ ID NO: 1); ΨPLB-TE, RASEIEMPQ (SEQ ID NO: 2); ΨPLB-SD, RADTIEMPQ (SEQ ID NO: 3). Además, se analizaron también los péptidos ψPLB-SE acortados: 8-mero, AETIEMPQ (SEQ ID NO: 4); 7-mero, RAETIEM (SEQ ID NO: 5); 6-mero, RAETIE (SEQ ID NO: 6); 5-mero, RAETI (SEQ ID NO: 7). Todos los péptidos fueron sintetizados y modificados por AnyGen (Gwangju, Corea) y disueltos en agua destilada a una concentración madre de 1 mM. Los péptidos eran > 95% puros. Los péptidos señuelo se trataron durante 1 hora a una concentración final de 1 mM. La viabilidad celular y la morfología no fueron afectadas significativamente por los péptidos

Aislamiento de miocitos ventriculares de rata adulta

Se aislaron miocitos ventriculares a partir de corazones de rata SD como se describió previamente [33] con modificaciones menores. Se utilizaron ratas macho de 8-12 semanas de edad (250-320 g). En resumen, las ratas se anestesiaron por inhalación de isoflurano (0,5%) durante 5 min. El corazón se retiró rápidamente del tórax y la aorta se perfundió retrogradualmente a 37ºC durante 3 min con amortiguador Tyrode libre de calcio (NaCl137 mM, KCl5,4 mM, $MgCl_2$1 mM, glucosa10 mM, HEPES 10 mM [pH 7,4], 2,3-butanodiona monooxima 10 mM, y taurina 5 mM) y se gasificó con O_2 al 100%. La digestión enzimática se inició entonces mediante la adición de colagenasa tipo B (0,35 U/ml, Roche) e hialuronidasa (0,1 mg/ml, Worthington) a la solución de perfusión. Cuando el corazón se hinchó después de 10 minutos de digestión, el ventrículo izquierdo se retiró rápidamente, se cortó en varios trozos y se digirió adicionalmente en un agitador (60-70 rpm) durante 10 minutos a 37ºC en la misma solución enzimática. El sobrenadante que contenía los miocitos dispersados se filtró después a través de un filtro de células (100 µm de tamaño de poro, BD Falcon) y se centrifugó suavemente a 500 rpm durante 1 min. Se agregó de nuevo Ca^{2+} extracelular a una concentración de 1,25 mM en un lapso de 30 min para evitar la paradoja de Ca^{2+}. Este procedimiento usualmente arrojó ≥ 80% de miocitos ventriculares viables en forma de varilla con estriaciones claras de sarcolema. Se descartaron los miocitos con vesículas sarcolemáticas obvias o contracciones espontáneas.

Microscopio de fluorescencia

Para confirmar la captación celular de los péptidos, se marcó ψPLB-SE con FITC. Los cardiomiocitos aislados se colocaron sobre una placa de vidrio recubierta con laminina y se cultivaron en medio de Eagle modificado con solución de sal equilibrada de Hanks, suplementada con L-carnitina 2 mM, creatina 5 mM y taurina 5 mM y 100 UI/ml de penicilina. Las células se expusieron a ψPLB-SE 1 μM marcado con FITC durante 1 h, y después se lavaron dos veces con solución de Tyrode. Las imágenes de fluorescencia se visualizaron usando un microscopio Leica DMRBE (LabCommerce Inc.) equipado con un objetivo de aceite de 63x (1,4NA) y conjuntos de filtros optimizados para fluoresceína FITC (OmegaR Optical Inc.). Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara CoolSNAP TMfx CCD (Photometrics) y se analizaron con el software de imágenes Metamorph (Universal Imaging Co.).

Análisis por inmunoprecipitación Western.

Se pasaron lisados de corazón (50 μg) en amortiguador de muestra de SDS a un gel de SDS-PAGE y después se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad). La membrana se bloqueó con una solución de leche desnatada al 5% y luego se incubó durante la noche con anticuerpos dirigidos contra PLB (Affinity Bioreagents), fosfo-PLB (Ser^{16}, Cell Signaling), fosfo-PLB (Thr^{17}, Badrilla), SERCA2a (Santa Cruz), Caspasa 3 (Cell Signaling), o GAPDH (Santa Cruz). Las membranas se incubaron luego con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immuno Research) y se desarrollaron usando el reactivo de quimioluminiscencia Western Lighting (Perkin Elmer).

Contractilidad Celular y Mediciones Transientes Intracelulares de Ca^{2+}

Las propiedades mecánicas de los miocitos ventriculares se evaluaron utilizando un sistema de detección de contornos basado en vídeo (IonOptix), como se describió previamente [34]. En resumen, los cubreobjetos recubiertos con laminina con células unidas se colocaron en una cámara montada en la platina de un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE-100F) y se perfundieron (aproximadamente 1 ml/min a 37ºC) con amortiguador Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM [pH 7,4]). Las células fueron estimuladas en campo a una frecuencia de 3 Hz (30 V) usando un estimulador/termostato STIM-AT colocado en un soporte de estimulación/cámara de cultivo HLDCS (Cell Micro Controls). El miocito de interés se visualizó en un monitor de ordenador utilizando una cámara IonOptix MyoCam, que escaneó rápidamente el área de la imagen cada 8,3 ms, de modo que la amplitud y velocidad de acortamiento o realargamiento se registraron con fidelidad. Los cambios en la longitud de la célula durante el acortamiento y el realargamiento fueron capturados y analizados usando el software de contornos suaves (IonOptix). Los cardiomiocitos se cargaron con Fura2-AM 0,5 μM (Molecular Probes), un indicador sensible al Ca^{2+}, durante 15 minutos a 37ºC. Las emisiones de fluorescencia se registraron simultáneamente con las mediciones de contractilidad utilizando el sistema de registro de calcio y contractilidad de Myocyte (IonOptix). Los cardiomiocitos se expusieron a la luz emitida por una lámpara halógena de 75 W a través de un filtro 340 o 380 nm mientras que se estimulaban en campo como se ha descrito anteriormente. Las emisiones de fluorescencia se detectaron entre 480 y 520 nm mediante un tubo fotomultiplicador después de la iluminación inicial a 340 nm durante 0,5 ms y luego a 380 nm durante la duración del protocolo de registro. El escaneo de excitación de 340 nm se repitió al final del protocolo y se dedujeron cambios cualitativos en la concentración de Ca^{2+} intracelular a partir de la relación de la intensidad de fluorescencia de Fura en ambas longitudes de onda.

