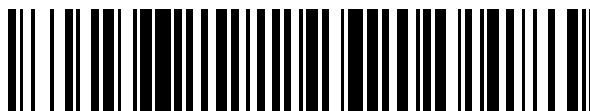


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 452**

51 Int. Cl.:

|                   |                             |           |
|-------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>C07K 7/06</b>  | (2006.01) <i>C07K 7/08</i>  | (2006.01) |
| <b>C07K 4/12</b>  | (2006.01) <i>G01N 33/50</i> | (2006.01) |
| <b>A61K 38/04</b> | (2006.01) <i>C07K 5/107</i> | (2006.01) |
| <b>A61K 38/07</b> | (2006.01) <i>C12Q 1/02</i>  | (2006.01) |
| <b>A61K 38/08</b> | (2006.01) <i>C07K 5/117</i> | (2006.01) |
| <b>A61K 38/10</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>G01N 33/68</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>G01N 33/94</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>C07K 5/08</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 38/00</b> | (2006.01)                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2011 E 13168192 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2671889**

54 Título: **Péptidos de la familia RFamida y métodos relacionados**

30 Prioridad:

**02.04.2010 US 320505 P**

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

**22.02.2019**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)  
1600 Huron Parkway, 2nd Floor  
Ann Arbor, MI 48109-2590, US**

72 Inventor/es:

**NICHOLS, RUTHANN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 701 452 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 de la familia RFamida y métodos relacionados

**Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad bajo 35 U.S.C. 3 119(e) Solicitud provisional de EE.UU. nº 61/320.505, presentada el 2 de abril de 2010.

**Declaración sobre la investigación o desarrollo federalmente patrocinada**

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo R21HL093627 otorgado por el National Institute of Health (NIH). El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

**Antecedentes de la invención**

10 La insuficiencia cardíaca es la principal causa de muerte, aunque los mecanismos peptidérgicos implicados en la disfunción cardíaca no se comprenden completamente (Jessup, M. y Brozena S. (2003)). La identificación de péptidos cardiorreguladores pequeños es significativa porque puede proporcionar posibles moléculas diana para el desarrollo de fármacos y estrategias terapéuticas para tratar la disfunción cardíaca. Los péptidos relacionados con la FMRFamida (FaRP) de vertebrados se expresan en regiones del sistema nervioso central involucradas en la regulación cardíaca (Fukusumi *et al.* (2001), Ukena *et al.* (2001), Yano *et al.* (2003)); sin embargo, se sabe relativamente poco acerca de su función. El primer péptido que contiene RFamida descubierto fue el tetrapéptido de invertebrado, FMRFamida (Price, D. A., y Greenberg, M. J. (1977)). El aislamiento de FMRFamida de los ganglios de la almeja como péptido cardiorregulador condujo a la posterior identificación de péptidos bio- y cardio-activos relacionados estructuralmente en todo el reino animal, en invertebrados y vertebrados (Fukusumi S. *et al.* (2006), Nichols, R. (2003)).

15 La superfamilia FaRP de péptidos relacionados con FMRFamida se subdivide en grupos más pequeños basados en el motivo de XRFamida, donde X define el subgrupo. Los péptidos de miosupresina de invertebrados pertenecen al subgrupo LRFamida. La estructura de miosupresina, dromiosupresina (DMS) de *Drosophila melanogaster*, es TDVDHVFLRFamida (SEQ ID NO: 1) (Nichols, R. (1992)). Las miosupresinas se han estudiado ampliamente en invertebrados como péptidos mioinhibidores que disminuyen la frecuencia cardíaca y la amplitud de la expulsión (Robb, S. *et al.* (1989), Robb, S. y Evans, P. (1994), Wasielewski, O. y Skonieczna, M. (2008), Stevens, J. S. *et al.* (2009), Angioy, A. M. *et al.* (2007)).

20 Mientras que la gran mayoría de la investigación cardiovascular relacionada con FaRP se ha realizado en invertebrados, se sabe relativamente poco sobre la función de esta familia de péptidos cardiorreguladores en mamíferos. Sin embargo, los genes de péptidos relacionados con RFamida (RFRP) de mamíferos codifican RFRP-1, que contiene una LRFamida C-terminal (Hinuma, S. *et al.* (2000), Liu, Q. *et al.* (2001)). La estructura del péptido RFRP-1 (hRFRP-1) humano es MPHSFANLPLRFamida (SEQ ID NO: 2) (Ubuka T. *et al.* (2009) PLoS One 4 (22): e8400; páginas 1-7). Se aisló un péptido endógeno con gran identidad de estructura con hRFRP-1 de hipotálamo bovino (Fukusumi, S. *et al.* (2001)). Además, grupos de neuronas y fibras inmunorreactivas de hRFRP-1 se encuentran en el hipotálamo y el núcleo del tracto solitario (NTS) de los mamíferos, un sitio importante para la regulación integradora del sistema cardiovascular (Fukusumi, S. *et al.* (2001), Ukena, K. y Tsutsui, K. (2001), Yano, T. *et al.* (2003)).

25 El documento WO 2009/043452 describe el RFRP-1 y su utilización para tratar cardiopatías. Bernhard *et al.* (1984), *Regulatory Peptides*, vol. 8 nº 3, págs. 209-215, describen la utilización del péptido LPLRFamida y un péptido de molusco relacionado, FMRFamida que afecta la presión sanguínea arterial en la rata.

30 Las patentes de EE. UU. 7.192.723 y 7.217.808 incluyen la descripción de péptidos relacionados con RFamida particulares para usos que implican la secreción de prolactina y otros usos terapéuticos. Los documentos WO 2007/045906 y WO 2004/026904 incluyen la descripción de los péptidos INSP207, INTP026, INTP027 e INTP028 particulares relacionados con RFamida. La patente de EE.UU. nº 7.354.724 incluye la descripción relacionada con los receptores acoplados a la proteína G de *Drosophila melanogaster*. Los efectos cardíacos específicos de una hormona peptídica relacionada con la RFamida de los no invertebrados se exponen en Stevens J. S. *et al.* 2009, *J. Exp. Biol.*: 212 (Pt 24): 3961-76. Fang Q. *et al.* (*Eur. J. Pharmacol.* 2009 621: (1-3): 61-66) expone los efectos cardiovasculares del péptido 26RFA relacionado con RF amida.

35 Como se expone con más detalle a continuación, los métodos y composiciones dirigidos a polipéptidos RFRP-1, son útiles para modular la función contráctil cardíaca, para prevenir y/o tratar trastornos cardíacos; así como herramientas para descubrir agentes que pueden modular la función cardíaca, como herramientas para identificar el receptor de RFRP-1, y como herramientas para identificar enfermedades relacionadas con la insuficiencia cardíaca.

**Descripción de los dibujos**

40 Figura 1. Dependencia de la dosis de un intervalo de concentraciones de DMS en la frecuencia de las contracciones cardíacas de *D. melanogaster in vivo*. Los resultados son los efectos máximos observados 1 minuto después de la microinyección en comparación con la frecuencia de contracción inicial medida antes de la microinyección de DMS  $10^{-11}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M, o  $10^{-6}$  M o referencia, solución salina fisiológica solamente (n = 18). Los puntos de los datos a  $10^{-12}$  M representan el efecto de la solución salina. Los datos (media  $\pm$  SEM) se promediaron

de varios animales ( $n \geq 10$ ) y se publicaron en relación con la frecuencia de contracción inicial medida para cada animal. Se utilizó un solo animal para una microinyección, ya sea de péptido o de referencia. El efecto de DMS  $10^{-10}$  M ( $n = 16$ ) en la frecuencia cardíaca no fue estadísticamente diferente de la solución salina; sin embargo, DMS  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M o  $10^{-6}$  M ( $n=16; 18; 14; 16$ , respectivamente) fue estadísticamente significativo en la referencia con  $p < 0,05$  considerado significativamente diferente. Se calculó que el valor  $EC_{50}$  más apto era  $3 \times 10^{-9}$  M.

Figura 2. Función contráctil de miocitos cardíacos de rata adulta en respuesta a una perfusión de 15 minutos con hRFRP-1, a intervalos de diez veces, de  $10^{-6}$  M a  $10^{-7}$  M a  $37^{\circ}\text{C}$  y estimulada a  $0,2$  Hz. Los resultados se muestran para (Fig. 1 A; Tabla 1) la longitud del sarcómero de referencia ( $\mu\text{m}$ ) durante 15 minutos de perfusión con péptido. Las longitudes del sarcómero en reposo fueron  $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (C),  $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (1 minuto),  $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (3 minutos),  $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (5 minutos),  $1,75 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (10 minutos) y  $1,75 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (15 minutos). Fig. 2B; tabla 1 cambio porcentual en velocidad de salida, altura máxima y velocidad de retorno durante 15 minutos de perfusión con péptido. Se compararon los valores para cada concentración (eje y; hRFRP-1 ( $\log [ ]$ )) con la referencia media (C) con ANOVA de 1 vía seguida de una Prueba de comparación múltiple de Dunnett con  $p < 0,05$  considerada estadísticamente significativa (\*; Tabla 1). Se calcularon los valores de  $EC_{50}$  más aptos que fueron  $5 \times 10^{-11}$  M (frecuencia de acortamiento),  $5 \times 10^{-10}$  M (amplitud de acortamiento) y  $5 \times 10^{-11}$  M (tasa de realargamiento). Los registros se realizaron a partir de 7-20 miocitos de 1 día y 2 días aislados de  $n = 2-3$  corazones.