Experimentos con corazón perfundido aislado

Las ratas se anestesiaron por inhalación de isoflurano (0,5%) durante 5 min. El corazón se retiró rápidamente y se colocó en una solución fría de Tyrode oxigenada (NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, $MgCl_2$ 1 mM, glucosa10 mM, $CaCl_2$ 1 mM, HEPES 10 mM [pH 7,4], 100% de O_2). La aorta fue canulada y perfundida por el método de Langendorff con solución de Tyrode oxigenada a presión constante (65 mmHg, temperatura 37 ± 0,2ºC). Se insertó un balón de látex relleno de agua en la cámara ventricular izquierda y se conectó a un transductor de presión (AD Instruments) para la medición continua del rendimiento cardíaco. La frecuencia cardiaca, la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (LVDP) y las primeras derivadas de la presión del LV (LV -dP/dt max y LV -dP/dt max) se registraron usando PowerLab Chart Systems (AD Instruments). El volumen del balón se ajustó en 250-300 μl para dar lugar a una presión diastólica final medida en el intervalo de 6-10 mmHg. Después de un período de estabilización de 30 minutos, los corazones se sometieron a 20 minutos de no flujo para inducir la isquemia global, seguidos de 30 minutos de reperfusión. La perfusión de los péptidos señuelo se realizó a una concentración final de 1 μM.

Estadísticas

Cuando sea apropiado, los datos se expresan como ± SD medias. Las comparaciones de las medias de grupo se hicieron utilizando una prueba t de Student o una ANOVA unidireccional con corrección de Bonferroni (Statview versión 5.0, SAS). Se consideró que un valor de $P < 0,05$ era estadísticamente significativo.

Resultados

Péptido señuelo

El PLB está compuesto por una hélice citoplásmica en el extremo N, una hélice transmembrana en el extremo C, y un bucle flexible que conecta las dos hélices (figura 1a, a la izquierda). Los sitios de fosforilación Ser^{16} y Thr^{17} residen en la región del bucle de conexión. Se sintetizó un péptido 9-mero (RASTIEMPQ (SEQ ID NO. 8)) que coincidía exactamente con la secuencia de nueve aminoácidos de la región de bucle y se acopló a un péptido permeable a células TAT a través de un enlace disulfuro para producir ψPLB-p. Además, se generaron péptidos acoplados a TAT similares, en los que el residuo Ser o Thr correspondiente a Ser^{16} o Thr^{17} de PLB fue sustituido individualmente por Glu para producir ψPLB-SE o ψPLB-TE, respectivamente (Figura 1a, derecha). Estos péptidos se marcaron con FITC y se añadieron a los cardiomiocitos cultivados aislados de ventrículos izquierdos de rata. La observación bajo un microscopio de fluorescencia reveló una captación intracelular eficiente de los péptidos en prácticamente todos los cardiomiocitos (figura 1b). Este experimento aseguró que los cardiomiocitos tomaron eficientemente los péptidos, y así los péptidos no marcados se usaron entonces para el resto de los experimentos.

Se sabe que el tratamiento de cardiomiocitos con PMA (13-acetato 12-miristato de forbol) reduce significativamente la fosforilación de PLB mediante la activación de PKCα. El pretratamiento con ψPLB-SE, pero no con ψPLB-p, bloqueó significativamente la desfosforilación inducida por PMA de PLB tanto en Ser^{16} como en Thr^{17}. ΨPLB-TE también bloqueó la desfosforilación, pero fue menos eficaz que ψPLB-SE (Figura 1c). Los niveles elevados de fosforilación de PLB observados después del tratamiento con ψPLBSE fueron ligera pero significativamente más altos que los niveles basales. Teniendo en cuenta que PP1 es la única proteína fosfatasa conocida para desfosforilar PLB, estos datos demostraron que ψPLB-SE sirvió como un péptido señuelo eficaz para inhibir competitivamente PP1 mediada por desfosforilación de PLB.

El ΨPLB-SD, en el que Ser^{16} se reemplazó con Asp, fue tan eficaz como ψPLB-SE al elevar los niveles de fosforilación de PLB (Figura 1c). Se sintetizaron péptidos ψPLB-SE acortados que consistían en AETIEMPQ (SEQ ID NO. 4) (ψPLB-8-mero), RAETIEM (SEQ ID NO: 5) (ψPLB-7-mero), RAETIE (SEQ ID NO: 6) (ΨPLB-6-mero), y RAETI (SEQ ID NO: 7) (ψPLB-5-mero). Entre estos péptidos, sólo ψ PLB-5-mero fue ineficaz en la elevación de los niveles de fosforilación de PLB (Fig. 1d). Por lo tanto, parecía que ASTIE (SEQ ID NO: 9) es la secuencia de aminoácidos mínima requerida, y que el residuo Ser puede ser reemplazado por Glu o Asp para crear un péptido señuelo efectivo para PP1.

ΨPLB-SE aumenta la contractilidad de los cardiomiocitos

A continuación, probamos si ψPLB-SE afectaba a la contractilidad de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos adultos aislados fueron pretratados con los péptidos y luego tratados con PMA. Como se indica por la reducción de los parámetros contráctiles, incluyendo el acortamiento de pico, y las tasas de contracción y relajación, la contractilidad se redujo significativamente por PMA. Mientras que ψPLBwt y ψPLB-TE no produjeron efectos marginales o únicos sobre la contractilidad, ψPLB-SE evitó completamente la reducción inducida por PMA en la contractilidad (Figura 2a). PMA también evocó una reducción significativa en la amplitud transiente de Ca^{2+} y un aumento significativo en la constante de tiempo del decaimiento transiente de Ca^{2+} (τ). Estos defectos inducidos por PMA se revirtieron completamente mediante el pretratamiento con ψPLB-SE, mientras que los efectos de ψPLB-wt y ψPLB-TE en el manejo intracelular de Ca^{2+} fueron insignificantes o marginales (figura 2b). Estos datos indicaron que los niveles de fosforilación restaurados de PLB endógeno mediante el pretratamiento de ψPLB-SE produjeron una contractilidad normalizada. Tanto ψPLB-SD como ψPLB-6-mero fueron tan eficaces como ψPLB-SE en la preservación de la contractilidad y el manejo de Ca^{2+} (Fig. 2c y 2d).

ΨPLB-SE mejora la recuperación funcional después de isquemia/reperfusión ex vivo

Examinamos además los beneficios de ψPLB-SE durante la isquemia/reperfusión (I/R) ex vivo. Corazones de rata fueron perfundidos según Langendorff, sometidos a 20 minutos sin flujo para inducir isquemia global, y luego 30 minutos de reperfusión. La presión desarrollada de los ventrículos izquierdos se redujo significativamente (37-44 mmHg frente a 80-100 mmHg en la preisquemia) por I/R. En el momento de la reperfusión, se añadió ψPLB-SE o un péptido de control TAT a las soluciones de reperfusión. Aunque TAT no tuvo efectos, ψPLB-SE elevó significativamente la presión desarrollada (73-78 mmHg) (Fig. 3a). Al final del experimento, se prepararon lisados de los corazones y se sometieron a inmunotransferencia Western. La fosforilación de PLB tanto en Ser^{16} como en Thr^{17} se redujo significativamente por I/R, y la fosforilación en Ser^{16} se recuperó significativamente por ψPLB-SE. Además, la caspasa 3 relacionada con la muerte celular fue activada por I/R, que fue completamente invertida por ψPLB-SE (Figura 3b). Colectivamente, estos datos mostraron que ψPLB-SE mejoró la recuperación funcional después de I/R, al menos en parte, a través de la elevación de los niveles de fosforilación de PLB en Ser^{16}.

Discusión

SERCA2a es un regulador crucial de la manipulación intracelular de Ca^{2+} en cardiomiocitos, y su función en la insuficiencia cardíaca y la lesión I/R está bien establecida [6]. Por lo tanto, las modalidades que normalizan los

niveles y/o actividad de SERCA2a podrían tener potenciales terapéuticos significativos. Uno de estos enfoques implica una recuperación mediada por la administración génica de niveles de SERCA2a suprimidos en corazones que fallan. Este enfoque es eficaz en los modelos animales de la insuficiencia cardíaca [13-16], y recientemente se ha demostrado ser seguro y eficaz en la fase final de pacientes con insuficiencia cardíaca [17, 18].

PLB es un inhibidor endógeno de SERCA2a y es por lo tanto un objetivo potencial para la modulación de la actividad de SERCA2a. La subregulación de PLB con ARN antisentido [35] o ARN de interferencia pequeño [36] parcialmente restauró la actividad de SERCA2a y la contractilidad de los cardiomiocitos. Una forma negativa dominante de PLB, K3E/R14E, diseñada para interrumpir la integridad estructural de PLB endógeno, aumentó la actividad de SERCA2a en cardiomiocitos de neonatales y adultos [35].

En este estudio, se demostró que ψPLB-SE previene la desfosforilación de PLB sirviendo como un péptido señuelo para PP1. Curiosamente, encontramos que ψ PLB-TE no fue tan eficaz como ψPLB-SE (Fig. 1c]. Aunque una visión estructural no está disponible actualmente, es posible que PLB con una fosforilación en Ser^{16} es un mejor sustrato para PP1 que PLB con una fosforilación en Thr^{17}. Es notable que la fosforilación en Thr^{17} se produce sólo después de la fosforilación en Ser^{16} durante β-adrenérgicos estimulación [36]. Por lo tanto, PLB con fosforilación sólo en Thr^{17} puede no existir in vivo. En conclusión, se mostró que ψ PLB-SE provocó efectos cardioprotectores mediante la restauración de SERCA2a actividad. Como un péptido corto, ψPLB-SE tiene varias ventajas terapéuticas sobre los ARNsi o las proteínas PLB mutantes. Se necesitan otros experimentos para determinar si ψPLB-SE es eficaz en varios modelos quirúrgicos y genéticos de insuficiencia cardíaca.

Referencias

1. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. Lancet 2006 May 27; 367(9524): 1747-57.

2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med. 2006 Nov; 3(11): e442.

3. Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. Global and regional causes of death. Br Med Bull. 2009; 92: 7-32.

4. Houser SR, Piacentino V, 3rd, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. J Mol Cell Cardiol. 2000 Sep; 32(9): 1595-607.

5. Houser SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? Circ Res. 2003 Mar 7; 92(4): 350-8.

6. Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. Heart Fail Rev. 2009 Dec; 14(4): 213-24.

7. Bers DM, Guo T Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. Ann N Y Acad Sci. 2005 Jun; 1047: 86-98.

8. Schaub MC, Hefti MA, Zaugg M. Integration of calcium with the signaling network in cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2006 Aug; 41(2): 183-214.

9. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Jul; 4(7): 566-77.

10. Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. Circ Res. 1994 Apr; 74(4): 555-64.

11. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, et al. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. Circ Res. 1994 Sep; 75(3): 434-42.

12. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. Circulation. 1995 Aug 15; 92(4): 778-84.

13. Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jan 18; 97(2): 793-8.

14. del Monte F, Hajjar RJ, Harding SE. Overwhelming evidence of the beneficial effects of SERCA gene transfer in heart failure. Circ Res. 2001 Jun 8; 88(11): E66-7.

15. Sakata S, Lebeche D, Sakata Y, Sakata N, Chemaly ER, Liang L, et al. Transcoronary gene transfer of SERCA2a increases coronary blood flow and decreases cardiomyocyte size in a type 2 diabetic rat model. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Feb; 292(2): H1204-7.

16. Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, et al. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. J Am Coll Cardiol. 2008 Mar 18;

51(11): 1112-9.

17. Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, Cappola TP, Pauly DF, Greenberg B, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. J Card Fail. 2009 Apr; 15(3): 171-81.

18. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, et al. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase in patients with advanced heart failure. Circulation. 2011 Jul 19; 124(3): 304-13.

19. Le Peuch CJ, Haiech J, Demaille JG. Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. Biochemistry. 1979 Nov 13; 18(23): 5150-7.

20. James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca2+ pump of sarcoplasmic reticulum. Nature. 1989 Nov 2; 342(6245): 90-2.

21. Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. Cardiovasc Res. 2005 Dec 1; 68(3): 366-75.

22. MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. Eur J Biochem. 1991 Mar 28; 196(3): 725-34.

23. Steenaart NA, Ganim JR, Di Salvo J, Kranias EG. The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme. Arch Biochem Biophys. 1992 Feb 14; 293(1): 17-24.

24. Schwinger RH, Munch G, Bolck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. J Mol Cell Cardiol. 1999 Mar; 31(3): 479-91.

25. Mishra S, Gupta RC, Tiwari N, Sharov VG, Sabbah HN. Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake in human failing left ventricular myocardium. J Heart Lung Transplant. 2002 Mar; 21(3): 366-73.

26. Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bokenes J, Tonnessen T, Holt E, et al. Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. Cardiovasc Res. 2002 Feb 1; 53(2): 382-91.

27. Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, et al. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. J Mol Cell Cardiol. 1997 Jan; 29(1): 265-72.

28. Huang B, Wang S, Qin D, Boutjdir M, El-Sherif N. Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle: role of beta-adrenergic pathway, G(i) protein, phosphodiesterase, and phosphatases. Circ Res. 1999 Oct 29; 85(9): 848-55.

29. Ta HM, Nguyen GT, Jin HM, Choi J, Park H, Kim N, et al. Structure-based development of a receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) inhibitor peptide and molecular basis for osteopetrosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Nov 23; 107(47): 20281-6.

30. Law JH, Li Y, To K, Wang M, Astanehe A, Lambie K, et al. Molecular decoy to the Y-box binding protein-1 suppresses the growth of breast and prostate cancer cells whilst sparing normal cell viability. PLoS One. 2010; 5(9).

31. Yamaguchi H, Durell SR, Feng H, Bai Y, Anderson CW, Appella E. Development of a substrate-based cyclic phosphopeptide inhibitor of protein phosphatase 2Cdelta, Wip1. Biochemistry. 2006 Nov 7; 45(44): 13193-202.

32. Hayashi R, Tanoue K, Durell SR, Chatterjee DK, Jenkins LM, Appella DH, et al. Optimization of a cyclic peptide inhibitor of Ser/Thr phosphatase PPM1D (Wip1). Biochemistry. 2011 May 31; 50(21): 4537-49.