Figura 3. Cambio porcentual en la longitud del sarcómero (SL) de referencia, velocidad de salida, altura máxima y velocidad de retorno en respuesta a rRFRP-1  $10^{-8}$  M, hRFRP-1  $10^{-8}$  M, y referencia (medias, solo) en miocitos cardíacos aislados de ratas adultas durante 15 minutos (Tabla 3). No hubo cambios significativos en la longitud del sarcómero de referencia. La influencia de rRFRP-1  $10^{-8}$  M y hRFRP-1  $10^{-8}$  M en el tiempo de salida y en la velocidad de retorno fue comparable y significativamente diferente de los valores de referencia; sin embargo, rRFRP-1  $10^{-8}$  M no produjo la disminución significativa en la reducción máxima observada con hRFRP-1  $10^{-8}$  M y no fue significativamente diferente de la respuesta de referencia media. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett con  $p < 0,05$  considerada estadísticamente significativa (\*; Tabla 3).

Figura 4. Cambios porcentuales en la longitud del sarcómero (SL) de referencia, velocidad de salida, altura máxima y velocidad de retorno en respuesta a la perfusión de 15 minutos con 26RfA(8-26)  $10^{-8}$  M, 26RfA(19-26)  $10^{-8}$  M, hRFRP-1  $10^{-8}$  M o referencia (solo media) en miocitos cardíacos aislados de ratas (Tabla 4). No hubo cambios significativos en la longitud del sarcómero de referencia. No hubo efectos significativos en la velocidad de salida, altura máxima, y la velocidad de retorno en respuesta a 26RfA(8-26)  $10^{-8}$  M,  $n = 17$  o 26RfA(19-26)  $10^{-8}$  M,  $n = 20$ . Se analizaron los datos utilizando ANOVA de 1 vía seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunnett con  $p < 0,05$  considerada estadísticamente significativa (\*, Tabla 4).

Figura 5. Imágenes representativas en modo M en respuesta a hRFRP-1 y solución salina en corazón de ratón. La administración intravenosa de hRFRP-1 a  $5 \mu\text{mols/kg}$  de peso corporal ( $n = 5$ ) produjo efectos agudos y dramáticos en la función cardíaca (recuadro A = antes de la inyección; recuadro B = 5 minutos después de la inyección). Los resultados compuestos para estudios ecocardiográficos se muestran en la Tabla 5. Sin embargo, la solución salina ( $n = 4$ ) no produjo cambios dramáticos significativos en la función cardíaca (recuadro C = antes de la inyección; recuadro D = 5 minutos después de la inyección). Los datos se analizaron utilizando ANOVA de 1 vía seguido de la Prueba de comparación múltiple de Dunnett con  $p < 0,05$  considerada estadísticamente significativo (\*; Tabla 5).

Figura 6. Función contráctil de miocitos cardíacos de rata adulta en respuesta a una perfusión de 15 minutos con hRFRP-1  $10^{-8}$  M en presencia de bis-1  $500 \text{ nM}$ . Los resultados se muestran para la longitud inicial del sarcómero ( $\mu\text{m}$ ) (Tabla 6) durante 15 minutos de perfusión con péptido. Las longitudes del sarcómero en reposo fueron  $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (C),  $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (1 minuto),  $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (3 minutos),  $1,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (5 minutos),  $1,75 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (10 minutos) y  $1,75 \pm 0,01 \mu\text{m}$  (15 minutos). La Tabla 1 muestra el cambio porcentual en la tasa de acortamiento, la amplitud de acortamiento y la tasa de realargamiento durante 15 minutos de perfusión con péptido. Los valores para cada concentración (eje y; hRFRP-1 ( $\log [ ]$ )) se compararon con la referencia media (C) con ANOVA de 1 vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett con  $p < 0,05$  considerada estadísticamente significativa (\*; Tabla 6). Los valores más aptos para  $EC_{50}$  se calcularon que son  $5 \times 10^{-11}$  M (tasa de acortamiento),  $5 \times 10^{-10}$  M (amplitud de acortamiento) y  $5 \times 10^{-11}$  M (tasa de realargamiento). Se realizaron registros a partir de 7-20 miocitos de 1 día y 2 días aislados de  $n = 2-3$  corazones.

Figura 7. A. Rastros de acortamiento del sarcómero representativos en miocitos cardíacos de conejo adulto aislados estimulados a  $0,5$  Hz. Se realizó un registro de señales promediadas de 10 rastros en miocitos 1 día después del aislamiento ( $n=3$ ). Las grabaciones muestran acortamiento antes y 15 minutos después de iniciar la perfusión con hRFRP-1  $10^{-10}$  M o medio (referencia) a  $37^{\circ}\text{C}$ .

B. Resumen de los cambios en el acortamiento máximo y las tasas de acortamiento y realargamiento para los experimentos representados en la Fig. 7A.

C. Marcado con  $^{32}\text{P}$  de proteínas de miocitos cardíacos de conejo en respuesta a la referencia, sin péptido, (carril izquierdo) y hRFRP-1  $10^{-7}$  M (carril derecho). Los miocitos se marcaron durante 1 hora en ortofosfato- $^{32}\text{P}$  y luego se trataron con hRFRP-1 ( $10^{-7}$  M) en medios son radiomarcaje durante 154 minutos. Los supuestos objetivos de fosforilación incluyen troponina I (24 kDa), troponina T (35 kDa), y cadena ligera 2 de miosina (15 kDa). Las imágenes teñidas con plata se muestran a continuación para indicar la carga de proteínas.

Figura 8. Y- [Bpa2]DMS afecta a la frecuencia cardíaca de *D. melanogaster in vivo*. Y-[Bpa2]DMS disminuyó la frecuencia cardíaca en función de la dosis;  $EC_{50} = 1,3 \times 10^{-10}$  M ( $n \geq 16$ ).

Figura 9:

5 Figura 9 A: Comparación de hRFRP-1  $10^{-8}$  M e Y-hRFRP-1 en el acortamiento y la relajación máximos. Los resultados se muestran para el cambio porcentual en el acortamiento máximo (h máx.) y la relajación (v ret.) en miocitos aislados de rata ( $n \geq 14$ ).

Figura 9B: Comparación de hRFRP-1  $10^{-7}$  M y [Bpa3]hRFRP-1 en el acortamiento máximo y la relajación. Los resultados son el cambio porcentual en el acortamiento máximo (h máx.) y la relajación (v ret.) en miocitos cardíacos aislados de rata ( $n \geq 16$ ).

10 Figura 10: Efectos de análogos de alanina  $10^{-8}$  M sobre el acortamiento máximo y la relajación. Los resultados muestran el cambio porcentual en la altura máxima y la velocidad de retorno en miocitos cardíacos de rata. Los análogos se indican con A #, donde # indica el resto sustituido con alanina; hRFRP-1 (abierto). Un asterisco (\*) indica significación estadística,  $p < 0,05$  ( $n \geq 20$ ).

15 Figura 11: Los efectos de hRFRP-1  $10^{-8}$  M (rellenado), [A11]hRFRP-1  $10^{-7}$  M (punteado), y hRFRP-1  $10^{-8}$  M en presencia de [A11]hRFRP-1  $10^{-7}$  M (líneas verticales). Los resultados muestran que [A11]hRFRP-1 es un antagonista de hRFRP-1 para el cambio porcentual en la h máx. y v ret. en miocitos de rata ( $n \geq 14$ ).

Figura 12: Los efectos de [Bpa3]hRFRP-1  $10^{-7}$  M (rellenado), [A11]hRFRP-1  $10^{-7}$  M (sin rellenar) y [Bpa3]hRFRP-1  $10^{-7}$  M en presencia de [A11]hRFRP-1  $10^{-7}$  M (a cuadros). [A11]hRFRP-1 atenúa los efectos de [Bpa3]hRFRP-1 en la h máx. y v ret. en miocitos cardíacos de rata ( $n \geq 12$ ).

20 Figura 13: Proteínas de miocitos de rata marcadas con  $^{32}P$  (izquierda) en respuesta a la referencia, sin péptido, (carril 1); hRFRP-1  $10^{-8}$  M (carril 2) incluido el inhibidor de fosfatasa, caliculina A. Las proteínas teñidas con plata se muestran en el carril 3 (referencia) y en el carril 4 (hRFRP-1  $10^{-8}$  M). Los carriles se numeran de izquierda a derecha, 1, 2, 3 y 4.

25 Figura 14: Resultados de la ecocardiografía en ratones en respuesta a las inyecciones de la vena de la cola. Imágenes en modo 2-D M; hRFRP-1  $10^{-8}$  M (izquierda, parte superior, pre-inyección,  $t = 0$ ; parte inferior,  $t = 10$  min post- inyección); solución salina (derecha), pre-inyección (parte superior;  $t = 0$ ) y post-inyección (parte inferior;  $t = 10$  min).

Figura 15: Los efectos de los péptidos de referencia (solo medias), hRFRP-1 y hRFRP-1 truncado en la velocidad de salida, la altura máxima y la velocidad de retorno en miocitos cardíacos aislados de rata adulta.

30 Figura 16: Los efectos de PQRFamida  $10^{-8}$  M en comparación con hRFRP-1  $10^{-8}$  M y la referencia (solo medias) en miocitos cardíacos aislados de rata adulta.

Figura 17. El efecto de hRFRP-1  $10^{-10}$  M (rellenado;  $n = 20$ ), una referencia, media, sin péptido (blanco;  $n = 12$ ) en la función cardíaca en miocitos cardíacos aislados de conejo. Valor medio  $\pm$  error típico de media;  $p < 0,05$  (\*) se consideró significativamente diferente de la referencia.

35 Figura 18. Los efectos de hRFRP-1  $10^{-8}$  M (rellenado), LPLRFamida  $10^{-8}$  M (SEQ ID NO: 3) (ajedrezado), LPLAFamida  $10^{-8}$  M (líneas verticales), y hRFRP-1  $10^{-8}$  M y LPLAFamida  $10^{-8}$  M (líneas horizontales) en acortamiento máximo, velocidad de salida y velocidad de retorno en miocitos cardíacos aislados de rata. Los resultados se presentan como el cambio porcentual. Los datos demuestran que LPLAFamida es un antagonista de hRFRP-1.