33. Ren J, Wold LE. Measurement of Cardiac Mechanical Function in Isolated Ventricular Myocytes from Rats and Mice by Computerized Video-Based Imaging. Biol Proced Online. 2001 Dec 11; 3: 43-53.

34. Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, et al. Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000 Jul; 279(1): H429-36.

35. He H, Meyer M, Martin JL, McDonough PM, Ho P, Lou X, et al. Effects of mutant and antisense RNA of phospholamban on SR Ca(2+)-ATPase activity and cardiac myocyte contractility. Circulation. 1999 Aug 31; 100(9): 974-80.

36. Luo W, Chu G, Sato Y, Zhou Z, Kadambi VJ, Kranias EG. Transgenic approaches to define the functional role of dual site phospholamban phosphorylation. J Biol Chem. 1998 Feb 20; 273(8): 4734-9.

37. Karczewski P1, Kuschel M, Baltas LG, Bartel S, Krause EG, Site-specific phosphorylation of a phospholamban peptide by cyclic nucleotide- and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases of cardiac sarcoplasmic reticulum, Basic Res Cardiol. 1997;92 Suppl 1:37-43.

38. Elizabeth L. Lockamy, Razvan L. Cornea, Christine B. Karim, and David D. Thomas, Functional and Physical Competition between Phospholamban and its Mutants Provides Insight into the Molecular Mechanism of Gene Therapy for Heart Failure, Biochem Biophys Res Commun. 2011 May 13; 408(3): 388-392.

<110> GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> PÉPTIDOS SEÑUELO QUE INHIBEN LA DESFOSFORILACIÓN DE FOSFOLAMBANO MEDIADA POR LA PROTEÍNA FOSFATASA 1

<130> PP120076

<150> US 61/668034

<151> 2012-07-05

<160> 11

<170> Kopatentln 2.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO: 1

<400> 1

Arg Ala Glu Thr Ile Glu Met Pro Gln
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SEQ ID NO: 2

<400> 2

Arg Ala Ser Glu Ile Glu Met Pro Gln
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO: 3

<400> 3

Arg Ala Asp Thr Ile Glu Met Pro Gln
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SEQ ID NO: 4

<400> 4

Ala Glu Thr Ile Glu Met Pro Gln
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 25 30

Ile Asn Phe Cys Leu Ile Leu Ile Cys Leu Leu Leu Ile Cys Ile Ile
35 40 45

Val Met Leu Leu
50

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO: 11

<400> 11

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido o polipéptido señuelo que consiste en una secuencia peptídica representada por la Fórmula I siguiente:

X_1-Ala-X_2-X_3-Ile-Glu-X_4 (I)

en la que X_1 representa 0-1 residuos de aminoácidos, X_2 representa Ser, Glu o Asp, X_3 representa Thr, Glu o Asp y X_4 representa 0-3 residuos de aminoácidos, con la condición de que X_2 no es Ser cuando X_3 es Thr;
en el que el péptido o polipéptido señuelo inhibe la desfosforilación de PLB (fosfolambano) mediada por PP1 (proteína fosfatasa 1) por una inhibición competitiva,
en la que ni X_1 ni X_4 contienen dominios que abarcan la membrana y con la condición de que el péptido no sea Tyr Ala Asp Asp Ile Glu Lys Lys Ile.

2. El péptido o polipéptido señuelo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X_1 es Arg.

3. El péptido o polipéptido señuelo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X_4 es Met, Met-Pro o Met-Pro-Gln.

4. El péptido o polipéptido señuelo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el X_2 es Glu o Asp y X_3 es Thr, Glu o Asp.

5. El péptido o polipéptido señuelo consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de secuencias de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 1-6,

en el que el péptido o polipéptido señuelo inhibe la desfosforilación mediada por PP1 (proteína fosfatasa 1) de PLB (fosfolambano) por una inhibición competitiva.

6. El péptido o polipéptido señuelo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido o polipéptido señuelo está enlazado adicionalmente a un péptido permeable a través de la membrana celular.

7. Una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad asociada con PLB, que comprende (a) una cantidad farmacéuticamente efectiva del péptido o polipéptido señuelo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la enfermedad asociada con PLB es una enfermedad del corazón.

9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la enfermedad cardíaca es insuficiencia cardiaca, isquemia, arritmia, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, rechazo de trasplante, contractilidad anormal del corazón o metabolismo anómalo de Ca^{2+}.

10. Un método para preparar un péptido o polipéptido señuelo de PLB capaz de inhibir la desfosforilación mediada por PP1 de PLB por una inhibición competitiva, que comprende:

(a) diseñar el péptido o polipéptido señuelo de PLB sustituyendo un residuo Ser en la posición de aminoácido 16 y/o un residuo de Thr en la posición de aminoácido 17 de la secuencia de aminoácidos de PLB (SEQ ID NO: 10) con un Glu o Asp y seleccionar 0-4 residuos de aminoácidos circundantes alrededor de la posición de aminoácidos 15-19 de la secuencia de aminoácidos de PLB (SEQ ID NO: 10), de manera que el péptido o polipéptido señuelo diseñado consiste en una secuencia peptídica representada por la Fórmula I siguiente:

X_1-Ala-X_2-X_3-Ile-Glu-X_4 (I)

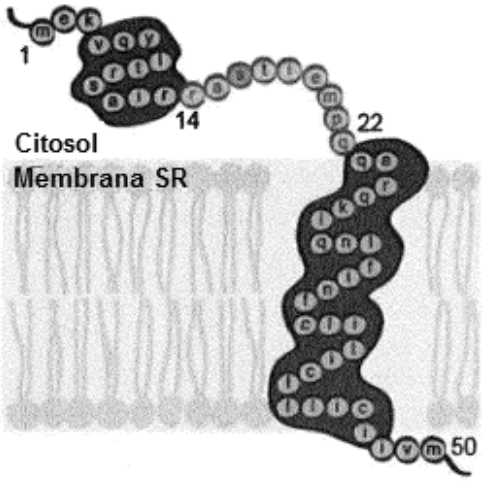
en la que X_1 representa 0-1 residuos de aminoácidos, X_2 representa Ser, Glu o Asp, X_3 representa Thr, Glu o Asp y X_4 representa 0-3 residuos de aminoácidos, con la condición de que X_2 no sea Ser cuando X_3 es Thr, en la que ni X_1 ni X_4 contienen dominios que abarcan la membrana y con la condición de que el péptido no sea Tyr Ala Asp Asp Ile Glu Lys Lys Ile; y
(b) preparar el péptido o polipéptido señuelo diseñado en la etapa (a).

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el residuo o residuos de aminoácidos circundante consiste en (i) una secuencia de aminoácidos que abarca 0-1 residuos de aminoácidos en la dirección N-terminal de la posición de aminoácido 15 y (Ii) una secuencia de aminoácidos que abarca 0-3 residuos de aminoácidos en la dirección C-terminal de la posición de aminoácido 19 de la secuencia de aminoácidos de PLB (SEQ ID NO: 10).

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el péptido o polipéptido señuelo se diseña sustituyendo el residuo Ser o tanto el residuo Ser como el residuo Thr con un residuo Glu o Asp.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el péptido o polipéptido señuelo está diseñado de manera que consista en la secuencia de aminoácidos seleccionada de secuencias de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 1-6.

Fig. 1a



Nombre	Secuencia
TAT	YGRKKRRQRRR
ψPLB-wt	TAT-cc-RASTIEMPQ
ψPLB-SE	TAT-cc-RAETIEMPQ
ψPLB-TE	TAT-cc-RASEIEMPQ

Fig. 1b

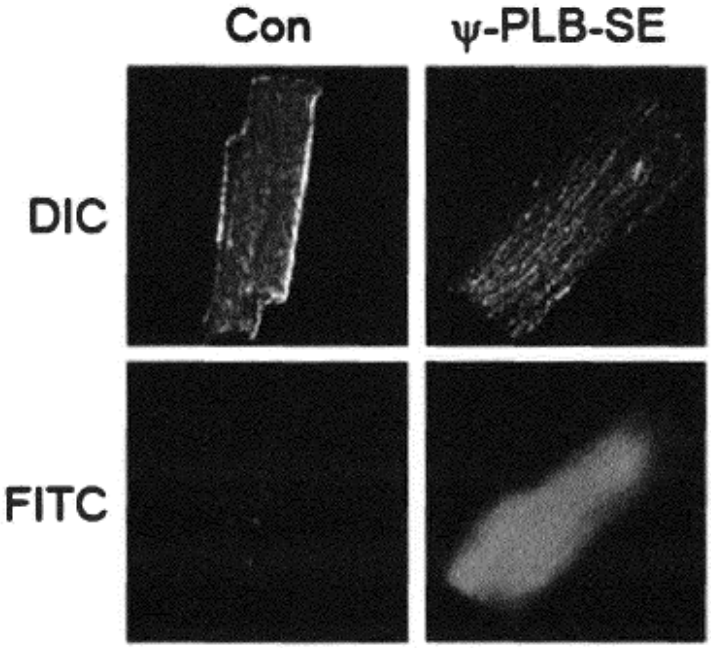


Fig. 1c

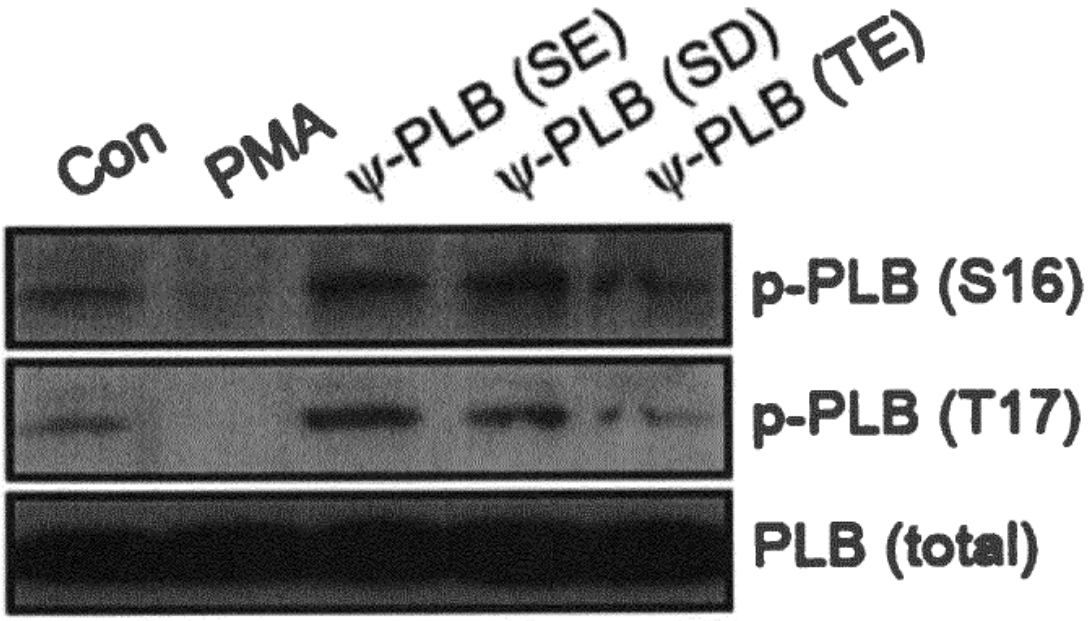

Con
PMA
ψ-PLB (SE)
ψ-PLB (SD)
ψ-PLB (TE)
p-PLB (S16)
p-PLB (T17)
PLB (total)

Fig. 1d

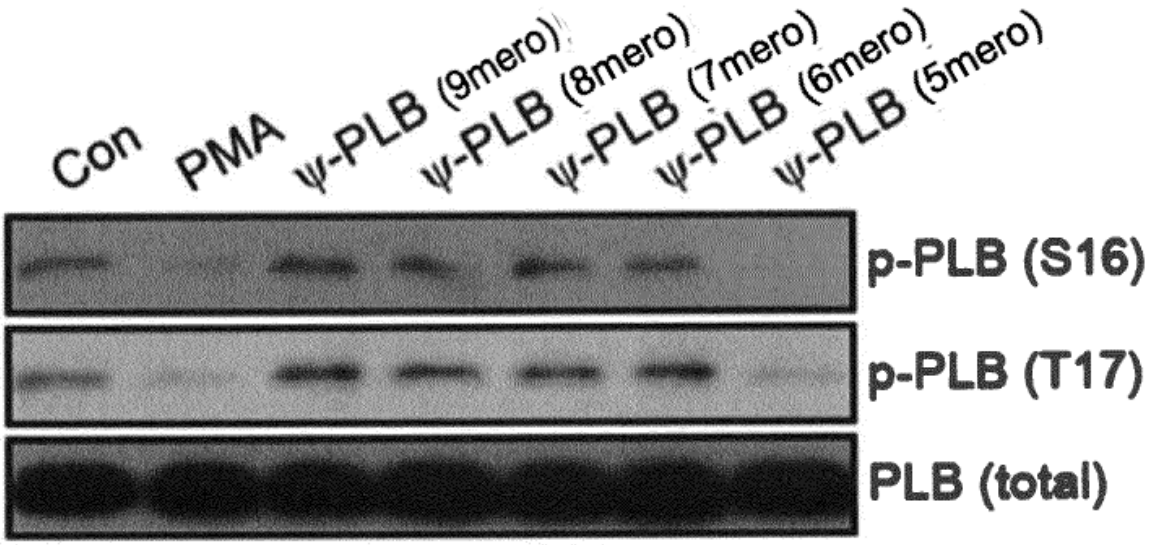

Con
PMA
ψ-PLB (9mero)
ψ-PLB (8mero)
ψ-PLB (7mero)
ψ-PLB (6mero)
ψ-PLB (5mero)
p-PLB (S16)
p-PLB (T17)
PLB (total)