40 Figura 19. Comparación del efecto de [D-H3]hRFRP-1  $10^{-8}$  M (líneas horizontales), hRFRP-1  $10^{-8}$  M (rellenado) y referencia (blanco; sin péptido ni análogo de péptido, solo medias) en el acortamiento máximo, velocidad de salida y velocidad de retorno en los miocitos cardíacos aislados de rata. Los resultados se presentan como el cambio porcentual. Los datos demuestran que [D-H3]hRFRP-1  $10^{-8}$  M es un agonista inverso de hRFRP-1.

#### Descripción de la invención

45 La invención se relaciona con el descubrimiento de que los péptidos RFRP-1, ortólogos de mamíferos de DMS producen un efecto depresivo muy específico y dramático en miocitos cardíacos de mamíferos y en el rendimiento cardíaco *in vivo*. Más concretamente, la invención se relaciona con péptidos aislado como se describe en la reivindicación 1, cuya estructura se basa en la modificación de la secuencia de RFRP-1 (hRFRP-1) humana: MPHSFANLPLRFamida (SEQ ID NO: 2) y sus ortólogos. Los estudios de estructura-función de hRFRP-1 y otros  
50 miembros de péptidos relacionados con FMRFamida como se describen en la presente memoria facilitan además que el péptido de la invención, así como hRFRP-1, son igualmente capaces de modular la función cardíaca de los mamíferos.

Por consiguiente, la invención se refiere a un péptido aislado como se describe en la reivindicación 1. La fenilalanina C-terminal representada por F está amidada. Por consiguiente, ya esté explícitamente indicado o no, una "F" C-terminal o fenilalanina incluye la representación de cualquier Famida. Se reconoce en esta invención que el tetrapéptido como se expuso anteriormente, modula la función cardíaca.

Por "modulan la función cardíaca" o "modula la función cardíaca" se entiende que uno o más péptidos descritos en la presente memoria ejercen de manera predecible un efecto positivo o negativo sobre la función contráctil cardíaca. Este efecto positivo o negativo se puede determinar por métodos *in vivo* o *in vitro* conocidos por el experto en la técnica, y como se describe en esta memoria de otra manera. Por lo tanto, al utilizar métodos *in vivo* destinados a medir la frecuencia cardíaca, el volumen sistólico, la fracción de expulsión y/o el gasto cardíaco, incluidos los métodos descritos en esta memoria, se puede determinar si uno o más de los péptidos descritos en esta memoria presentan un efecto cronótropro positivo o negativo, inótropro o lusitropro en el corazón, incluido el corazón de vertebrado o mamífero. Además, al utilizar métodos *in vitro* destinados a medir parámetros de acortamiento y/o relajación del sarcómero en miocitos aislados, incluidos los métodos descritos en esta memoria, se puede determinar si uno o más péptidos descritos en esta memoria presentan un efecto positivo o negativo sobre la función contráctil cardíaca; y por lo tanto pueden modular la función cardíaca. Estos parámetros incluyen al menos uno de altura máxima, velocidad de salida y/o velocidad de retorno. Ya sea que se utilicen los métodos *in vivo* o *in vitro*, se reconoce que el experto en la técnica incluirá controles apropiados, sujetos de referencia y/o muestras para asegurar que los efectos positivos o negativos observados en la función contráctil cardíaca se deben a la acción de uno o más péptidos de la invención. Se reconoce que los péptidos de la invención descritos en la presente memoria pueden afectar la función cardíaca al bloquear la acción de señalización de un péptido que contiene RFamida, incluida el hRFRP-1.

Como se describe e ilustra a continuación, el solicitante ha descubierto que la administración de hRFRP-1 *in vivo* en mamíferos, e *in vitro* en miocitos derivados de mamíferos, demuestra que el hRFRP-1 puede disminuir de forma predecible la función cardíaca contráctil y, por lo tanto, modular la función cardíaca. El péptido de la invención descrito en la presente memoria que es un péptido modificado procedente de la secuencia del péptido hRFRP-1 original incluye agonistas, entre otros agonistas inversos y superagonistas; y antagonistas de hRFRP-1. Por un "antagonista de hRFRP-1" se entiende que el péptido de la invención puede atenuar de forma predecible una o más acciones de hRFRP-1 sobre la contractilidad cardíaca. A este respecto, para los fines de la invención, por un "agonista de hRFRP-1" se entiende que el péptido de la invención puede disminuir de manera predecible la función contráctil cardíaca en comparación con hRFRP-1. Por un "super agonista de hRFRP-1" se entiende que el péptido de la invención pueda disminuir de manera predecible la función cardíaca contráctil en comparación con hRFRP-1, con más potencia que el péptido hRFRP-1 original. Por un "agonista inverso de hRFRP-1" se entiende que el péptido de la invención pueda aumentar de forma predecible la función cardíaca contráctil en comparación con el efecto de hRFRP-1 sobre la función contráctil cardíaca. A este respecto por "atenuar" se entiende disminuir o eliminar el efecto de hRFRP-1 en la función contráctil cardíaca. La descripción proporciona métodos de detección de compuestos que son agonistas; incluidos los agonistas inversos y superagonistas; y antagonistas de una o más acciones de hRFRP-1 sobre la contractilidad cardíaca. Se reconoce que el orden específico de las etapas de los métodos descritos en la presente memoria no es restrictivo, siempre que los métodos permitan fácilmente la determinación de los efectos de uno o más de los péptidos descritos en la presente memoria, en comparación con el efecto de hRFRP-1 sobre la función contráctil cardíaca. Por ejemplo, se reconoce que para determinar si el péptido de la invención descrito en la presente memoria puede atenuar el efecto de hRFRP-1 sobre la función contráctil cardíaca, determinable midiendo uno o más parámetros de acortamiento de sarcómeros en miocitos aislados basándose en lo dado a conocer en la presente memoria; los expertos en la técnica pueden incluir una etapa en la que uno o más miocitos se incuban previamente con hRFRP-1, y se realiza una medición de la contractibilidad cardíaca; seguida de la adición de un péptido de la invención descrito en la presente memoria como un agente de prueba para la muestra incubada previamente, y la posterior medición del parámetro. De esta manera, se puede determinar si la incubación conjunta de los miocitos con hRFRP-1 y el agente de prueba disminuye el efecto observado después de la incubación con hRFRP-1 solo. Alternativamente, por ejemplo, las etapas pueden incluir una muestra de referencia en la que uno o más miocitos se incuban con hRFRP-1 solo, y una segunda muestra en la que se incuban junto con hRFRP-1, el agente de prueba y uno o más miocitos durante el mismo período de tiempo como muestra de referencia. Posteriormente, la medición del punto final específico se toma de la muestra de prueba y la muestra de referencia, y se hace la comparación apropiada. De nuevo, se determina a partir de la comparación, si el agente de prueba atenúa la acción de hRFRP-1 en la contractilidad cardíaca. Dichas variaciones del diseño de ensayo específico que son fácilmente variables por el experto en la técnica están abarcadas por los métodos de la invención.

La descripción abarca métodos de tratamiento con el péptido de la invención o composiciones farmacéuticas que comprenden el péptido, como se describe en la presente memoria. Se reconoce que la selección del péptido de la invención para tratar un determinado trastorno puede ser realizada por un experto en la técnica, dependiendo de la capacidad del péptido para disminuir o aumentar la función contráctil cardíaca cuando se administra a un sujeto que lo necesita; y considerar si sería beneficioso tratar dicho trastorno al aumentar o disminuir la función contráctil cardíaca. También se reconoce que el péptido de la invención descrito en la presente memoria puede afectar la función cardíaca al bloquear la acción de señalización de un péptido que contiene RF amida, incluido el hRFRP-1.

De esta manera, el experto en la técnica puede seleccionar entre los agonistas y antagonistas de hRFRP-1 descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se prevé que en el caso de la insuficiencia cardíaca, incluida, por ejemplo, la insuficiencia cardíaca congestiva descompensada, sería deseable provocar un efecto ionótropro positivo y aumentar la función contráctil cardíaca. Por lo tanto, en tal caso, sería deseable seleccionar un agonista inverso, o antagonista de hRFRP-1. Por otra parte, se reconoce además que en el caso de otros trastornos particulares puede ser deseable disminuir la función contráctil cardíaca, por ejemplo, en determinadas situaciones quirúrgicas, arritmias y

fibrilaciones incluidas, por ejemplo, arritmias provocadas por fármacos. En este sentido, por "trastorno cardíaco" se entiende una enfermedad aguda o crónica que afecta al corazón, enfermedad que está relacionada con una función contráctil anormal del corazón. Se reconoce que la función contráctil anormal puede ser un trastorno primario en un sujeto o sintomático de otra enfermedad primaria aguda o crónica. La administración de uno o más de los péptidos de la invención a células o tejidos cardíacos puede fijar de manera detectable el ritmo en células o tejidos cardíacos posarrítmicos. La administración puede ser *in vivo* o *in vitro*.

Por lo tanto, con referencia al péptido original MPHFSANLPLRFamida (SEQ ID NO: 2) (denominado en lo sucesivo "hRFRP-1"), la invención abarca un péptido como el descrito en la reivindicación 1 procedente de la secuencia del péptido hRFRP-1 original. La fenilalanina C-terminal representada por F está amidada.

Para los propósitos de la invención, cualquiera de los aminoácidos comprendidos por los péptidos de la invención es un aminoácido natural o modificado. Para los propósitos de la invención, la expresión "aminoácido natural" significa los isómeros L bien conocidos de los aminoácidos naturales. La expresión "aminoácido modificado" significa otros aminoácidos distintos de los isómeros L bien conocidos de aminoácidos naturales. La expresión "aminoácido modificado", como emplea en esta memoria, incluye aminoácidos que se modifican química o después de la traducción, así como las contrapartidas D de los isómeros L de los aminoácidos naturales y los compuestos químicos utilizados como alternativas a los aminoácidos en la síntesis de compuestos peptidomiméticos. Dichos compuestos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se producen normalmente mediante la sustitución de determinados grupos R o aminoácidos en un péptido con sustituciones no naturales. Dichas sustituciones pueden aumentar la estabilidad; solubilidad; permeabilidad, incluida la permeabilidad hematoencefálica; la biodisponibilidad; o actividad del péptido resultante.

Por lo tanto, los péptidos modificados derivados de la secuencia del péptido hRFRP-1 original se producen cuando uno o más aminoácidos en el hRFRP-1 natural se sustituyen con un aminoácido natural diferente, un derivado de aminoácido, un aminoácido sintético, un análogo de aminoácido o un aminoácido no natural. Dichas modificaciones incluyen una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras que producen un péptido de la invención que modula la función cardíaca. Las modificaciones pueden proporcionar determinadas ventajas en el uso del péptido de la invención tales como aumento de potencia; solubilidad; permeabilidad, incluida la permeabilidad de la barrera hematoencefálica; biodisponibilidad; estabilidad; disminución de la toxicidad o degradación en condiciones fisiológicas.

Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, tales como sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, glicina; glicina, alanina; valina, isoleucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. El grupo de aminoácidos no polares (hidrófobos) incluye alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. El grupo de aminoácidos polares neutros incluye glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. El grupo de aminoácidos con carga positiva (básicos) incluye arginina, lisina e histidina. El grupo de aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluye ácido aspártico y ácido glutámico.

La utilización de sustituciones menos conservadoras o no conservadoras puede dar lugar al hRFRP-1 modificado particularmente deseado de la invención, p. ej., al provocar cambios deseables en la carga, la conformación y otras propiedades biológicas. Dichas sustituciones incluirían, por ejemplo, la sustitución de un resto hidrófilo por un resto hidrófobo, la sustitución de una cisteína o prolina por otro resto, la sustitución de un resto que tiene una pequeña cadena lateral por un resto que tiene una cadena lateral voluminosa o la sustitución de un resto que tiene una carga neta positiva para un resto que tiene una carga neta negativa. Cuando el resultado de una sustitución dada no se puede predecir con certeza, los derivados pueden ensayarse fácilmente según los métodos descritos en la presente memoria para determinar la presencia o ausencia de las características deseadas; incluidas por ejemplo, la modulación de la función cardíaca y la capacidad para actuar como hRFRP-1 agonista o antagonista.

Así como es posible reemplazar los sustituyentes de la estructura peptídica, también es posible sustituir grupos funcionales que decoran la estructura con grupos caracterizados por características similares (es decir, grupos R que forman parte de cada aminoácido). Cuando se desea un agonista de hRFRP-1, estas sustituciones serán generalmente conservadoras, es decir, el grupo de reemplazo tendrá aproximadamente el mismo tamaño, forma, hidrofobicidad y carga que el grupo original. Las modificaciones no de secuencia pueden incluir la modificación química de porciones del péptido descrito en la presente memoria.

Los péptidos descritos pueden comprender péptidos modificados químicamente que están yodados, amidados, sulfatados, halogenados de forma simple o múltiple, alquilados, carboxilados o fosforilados. El péptido puede estar acilado de forma individual o múltiple, como con un grupo acetilo, con un resto farnesilo, o con un ácido graso, que puede estar saturado, monoinsaturado o poliinsaturado. El ácido graso también puede estar monofluorado o polifluorado. La descripción también abarca análogos de metionina de hRFRP1, por ejemplo los análogos de metionina sulfona y sulfóxido de metionina. La descripción también incluye sales de hRFRP-1, tales como sales amónicas, incluidas las sales de alquil o aril amonio, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, tiosulfato, carbonato, bicarbonato, benzoato, sulfonato, tiosulfonato, esilato, sulfonato de etilo y bencensulfonato.

Los péptidos con hRFRP-1 modificados de la invención también incluyen compuestos peptidomiméticos derivados de hRFRP-1. La síntesis de compuestos peptidomiméticos es bien conocida por los expertos en la técnica y dichos compuestos se producen por sustitución de determinados grupos R o aminoácidos en el péptido con restos no

naturales. Dichas sustituciones se utilizan para aumentar la estabilidad; solubilidad; permeabilidad; incluida la permeabilidad de la barrera hematoencefálica; biodisponibilidad; o una actividad particularmente deseada de hRFRP-1 como se expone en la presente memoria; o retener la capacidad de hRFRP-1 para modular la función cardíaca. Los ejemplos de peptidomiméticos adecuados incluyen aminoácidos D de los aminoácidos L correspondientes, tetrazol (Zabrocki *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110:25875-5880 (1988)); isoésteres de enlaces amida (Jones *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 29: 3853-3856 (1988)); ácido LL-3-amino-2-propenidona-6-carboxílico (LL-Acp) (Kemp *et al.*, *J. Org. Chem.* 50:5834-5838 (1985)). Análogos similares se muestran en Kemp *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 29: 5081-5082 (1988), así como Kemp *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 29: 5057-5060 (1988), Kemp *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 29: 4935-4938 (1988) y Kemp *et al.*, *J. Org. Chem.* 54:109-115 (1987). Otros peptidomiméticos adecuados se muestran en Nagai y Sato, *Tetrahedron Lett.* 26: 647-650 (1985); Di Maio *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1687 (1985); Kahn *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 30:2317 (1989); Olson *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 112:323-333 (1990); Garvey *et al.*, *J. Org. Chem.* 56:436 (1990). Más peptidomiméticos adecuados incluyen hidroxi-1, 2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Miyake *et al.*, *J. Takeda Res. Labs.* 43:53-76 (1989)); 1, 2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Kazmierski *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 113:2275-2283 (1991)); ácido histidina isoquinolona carboxílico (HIC) (Zechel *et al.*, *Int. J. Pep. Protein Res.* 43 (1991)); (2S, 3S)-metilfenilalanina, (2S, 3R)-metilfenilalanina, (2R, 3S)-metilfenilalanina y (2R, 3R)-metilfenilalanina (Kazmierski y Hrubí, *Tetraedron Lett.* (1991)).

Los péptidos hRFRP-1 modificados de la invención también pueden incluir los péptidos derivados de hRFRP-1 en los que al menos un enlace peptídico del eje central del hRFRP-1 original se ha modificado o alterado químicamente a un enlace peptídico del eje central de origen no natural. En otras palabras, el enlace peptídico de origen natural entre el átomo de nitrógeno de un resto de aminoácido y el átomo de carbono del siguiente se ha alterado a enlaces de origen no natural por reducción, alquilación (por ejemplo, metilación) en el átomo de nitrógeno, o los enlaces se han reemplazado por un enlace reducido, como una amina, un enlace urea o un enlace sulfonamida, un enlace etérico o un enlace tioetérico. A este respecto, se reconoce que la cadena lateral del resto puede desplazarse al nitrógeno del eje central para obtener glicina N-alquilada. Los ejemplos de usos de restos peptidomiméticos y síntesis de ejes centrales peptídicos no naturales y otras modificaciones químicas de péptidos incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. n° 7.217.808; n° 7.192.723 y n° 7.683.031; cuyos contenidos completos se incorporan en la presente memoria por referencia.

Los péptidos hRFRP-1 modificados de la invención también pueden incluir aquellos péptidos que son moléculas cíclicas, o que están ciclados. Una "molécula cíclica" se refiere, en un caso, a un péptido en el que se forma un anillo mediante la formación de un enlace peptídico entre el átomo de nitrógeno en el terminal N y el carbono carbonilo en el terminal C. "Ciclado" se refiere a la formación de un anillo por un enlace covalente entre el nitrógeno en el terminal N del compuesto y la cadena lateral de un aminoácido adecuado en la secuencia presente en el mismo, preferiblemente la cadena lateral del aminoácido C-terminal. Por ejemplo, se puede formar una amida entre el átomo de nitrógeno en el extremo N y el carbono carbonilo en la cadena lateral de un ácido aspártico o un ácido glutámico. Alternativamente, el compuesto puede ciclarse formando un enlace covalente entre el carbonilo en el extremo terminal C del compuesto y la cadena lateral de un aminoácido adecuado en la secuencia contenida en el mismo, preferiblemente la cadena lateral del aminoácido del terminal N. Por ejemplo, se puede formar una amida entre el carbono carbonilo en el terminal C y el átomo de nitrógeno amínico en la cadena lateral de una lisina o una ornitina. Además, el compuesto puede ciclarse formando un éster entre el carbono carbonílico en el terminal C y el átomo de oxígeno del hidroxilo en la cadena lateral de una serina o una treonina. "Ciclado" también se refiere a la formación de un anillo por un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos adecuados en la secuencia presente en el compuesto, preferiblemente las cadenas laterales de los dos aminoácidos terminales. Por ejemplo, un disulfuro puede formarse entre los átomos de azufre en las cadenas laterales de dos cisteínas. Alternativamente, se puede formar un éster entre el carbono carbonílico en la cadena lateral de, por ejemplo, un ácido glutámico o un ácido aspártico, y el átomo de oxígeno en la cadena lateral de, por ejemplo, una serina o una treonina. Se puede formar una amida entre el carbono carbonílico en la cadena lateral de, por ejemplo, un ácido glutámico o un ácido aspártico, y el nitrógeno amínico en la cadena lateral de, por ejemplo, una lisina o una ornitina. Los métodos para preparar moléculas cíclicas derivadas de péptidos, o péptidos ciclados, se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 7.683.031; cuyos contenidos completos se incorporan en la presente memoria por referencia.

Además, un compuesto se puede ciclar con un grupo enlazador entre los dos extremos, entre un extremo y la cadena lateral de un aminoácido en el compuesto, o entre las cadenas laterales y dos aminoácidos en el péptido o derivado peptídico. Los grupos enlazadores adecuados se describen en Lobl *et al.*, documento WO 92/00995 y Chiang *et al.*, documento WO 94/15958.