Fig. 2a

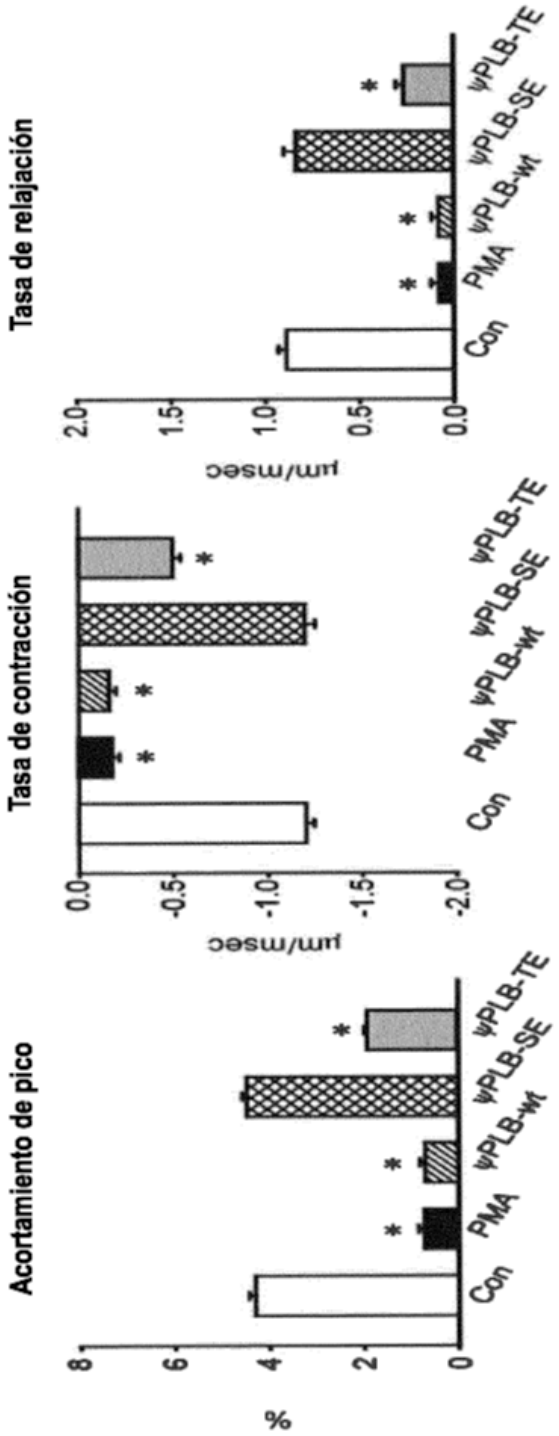

Acortamiento de pico
%
8
6
4
2
0
Con
PMA
ψPLB-wt
ψPLB-SE
ψPLB-TE
Tasa de contracción
µm/msec
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
Con
PMA
ψPLB-wt
ψPLB-SE
ψPLB-TE
Tasa de relajación
µm/msec
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Con
PMA
ψPLB-wt
ψPLB-SE
ψPLB-TE

Fig. 2b

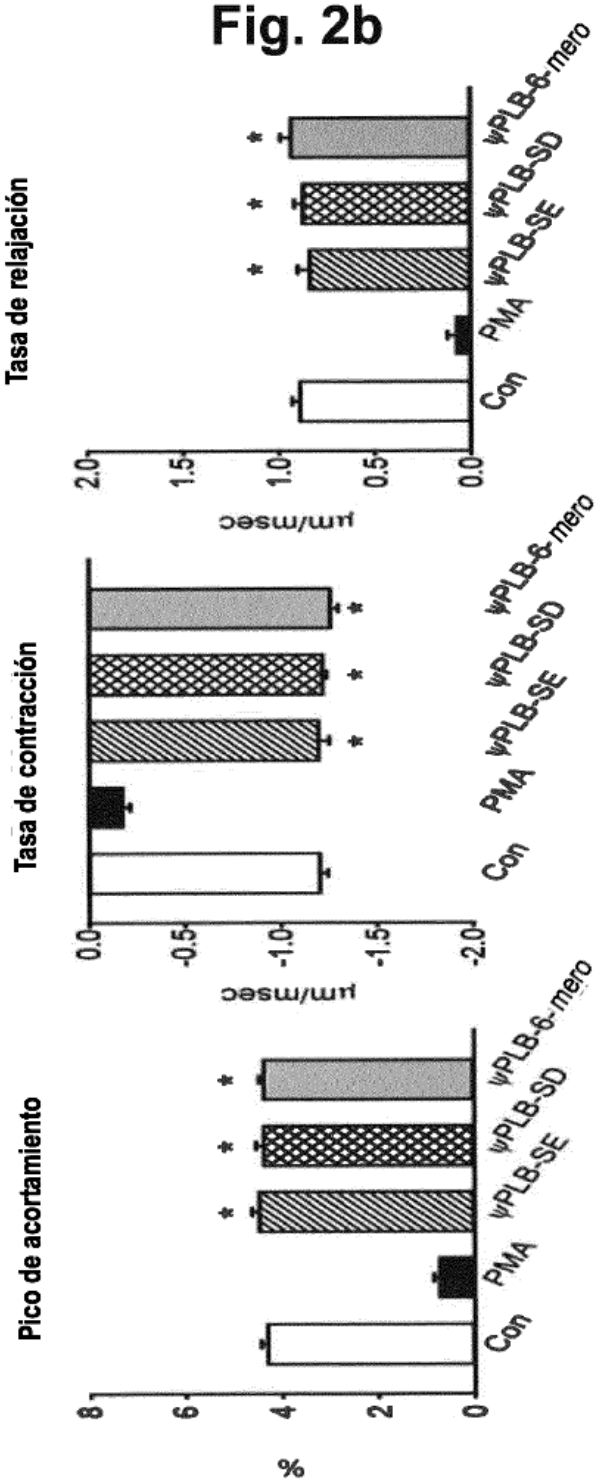
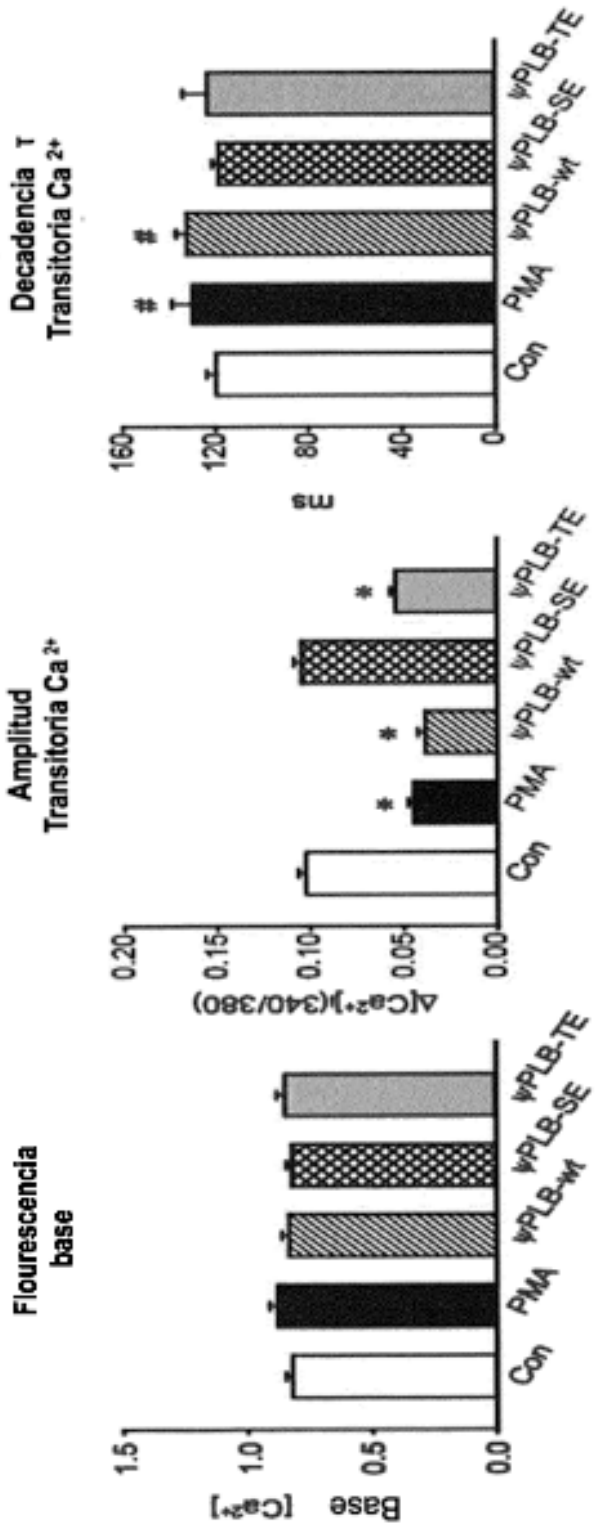