Los péptidos que comprenden las secuencias descritas en la presente memoria pueden sintetizarse mediante técnicas de secuenciación manual o automatizada bien conocidas que emplean el método de síntesis de péptidos en fase sólida (p. ej., t-BOC o F-MOC), mediante síntesis en fase de solución o mediante otras técnicas muy adecuadas incluidas combinaciones de los métodos anteriores. Los métodos t-BOC y F-MOC, que son bien conocidos y ampliamente utilizados, se describen, por ejemplo, en Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 88: 2149 (1963); Meienhofer, *Hormonal Proteins and Peptides*, C. H. Li, Ed., Academic Press, 1983, págs. 48-267; y Barany y Merrifield, en *The Peptides*, E. Gross e I. Meienhofer, Eds., Academic Press, Nueva York, 1980, págs. 3-285. Los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida se describen en Merrifield, R. B., *Science*, 232: 341 (1986); Carpino, L. A. y Han, G. Y., *J.*

*Org. Chem.*, 37: 3404 (1972); y Gauspohl, H. *et al.*, *Synthesis* 52315 (1992)). Por consiguiente, el péptido según la invención puede proporcionarse como péptido sintético.

Se reconoce que, como alternativa a los métodos de síntesis química, se pueden producir péptidos particulares de la invención por técnicas biotecnológicas bien conocidas, incluidas las adaptadas para la producción a gran escala de proteínas y péptidos. A este respecto, mediante la utilización de técnicas convencionales de biología molecular, incluidas, por ejemplo, las descritas en *Molecular Cloning*, 2ª ed. (J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989); los ácidos nucleicos que codifican el péptido de la invención se pueden expresar en células anfitrionas, y los péptidos se pueden aislar posteriormente y purificar de las células anfitrionas utilizando métodos bien conocidos. Las células anfitrionas pueden incluir líneas celulares bacterianas, de mamíferos o de insectos; entre otras, por ejemplo, células CHO, *E. coli* y células Sf9. Dichos métodos pueden incluir el uso de etiquetas de proteínas de fusión bien conocidas para facilitar el aislamiento y la purificación del péptido expresado deseado. Generalmente dichas etiquetas son convenientemente extraíbles por proteólisis limitada. Se reconoce además que los péptidos de la invención producidos por dichas técnicas biotecnológicas pueden modificarse además por medios químicos como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, utilizando técnicas biotecnológicas, pueden modificarse péptidos RFRP-1 endógenos para incluir una o más modificaciones incluidas inserciones de aminoácidos, eliminaciones, sustituciones y truncamientos. Por lo tanto, el péptido de la invención abarca el péptido de la invención descritos en la presente memoria que se aísla después de la síntesis química, o se aíslan después de la producción por métodos biotecnológicos.

A lo largo de la memoria descriptiva y los dibujos de la presente solicitud, las abreviaturas utilizadas para describir péptidos, aminoácidos, etc. son las recomendadas por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB o las utilizadas convencionalmente en la técnica; incluidas las siguientes abreviaturas de aminoácidos:

Gly o G: Glicina; Ala o A: Alanina; Val o V: Valina; Leu o L: Leucina; Ile o I: Isoleucina; Ser o S: Serina; Thr o T: Treonina; Cys o C: Cisteína; Met o M: Metionina; Glu o E: ácido glutámico; Asp o D: ácido aspártico; Lys o K: Lisina; Arg o R: Arginina; His o H: Histidina; Phe o F: Fenilalanina; Tyr o Y: Tirosina; Trp o W: triptófano; Pro o P: Prolina; Asn o N: Asparagina; Gln o Q: Glutamina. A menos que se especifique lo contrario, los aminoácidos que pueden tener isómeros ópticos se pretende que representen su isómero L, y los péptidos se presentan en la dirección del terminal N al terminal C como se entiende convencionalmente en la técnica. Los aspectos particulares y las realizaciones de la invención se proporcionan con más detalle a continuación.

En otro, el péptido de la invención puede ser un agonista, antagonista o agonista inverso de h-RFRP1.

La descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un péptido aislado.

La descripción proporciona el uso de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria en el tratamiento de un trastorno. El trastorno puede ser un trastorno cardíaco. La descripción proporciona además el uso del péptido de la invención para aumentar o disminuir la función cardíaca antes, durante o después de la intervención quirúrgica.

La descripción proporciona el uso del péptido de la invención descrito en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno cardíaco.

La descripción proporciona un método para tratar un trastorno cardíaco en un vertebrado, incluido un mamífero, comprendiendo el método administrar a dicho vertebrado una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de la invención o una composición farmacéutica descrita anteriormente.

La invención proporciona un método para detectar un agente que modula la función cardíaca en un vertebrado, comprendiendo dicho método:

a) poner en contacto un primer grupo de uno o más miocitos con un péptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

MPHSFANLPLRF (SEQ ID NO: 2); MPPSFANLPLRF (SEQ ID NO: 14); VPNSVANLPLRF (SEQ ID NO: 15); VPHSAANLPLRF (SEQ ID NO: 16); MPPSAANLPLRF (SEQ ID NO: 17); SLKPAANLPLRF (SEQ ID NO: 18), PLRF, PQRF, FLRF, FQRF, APLRF (SEQ ID NO: 19), APQRF (SEQ ID NO: 20), AFLRF (SEQ ID NO: 21), AFQRF (SEQ ID NO: 22), VPLRF (SEQ ID NO: 23), VPQRF (SEQ ID NO: 24), VFLLRF (SEQ ID NO: 25) y VFQRF (SEQ ID NO: 26), en donde F está amidado;

b) poner en contacto el primer grupo expuesto en a), o un segundo grupo de uno o más miocitos con un agente de prueba; y medir el efecto posterior a la puesta en contacto con el agente de prueba; y

c) determinar a partir de la comparación de la medición en la etapa a) a la de la etapa b) si el agente de prueba modula la función cardíaca en un vertebrado.

En una variante, el péptido en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en:

MPHSFANLPLRF (SEQ ID NO: 2); MPPSFANLPLRF (SEQ ID NO: 14); VPNSVANLPLRF (SEQ ID NO: 15); VPHSAANLPLRF (SEQ ID NO: 16); MPPSAANLPLRF (SEQ ID NO: 17); PLRF, PQRF, PLRF y FQRF, en donde F está amidado, y dicho vertebrado es un mamífero.



En otro, el agente de prueba es un péptido según la invención.

La descripción proporciona un método de detección de un compuesto que modula la función cardíaca en un vertebrado, comprendiendo dicho método:

5 poner en contacto un grupo de uno o más miocitos con un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos X1 -X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-F (SEQ ID NO: 13) en donde,

cualquiera de los aminoácidos X1 a X8 está presente o ausente, X9 y X11 están presentes, y X10 es L o Q; o una de sus sales, amidas o ésteres, y determinar si dicho polipéptido modula la función cardíaca en dicho primer grupo debido a dicha puesta en contacto.

10 En otro aspecto relacionado, la descripción proporciona un método de detección de un compuesto que modula la función cardíaca en un vertebrado, comprendiendo dicho método:

poner en contacto células o tejidos cardíacos con un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-F (SEQ ID NO: 13) en donde, cualquiera de los aminoácidos X1 a X8 está presente o ausente, X9 y X11 están presentes, y X10 es L o Q; o una de sus sales, amidas o ésteres, y determinar si dicho polipéptido modula la función cardíaca en dicho primer grupo debido a dicha puesta en contacto. Como se emplea en la presente memoria, para los fines de la invención por "poner en contacto con células o tejido cardíaco" se entiende que una célula, o una población de células derivadas del corazón, incluidos los miocitos, se ponen en contacto con un péptido en condiciones que favorecen la unión y/o uno o más efectos positivo o negativo sobre la contractilidad cardíaca. Se reconoce que poner en contacto células o tejidos cardíacos puede realizarse *in vitro*; tal como por los métodos *in vitro* descritos en la presente memoria; o *in vivo*, mediante la administración de uno o más péptidos a un animal completo, incluida, por ejemplo, mediante inyección en la vena de la cola y otros métodos de administración *in vivo* descritos en la presente memoria.

La descripción proporciona un método para modular la función cardíaca en un vertebrado, incluido un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho vertebrado un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos X1-X2-X3-X4-X4-X5 X6-X7-X8-X9-X10-X11-F (SEQ ID NO: 13) en donde,

25 cualquiera de los aminoácidos X1 a X8 está presente o ausente, X9 y X11 están presentes, y X10 es L o Q; o una de sus sales, amidas o ésteres en una cantidad efectiva para modular la función cardíaca en dicho vertebrado.

Se describen además métodos o composiciones que utilizan un péptido de la invención descrito en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los portadores farmacéuticamente aceptables convencionales, tales como solución salina amortiguada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua o una emulsión de triglicéridos, varios tipos de agentes humectantes, comprimidos, comprimidos recubiertos y cápsulas. Normalmente, dichos portadores contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, determinados tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles u otros excipientes conocidos. Dichos portadores también pueden incluir aditivos saborizantes y colorantes u otros ingredientes.

35 Por medio de técnicas bien conocidas tales como la valoración y teniendo en cuenta las características farmacocinéticas observadas del péptido administrado en cada sujeto, un experto en la técnica puede determinar las dosis apropiadas para los métodos de tratamiento de la presente invención.

Las características adicionales de la descripción pueden llegar a ser evidentes para los expertos en la técnica a partir de un examen de la Descripción Detallada expuesta en la presente memoria, tomada en conjunto con los Dibujos, Ejemplos y las reivindicaciones adjuntas.