Pico de acortamiento
%
8
6
4
2
0
Con
PMA
ψPLB-SE
ψPLB-SD
ψPLB-6-mero
Tasa de contracción
μm/msec
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-2.0
Con
PMA
ψPLB-SE
ψPLB-SD
ψPLB-6-mero
Tasa de relajación
μm/msec
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Con
PMA
ψPLB-SE
ψPLB-SD
ψPLB-6-mero

Fig. 2c


Flourescencia base
Base [Ca2+]
1.5
1.0
0.5
0.0
Con
PMA
ψPLB-wt
ψPLB-SE
ψPLB-TE
Amplitud Transitoria Ca 2+
Δ[Ca2+](340/380)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
Decadencia T Transitoria Ca 2+
ms
160
120
80
40
0
#

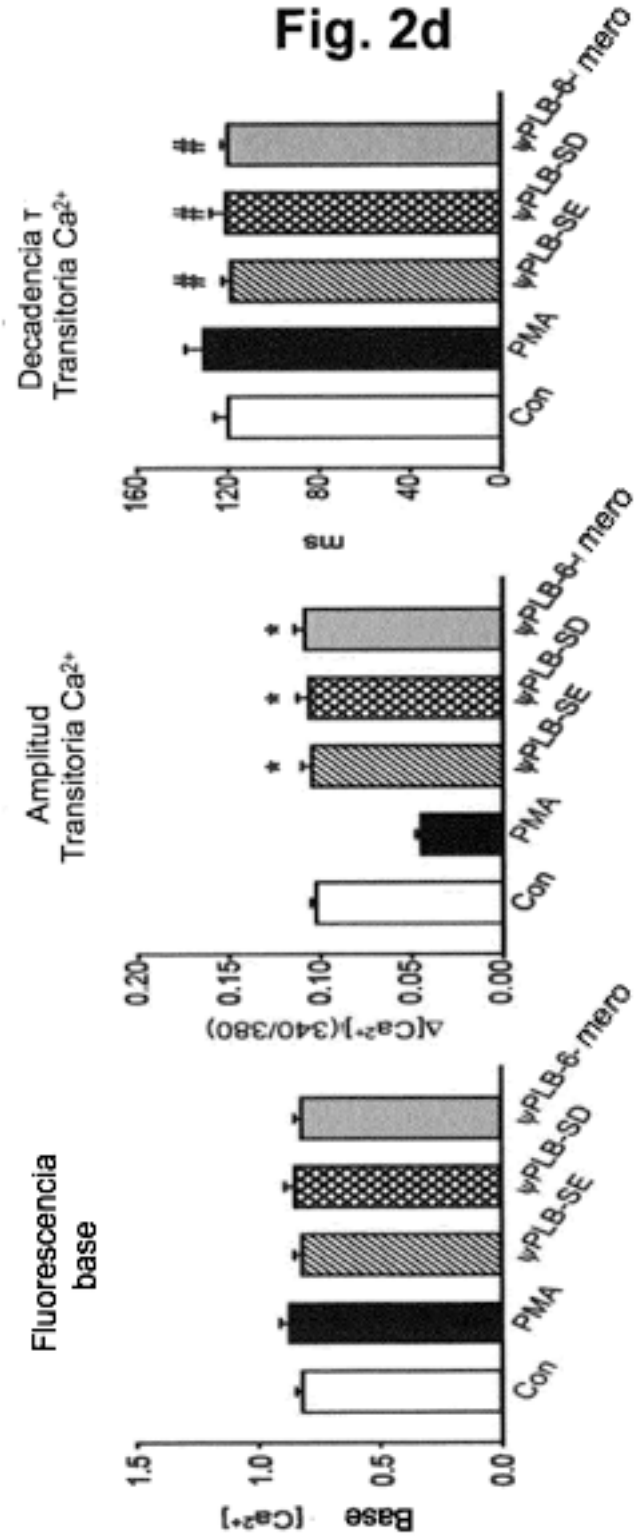


Fig. 2d
Fluorescencia base
Base [Ca2+]
1.5
1.0
0.5
0.0
Con
PMA
ψPLB-SE
ψPLB-SD
ψPLB-6- mero
Amplitud Transitoria Ca2+
Δ[Ca2+](340/380)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
Decadencia τ Transitoria Ca2+
ms
160
120
80
40
0
#