40 Para los fines de la invención, se entiende que la expresión "que comprende" incluye el término "que consiste en".

### Ejemplos

Ejemplo A:

45 Caracterización del receptor cardíaco hRFRP-1, que prueba la hipótesis RFRP-1 se une a un receptor acoplado a la proteína G (GPCR) en miocitos cardíacos.

El receptor hRFRP-1 se caracteriza por unirse a un agonista o antagonista de hRFRP-1 detectable a los miocitos cardíacos de rata. La unión análoga detectable se eliminará frente a hRFRP-1 para ayudar a confirmar la identidad y especificidad del receptor. El solicitante examinará si [Bpa3]hRFRP-1, que aumenta la función cardíaca, se une al receptor hRFRP-1. La expresión del receptor hRFRP-1 se examinará por inmunolocalización, utilizando antisueros generados contra el receptor identificado. Se caracterizará la expresión del receptor en respuesta a un estresante cardíaco, infarto de miocardio (IM). El receptor también se examinará a nivel de nucleótidos, utilizando técnicas biológicas moleculares bien conocidas, tales como transferencias Northern y Southern y reacción en cadena de la polimerasa (PGR), y similares.

55 Un análogo de hRFRP-1 detectable se unirá a las membranas de miocitos cardíacos para caracterizar el enlace de alta afinidad del péptido a su receptor. Se puede generar un análogo detectable por yodación del agonista de hRFRP-1, Y-hRFRP-1. (El análogo de tirosil hRFRP-1 también disminuye la función cardíaca similar al péptido hRFRP-1, lo que sugiere que se une al mismo receptor. Se analizará un análogo de I-Y-hRFRP-1 en miocitos

cardíacos para confirmar que es un agonista o antagonista de la función cardíaca de hRFRP-1 antes de usarlo para "etiquetar" el receptor. Se prevé que el análogo marcado se una a una proteína de miocito porque Y-hRFRP-1 es un agonista de hRFRP-1. Además, un análogo de <sup>125</sup>I-Y-hRFRP-1 se une a rfr-2 expresado, un receptor cardíaco hRFRP-1 experimental, de manera firme y específica (Gouarderes *et al.* 2007, *Neuropharmacology* 2: 376-86). Un análogo alternativo detectable es un análogo de <sup>3</sup>H-Y-hRFRP-1 (Talmont *et al.* 12 de agosto 2009, *Neurochem Int.* EPUB antes de impresión, PUBMED PMID 19682524). La especificidad del enlace se probará por competencia con hRFRP-1. Además, los ensayos se utilizarán para competir la unión con [Bpa3]hRFRP-1; como método indirecto para determinar si el péptido original y el análogo se unen al mismo receptor. La identidad del receptor [Bpa3]hRFRP-1 se demostrará al sondear miocitos cardíacos con [Bpa3]hRFRP-1 para caracterizar la proteína a la que se une.

Las membranas se preparan en base a métodos probados. En resumen, los miocitos cardíacos aislados preparados según los métodos descritos en la presente memoria se incuban con un análogo de hRFRP-1 detectable (0,1 μM) durante la noche en un agitador orbital, se lavan para eliminar el análogo libre, se centrifugan y el sedimento se disuelve en condiciones no desnaturizantes para mantener la integridad de la unión del receptor peptídico. La fotoactivación de un análogo de hRFRP-1 que contiene Bpa se realiza después de la incubación con luz ultravioleta (365 nm) durante 15 minutos. Las muestras se separan mediante electroforesis en gel bidimensional no desnaturizante (2DGE) y se procesan para identificar específicamente proteína(s) marcada(s). Una "mancha" 2DGE marcada se purifica hasta homogeneidad, que se define por una sola proteína bajo varios parámetros de gel diferentes, p. ej., cambio de P. M. o gradiente de pl y/o condiciones de amortiguación, y/o un solo terminal N. Una vez purificadas hasta homogeneidad, se determinarán el P.M. y el pl, y se obtendrá la secuencia de aminoácidos basándose en tríptico cartografías y espectrometría de masas. El análogo unido al receptor no interferirá con el análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Los datos se compararán con rfr-2 (acceso n° AF268898, P.M. = 48 kDa, pl 9,5) para determinar si esta proteína es el receptor de hRFRP-1; si no hay una coincidencia, se buscarán en las bases de datos. Pueden obtenerse datos de secuencia adicionales a partir de la amplificación de transcritos de miocitos usando cebadores diseñados para la secuencia de aminoácidos obtenida. Si la secuencia es nueva, la proteína predicha se analizará para identificar las estructuras características de los GPCR. Los estudios de control incluirán miocitos cardíacos incubados con hRFRP-1 detectable en presencia de un exceso de análogo sin marcar o hRFRP-1, incubación con <sup>125</sup>I (o <sup>3</sup>H) libre, e incubación sin péptido. Otros experimentos para caracterizar el receptor hRFRP-1 incluirán estudios de enlace ligando-proteína para delinear SAR, que debe ser coherente con la exploración de alanina y los datos de truncamiento del terminal N.

Si el Y-hRFRP-1 radiomarcado no es un agonista de hRFRP-1, el Y-hRFRP-1 no marcado, que ya está identificado que es un agonista de hRFRP-1, puede detectarse unido al receptor en base a un cambio de pl en 2DGE. La proteína receptora con y sin Y-hRFRP-1, unida y sin unir, diferirá en pl para detectar la unión análoga por un cambio de pl lo suficientemente significativo de detectar.

El Y-hRFRP-1 unido a la proteína receptora también se puede detectar mediante un antisuero contra Y-liRFRP-1.

Se usarán condiciones no desnaturizantes para mantener el enlace Y-hRFRP-1-receptor; sin embargo, la constante de unión puede no ser apropiada, en cuyo caso se emplearán otros medios para etiquetar la proteína receptora. Una alternativa es [Bpa3]hRFRP-1. Una vez identificada por el método descrito anteriormente, se investigará la capacidad de la proteína receptora para unir hRFRP-1, [A11]hRFRP-1 (un antagonista) y [Bpa3]hRFRP1 (un análogo estimulante) en las membranas de miocitos cardíacos y, eventualmente, utilizando proteínas expresadas. Y-hRFRP-1 se usa como un experimento independiente adicional para identificar el (los) receptor(es) que une [Bpa3]hRFRP-1.

Expresión de un receptor cardíaco hRFRP-1

Se plantean antisueros policlonales contra el receptor identificado para sondear la expresión en miocitos cardíacos aislados de rata y en tejido cardíaco de rata. Si la proteína receptora se identifica como rfr-2, se utilizan antisueros rfr-2 para sondear la expresión del receptor. Varios antisueros rfr-2 están disponibles en el mercado, generado cada uno contra un antígeno diferente predicho a partir de la secuencia de la proteína. Se utilizarán protocolos habituales para la inmunofluorescencia indirecta para sondear miocitos de rata y secciones de tejido cardíaco.

Estos datos se evalúan contra el trabajo completado que demuestra que RFRP-1 se expresa en el corazón de rata. Se aisló ARN de los miocitos ventriculares cardíacos de rata y se generó un ADNc (SEQ ID NO: 27; secuencia de aminoácidos - SEQ ID NO: 28). La secuenciación demostró que la transcripción de RFRP-1 se expresa, proporcionando pruebas de que RFRP-1 es una molécula de señalización cardíaca. Estos experimentos también se llevaron a cabo utilizando tejido ventricular cardíaco humano y, al igual que con el tejido de rata, se demostró que el ARNm de RFRP-1 se expresa en el corazón humano (SEQ ID NO: 29; secuencia de aminoácidos - SEQ ID NO: 30). Estos datos fueron respaldados por la tinción inmunohistoquímica realizada en miocitos cardíacos de rata que demostraron la expresión del péptido relacionado con la RFamida.

Los protocolos para estudios de inmunofluorescencia en miocitos y secciones del corazón son en resumen como se indica a continuación. Los miocitos cardíacos aislados de vertebrados se procesarán para inmunofluorescencia indirecta basada en McCormick y Nichols (1993). Se procesarán corazones de vertebrados para seccionamiento en criostato. Las células y secciones fijas se incubarán con antisueros de receptor hRFRP-1 policlona de conejo (~1:

1000) durante la noche, seguido de lavados e incubación con anticuerpo secundario fluorescente a base de cianina anti-conejo en cabra (~1:500), con lavados posteriores y tratamiento para diagnóstico por la imagen. Estas condiciones siguen un protocolo utilizado en McCormick y Nichols (1993). La unión no específica se determinará mediante la incubación con un antisuero primario absorbido por antígenos, y en ausencia de un antisuero primario con anticuerpo secundario solo. Las diluciones exactas de antisueros primarios y anticuerpos secundarios se optimizarán en condiciones experimentales; los valores dados son típicos de los protocolos inmunofluorescentes indirectos previos.

Los datos de inmunolocalización de RFamida en miocitos cardíacos aislados de rata; el control con antisueros preabsorbidos y sin antisueros primarios demuestran que la tinción es específica del péptido que contiene RFamida, p. ej., RFRP-1.

Además, la expresión de la proteína receptora se investigará en respuesta al infarto de miocardio (IM) provocado en ratas. El IM provocado en ratas debido a la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) es una técnica probada ofrecida en función de la recarga en UM C1G. Se sigue esta vía de análisis debido al efecto dramático de hRFRP-1 en la función cardíaca, y para comprender mejor cómo los análogos de hRFRP-1 pueden actuar para aumentar la función cardíaca en caso de insuficiencia cardíaca. En resumen, una rata sedada se intuba por vía oral y se ventila mediante un ventilador controlada por presión con isoflurano al 0,5-1% en oxígeno al 100% a una presión respiratoria máxima de 15 cm H<sub>2</sub>O y una frecuencia respiratoria de 60 respiraciones por minuto. Usando un microscopio de disección, el corazón se expone mediante una toracotomía izquierda y una sutura de seda 7-0 atada alrededor de la porción proximal de la DAI, 1 -2 mm desde la aurícula izquierda. El tórax se llena con solución salina estéril caliente para evacuar el aire y se cierra en capas con una sutura de seda 5-0. Las referencias son ratas que se someten al mismo protocolo de toracotomía sin ligadura de DAI. La técnica se ofrece también para ratón. La expresión de la proteína receptora hRFRP-1 en el corazón de IM seguirá el método utilizado para determinar la expresión en condiciones fisiológicas (descrito anteriormente).

Se prevé que un análogo de hRFRP-1 detectable se una a una proteína de miocitos cardíacos para identificar el receptor. Sobre la base del P.M., pl y la secuencia de aminoácidos, se identificará el receptor; un candidato probable es rfr-2 o una proteína GPCR. La RFRP-1 humana se une a la proteína rfr-2 expresada, un supuesto GPCR. Por lo tanto, el receptor cardíaco hRFRP-1 puede ser rfr-2; sin embargo, será crítico establecer independientemente la identidad del receptor y la estructura de la proteína. Las secuencias de aminoácidos predichas a partir de los ADNC de rfr-2 de rata y humana tienen una longitud de 432 y 430 restos, respectivamente, y comparten una identidad del 86% (Hinuma S. *et al.*, 2000, *Nat. Cell Biol.* 2: 703-708); por lo tanto, es probable que la identificación del receptor RFRP de rata proporcione información significativa sobre el receptor humano.

Un análogo de hRFRP-1 detectable identificará su proteína receptora, y [Bpa3]hRFRP-1 se usará para identificar independientemente la proteína receptora. Ejemplos de análogos detectables son <sup>125</sup>I-Y-hRFRP-1, [Bpa3]hRFRP-1, <sup>3</sup>HY-hRFRP-1; hRFRP-1 marcado con fluorescencia y hRFRP-1 biotinilado.

El solicitante investigará si hay un cambio en la expresión del receptor en respuesta al IM realizado en modelos de MI en ratas y ratones.

#### Métodos alternativos

##### *Identidad de un receptor cardíaco hRFRP-1: receptor cardíaco hRFRP-1 poco abundante.*

Si el receptor es poco abundante, el receptor puede enriquecerse incluyendo una etapa de purificación por afinidad. Los antisueros de hRFRP-1 policlonal del solicitante reconocen análogos unidos a la proteína, que se puede usar para enriquecer el complejo de proteínas ligando-receptor. El análogo no interfiere con la caracterización estructural; la proteína unida a análogos puede liberarse de los antisueros por un cambio en el pH del amortiguador o la sal. Alternativamente, el análogo de hRFRP-1 biotinilado puede ser un ligando de afinidad identificado por avidina para enriquecer una proteína receptora de preparados de membrana. Además, se pueden generar antisueros policlonales para la mancha aislada 2DGE para la caracterización estructural del receptor de alta afinidad.

##### *Identidad de un receptor cardíaco hRFRP-1: receptor polimérico.*

Para el conocimiento del solicitante, hasta la fecha, todos los receptores peptídicos que contienen RFNNH<sub>2</sub>, incluido rfr-2, son proteínas aisladas. Si el receptor cardíaco hRFRP-1 es una proteína polimérica, el método del solicitante identifica la subunidad que une a hRFRP-1 y genera una herramienta molecular para identificar el complejo receptor completo.

##### *Identidad de un receptor cardíaco hRFRP-1: señalización sin GPCR.*

El método del solicitante para identificar un receptor que usa un agonista para etiquetar la proteína es independiente de qué tipo de molécula hRFRP-1 actúa. Las pruebas hasta la fecha sugieren que el receptor de hRFRP-1 será un GPCR, los péptidos que contienen RFNH<sub>2</sub> generalmente ejercen sus acciones a través de un GPCR. Sin embargo, también se identificaron dos receptores ionótrofos para estos péptidos. Ambos son miembros de la familia del canal de Na<sup>+</sup> sensible a la amilorida epitelial y degenerina de canales de iones (véase el examen Lingueglia *et al.* 2006, *Peptides*, 27: 1138-52). El canal de Na<sup>+</sup> regulado por FMRFNF (FaNaC) de invertebrados es regulado directamente por el péptido. Existen pruebas de que los canales iónicos detectores de ácido (ASIC) de mamíferos no están regulados, están modulados por FMRFNF y péptidos relacionados.

*Identidad de un receptor cardíaco hRFRP-1: análogos alternativos.*

Cabe esperar que  $^{125}\text{I}$ -Y-hRFRP-1 se una al receptor porque Y-hRFRP-1 es un agonista de hRFRP-1. Si el análogo yodado no se une, se investigará otro análogo detectable. Sin embargo, no se requiere un análogo radiomarcado o detectable químicamente. Un análogo que se une pero no es detectable química, isotópica o visualmente se puede usar para identificar el receptor, el 2DGE no desnaturalizante distingue entre una proteína unida y no unida por un cambio  $< 0,01$  del punto isoeléctrico (pI). No cabe esperar que una constante de unión de baja afinidad para hRFRP-1 sea un problema porque el péptido se une específica y estrechamente a la proteína rfr-2 expresada; sin embargo, la incorporación de Bpa para unir por enlace covalente el análogo al receptor aborda este problema. 2DGE puede identificar múltiples proteínas marcadas; se realizarán controles ( $^{125}\text{I}$  libre, análogo que compite con hRFRP-1 no marcado, etc.) para ayudar a identificar el fondo, eliminando o identificando así la unión del análogo no específico. Se caracterizarán las proteínas marcadas identificadas como específicas y que tienen tamaños apropiados para ser receptores candidatos.

*Identidad de un receptor cardíaco hRFRP-1: diferenciación de receptores relacionados*

La distinción de un receptor hRFRP-1 de proteínas relacionadas estructuralmente utilizará la separación de proteínas de miocitos en base a múltiples parámetros independientes. La homogeneidad se basa en tres parámetros independientes, P.M., pI y terminal N. Las proteínas relacionadas estructuralmente rfr-2 (P.M. = 48 kDa, pI 9,5) y rfr-1 (P.M. = 60 kDa; pI 9,4 se distinguen) claramente entre sí con las técnicas que el solicitante propone utilizar [Bonini *et al.* 2000; Fukusumi *et al.* 2006].

*Identidad de un receptor cardíaco hRFRP-1*

El solicitante prevé que los antisueros policlonales generados contra el receptor identificado; o si el receptor es rfr-2, los antisueros generados contra rfr-2, se unan a la proteína receptora hRFRP-1 y determinen la expresión. Alternativamente, la unión de  $^3\text{H}$ -Y-hRFRP-1 a los miocitos se utilizará para determinar la expresión de la proteína receptora marcada mediante autorradiografía. El solicitante en primer lugar demostrará que  $^3\text{H}$ -Y-hRFRP-1 es un agonista o antagonista; Y-hRFRP-1 es un agonista. Los controles incluirán competir el péptido marcado con el exceso de péptido no marcado o usar el marcador libre solo. Una alternativa es detectar un complejo péptido-proteína receptora usando antisueros hRFRP-1 marcados con fluorescencia para reconocer hRFRP-1 unida a la proteína receptora. Los controles incluyen antisueros marcados en ausencia de ligando peptídico. Se puede usar marcaje fluorescente directo de hRFRP-1 para detectar la proteína a la que se une el péptido; un control será competir la fluorescencia con hRFRP-1 no marcada.

## Ejemplo B:

Efectos de la hRFRP-1 sobre la contractilidad y la fosforilación mediadas por mecanismo(s) de Ser/Thr cinasas mediante los cuales la hRFRP-1 reduce la función contráctil en los miocitos que implican la fosforilación de proteínas.

El efecto de hRFRP-1 sobre el acortamiento y la relajación del sarcómero se mide en ausencia y presencia de bisindolilmaleimida-1 (bis-1, 500 nM), un inhibidor de la PKC y/o H-89 (1 micromolar), un inhibidor de PKA. Los controles incluyen la medición de la influencia de hRFRP-1 sobre la función cardíaca en ausencia de inhibidor(es) y medición de la función en condiciones experimentales sin péptido en ausencia y presencia de inhibidor(es). La contractilidad en respuesta a un análogo de péptido que contiene RFNH<sub>2</sub>, que no es ni un agonista ni antagonista de hRFRP-1, también se mide en presencia y ausencia de inhibidor(es). Tomados en conjunto, estos datos identificarán una de las principales vías de señalización involucradas en la influencia de hRFRP-1 en la relajación. El solicitante también examinará qué proteínas del ciclo del Ca<sup>2+</sup>/miofilamento se fosforilan en respuesta a la hRFRP-1 aplicada a los miocitos cardíacos aislados de rata, y extienden el trabajo al tejido humano.

La influencia del péptido sobre los miocitos se investigará midiendo los transitorios de Ca<sup>2+</sup> y la generación de fuerza isométrica en los miocitos tratados con péptido. En un grupo de estudios, la influencia de hRFRP-1  $10^{-7}$  –  $10^{-9}$  M se medirá en miocitos cargados con Fura-2AM durante 15 minutos para determinar la influencia de este péptido sobre el transitorio de Ca<sup>2+</sup> celular siguiendo el protocolo de Westfall *et al.* 2005. Otros estudios medirán la generación de fuerza isométrica en miocitos tratados con péptidos que posteriormente se permeabilizan. La fuerza se mide en un intervalo de concentraciones de Ca<sup>2+</sup> y los resultados de este trabajo determinarán si los miofilamentos son un objetivo directo para la señalización de hRFRP-1 y si los efectos sobre el acortamiento en los miocitos con baja carga se traducen en disminuciones comparables en la tensión máxima y la sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> del miofilamento. Cabe esperar que el péptido reduzca significativamente la tensión máxima y aumente la sensibilidad al Ca<sup>2+</sup> del miofilamento en base a los estudios preliminares *in vivo* de los inventores.