Fig. 3a

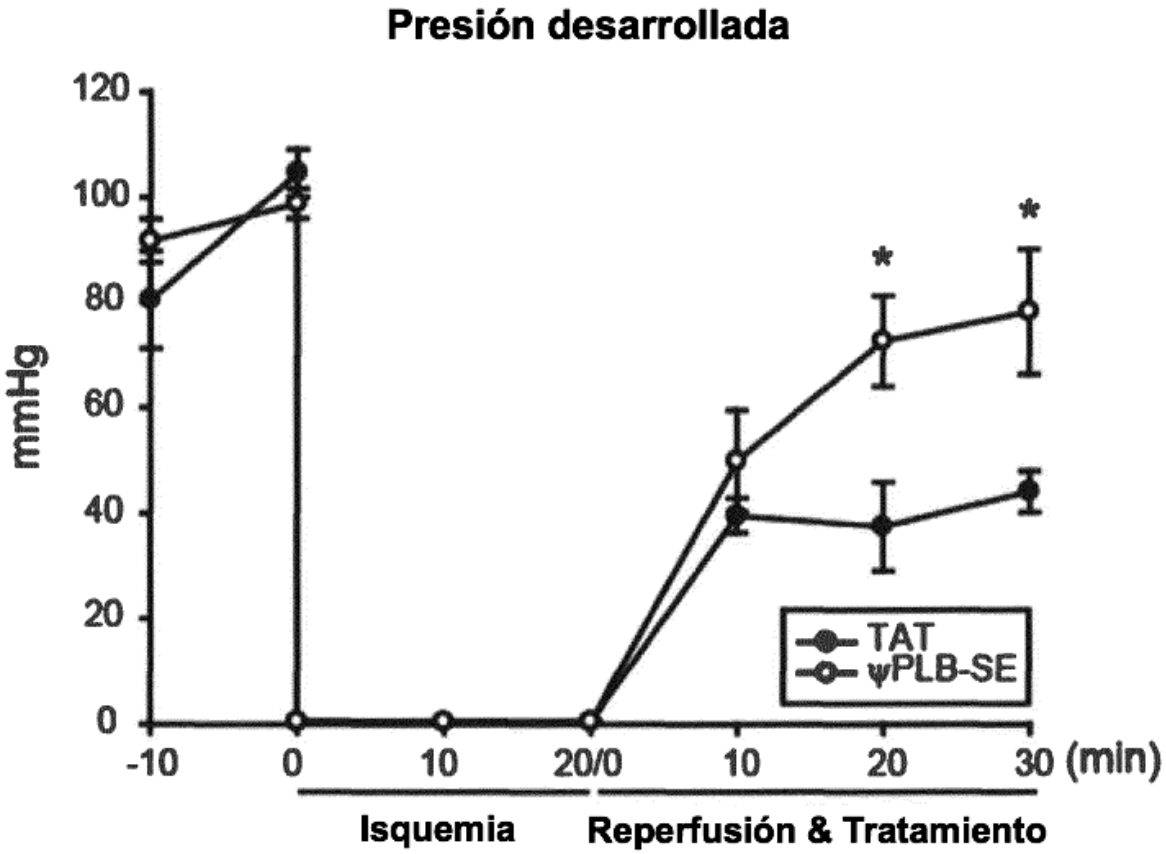
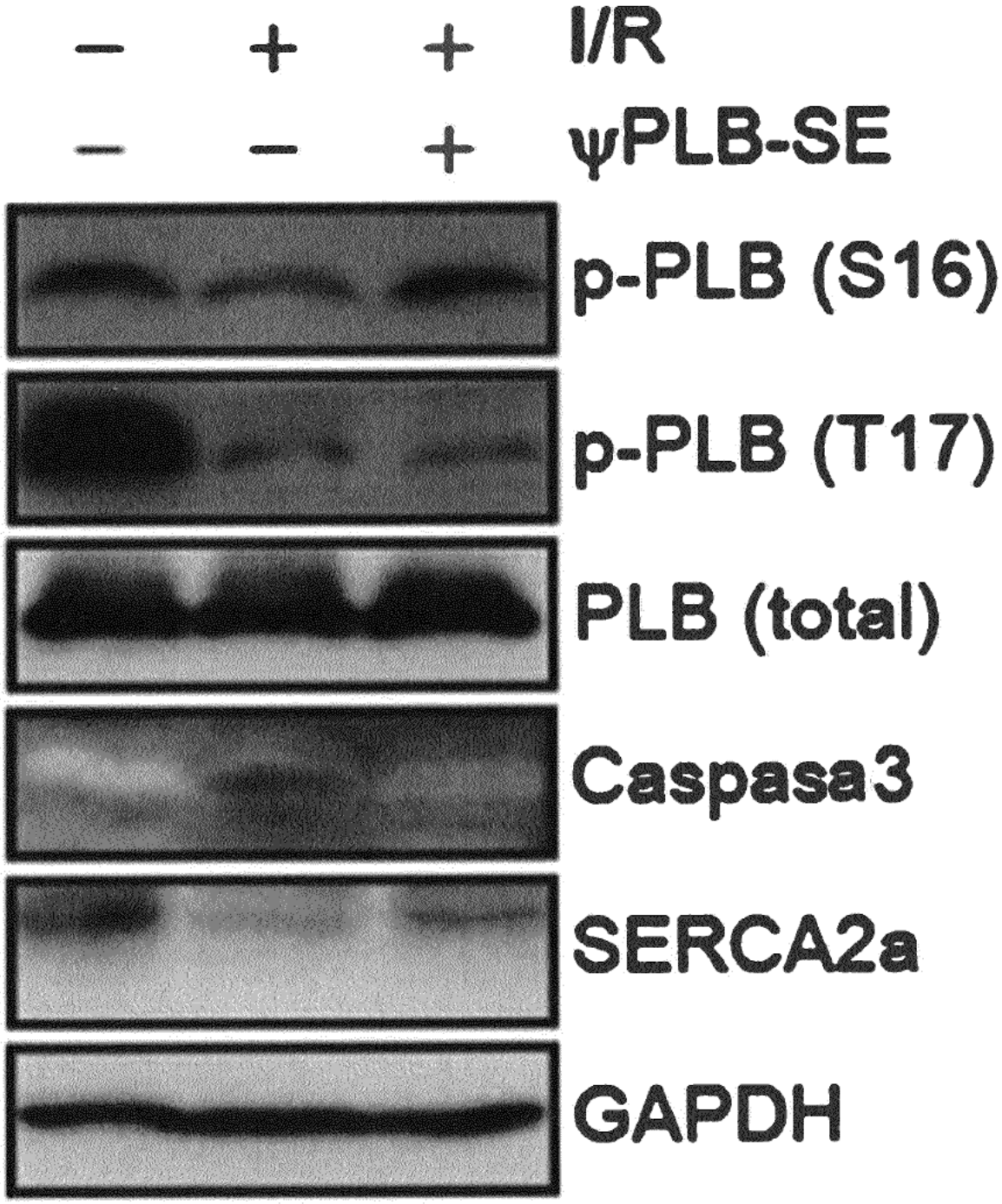

Presión desarrollada
120
100
80
60
40
20
0
mmHg
*
*
TAT
ψPLB-SE
-10
0
10
20/0
10
20
30
(min)
Isquemia
Reperfusión & Tratamiento

Fig. 3b


– + + I/R
– – + ψPLB-SE
p-PLB (S16)
p-PLB (T17)
PLB (total)
Caspasa3
SERCA2a
GAPDH