*El efecto de los inhibidores de cinasa sobre la influencia de hRFRP-1 en la relajación*

Los miocitos cardíacos de ratas adultas se aíslan en base a protocolos establecidos [Westfall *et al.* 1997, *Meth. Cell Biol*, 52: 307-322; Westfall y Borton 2003]. El acortamiento y la relajación del sarcómero se miden en miocitos para obtener datos de nivel inicial con y sin hRFRP-1 (hRFRP-1  $10^{-8}$  M). A continuación, los medios que contienen un inhibidor de PKC, bis-1, (500 nM) (Green *et al.* 2006 *J. Mol. Cell Cardiol.*, 41: 350-359) o un inhibidor de PKA, H-89 (100 μM) o análogo de PKI (PKI-(Myr-14-22)-amida; 1 μM) (Xiao B. *et al.* 2006), *Biochem. J.* 396: 7-16; Murray A. J. *et al.* 2008, *Sci. Signal* 1: re4) o un inhibidor, tanto de PKC como de PKA se perfunden durante 1 minuto antes de

agregar hRFRP-1, sin péptido o un análogo de péptido que contiene RFNH<sub>2</sub>- que no es ni un agonista ni un antagonista para determinar la influencia de un inhibidor sobre la actividad de hRFRP-1. Además, los controles incluyen medir la función cardíaca en las mismas condiciones sin un inhibidor, sin péptido o un análogo de péptido (RFNH<sub>2</sub>; estructuralmente similar a hRFRP-1, pero no es un agonista ni antagonista de hRFRP-1).

#### 5 Fosfo-detección por análisis de inmunotransferencia Western

Para identificar los objetivos de fosforilación, se recogen miocitos, se analizan para confirmar la actividad de hRFRP-1 y se analiza la expresión de proteínas que se correlaciona con la actividad de cinasa. Los miocitos cardíacos de ratas adultas se raspan de los cubreobjetos en un amortiguador de muestra como se describe [Westfall *et al.* 2005]. Las proteínas se separan por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12% y se transfieren a la membrana de PVDF. La inmunodetección se realiza como se describió anteriormente [Westfall y Borton 2003; Westfall *et al.* 2005].

Los anticuerpos incluyen MAB 1691, un anticuerpo monoclonal que reconoce las isoformas de troponina 1 (Tnl), anticuerpo de sustrato PKA anti-fosfo Ser/Thr (para identificar pesos moleculares de proteínas que muestran cambios en la fosforilación en sitios sensibles a PKA) antifosfo-PKCa/BII, anti-fosfo-PKCδ, anti-fosfo PKC pan, anti-fosfo Tnl, Ser23/24 y antifosfo-PLB. La fosforilación de PLB en Ser16 (sitio dependiente de PKA) y/o Thr 17 (sitio dependiente de CaMK II), y Tnl en el sitio de Ser23/24 (dependiente de PKA y PKC) se detectan como se describió previamente (Braz *et al.* 2004 *Nat. Med.* 10: 248-54; Westfall *et al.* 2005).

#### Actividad de cinasa y estudios de radiomarcaje

También se llevarán a cabo ensayos de actividad PKA y PKC no radiactivos (Assay Designs, Ann. Arbor, MI) para estos estudios determinar si una o ambas cinasas están activadas. En el caso de que Tnl parezca ser un objetivo clave, se llevará a cabo una separación bidimensional de Tnl inmunoprecipitada con MAB 1691, seguida de una identificación por cromatografía líquida para determinar las especies fosfo involucradas. Esta estrategia puede ser necesaria si PKC es la vía de señalización clave, ya que PKC fosforila 5 restos en Tnl (Noland *et al.* 1989 *J. Biol. Chem.* 264: 20778-85). Si se sospecha la fosforilación de otros objetivos potenciales (p. ej., canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L, receptor de rianodina, cadena ligera 2 de miosina, proteína C de unión a miosina, troponina T) El marcaje con <sup>32</sup>P-ortofosfato y la incorporación en los miocitos se medirá en respuesta a hRFRP-1 con y sin H-89 o PKI o bis-1 y la identificación inicial se haría con base en el peso molecular de la proteína. Los anticuerpos anti-fosfo dirigidos contra una proteína específica (cuando esté disponible) y/o la separación bidimensional descrita anteriormente se utilizarían para identificar con mayor precisión los restos fosforilados en cada proteína diana.

Los miocitos recogidos para la detección de la fosforilación se incuban con y sin hRFRP-1 (10<sup>-10</sup> M) y caliculina A, un inhibidor de las proteínas fosfatasa tipos 1 y 2a. Además, se aplica hRFRP-1 con y sin H-89 (100 nM) o inhibidores de PKA análogo de PKI (1 μM) o un inhibidor de PKC, bis-1, (500 nM). Los controles no incluyen un péptido y un análogo de péptido que no sea ni agonista ni antagonista de hRFRP-1. Los tiempos de incubación y las concentraciones siguen los utilizados anteriormente (p. ej., Westfall *et al.*, 2005). En caso de que los estudios sugieran que una fosfatasa es un objetivo potencial e importante, también se realizarán estudios en ausencia de caliculina A.

#### Acortamiento de sarcómero

Se miden los efectos de hRFRP-1, [A11]hRFRP-1 (un antagonista) y [Bpa3]hRFRP-1 que aumenta la función cardíaca. La medición del acortamiento y la relajación del sarcómero en los miocitos cardíacos se detecta utilizando un sistema de detección de IonOptix basado en video como se describe de otra manera en la presente memoria. Los datos promediados de señales se analizan para determinar la longitud del sarcómero en reposo, el acortamiento máximo normalizado para la longitud del sarcómero en reposo (% de altura máxima), el tiempo para el acortamiento máximo (TTP) y el tiempo para 25, 50, 75% de relajación (TTR<sub>25</sub>, TTR<sub>50</sub>, TTR<sub>75</sub>, respectivamente). Los estudios que miden Ca<sup>2+</sup> transitorio usando miocitos cargados con Fura-2AM se controlarán durante 15 min en hRFRP-110<sup>-8</sup> M, [A11]hRFRP-1 o [Bpa3]hRFRP-1; se predice que Bis-1 y/o H-89 inhiben el cambio en el Ca<sup>2+</sup> transitorio en tandem con los efectos sobre acortamiento/relajación. Cabe esperar que la señalización se dirija tanto a los transitorios de Ca<sup>2+</sup> como a miofilamentos para producir la reducción del acortamiento máximo y la relajación más lenta.

#### Mediciones de fuerza isométrica

Se medirá el efecto de hRFRP-1 y sus agonistas y antagonistas en el desarrollo de la fuerza. Se realizarán mediciones de la fuerza isométrica según los protocolos en el laboratorio de Westfall (Westfall *et al.* 1997 *Methods Cell Biol.*, 52: 307-22; Westfall *et al.* 2005). Los miocitos cardíacos de rata aislados se tratan con hRFRP-1, [A11]hRFRP-1, y/o [Bpa3]hRFRP-1 para estudiar los efectos del péptido, el bloqueo del receptor y el análogo que aumenta la función cardíaca. Se analizan un intervalo de concentraciones. Un miocito intacto se trata durante 15 minutos, después de lo cual se une al motor y al transductor de fuerza. Posteriormente, se agrega caliculina A inhibidor de fosfatasa y la célula se permeabiliza. La fuerza se medirá sobre pCa 9,0 a 4,5; luego se desfosforila con fosfatasa alcalina y la curva fuerza/pCa se repite para garantizar que la fuerza máxima no descienda por debajo del 80% del máximo original. Un propósito de estos estudios es evaluar si los miofilamentos son objetivos clave de los efectos de hRFRP-1 y los análogos de hRFRP-1.

### Cinasas Ser/Thr alternativas

La respuesta rápida y dramática a hRFRP-1 sugiere que este péptido actúa por influencias directas en las proteínas diana en lugar de modulación mediante control de la transcripción. Por lo tanto, los métodos alternativos incluyen investigar la influencia de otras cinasas o moléculas que se sabe que están involucradas en la disfunción cardíaca en la actividad de hRFRP-1. Otras cinasas podrían incluir la cinasa Rho que influye en la sensibilidad del calcio del miofilamento para prolongar la relajación en el corazón debilitado [Vahebi *et al.* 2005 *Circ. Res.* 96: 740-747; Lin *et al.* 2007 *Cardiovasc. Res.* 75: 51-58]. Otras alternativas podrían incluir CaMK II y su papel en la focalización del fosfolambán, MAPK que tiene como objetivo la actividad de la fosfatasa y la actividad de calcineurina, así como la posibilidad de que otras proteínas fosfatasas estén directamente dirigidas.

### 10 Otras cascadas de señalización

Aunque está previsto que la principal vía de señalización implica la activación de las Ser/Thr cinasas, sigue siendo posible que otras cascadas de señalización también contribuyan a la respuesta funcional en los miocitos. Las posibles cascadas de señalización podrían incluir otras cinasas, p. ej., las cinasas Rho, CaMK II y MAPK. La electroforesis bidimensional y/o la reacción en cadena de la polimerasa analizan más ampliamente los cambios moleculares dentro de los miocitos tras la aplicación de hRFRP-1. La carga de proteínas se normaliza utilizando proteínas de una porción teñida con plata del gel de poli(acrilamida). [Green *et al.* 2006 *J. Mol. Cell Cardiol.* 41: 350-359].

### Alternativa al inhibidor químico

El péptido inhibidor de la proteína cinasa (PKI) es una molécula endógena que regula la actividad de PKA; es una alternativa a H89. Los análogos de PKI están disponibles en el mercado (Sigma, Torcis Bioscience y EMB Biosciences). Un efecto de la PKI sobre la actividad de hRFRP-1 es la prueba indirecta de una función para la PKA, respectivamente. La investigación de las funciones para PKC o PKA o ambas combina métodos farmacológicos y moleculares utilizando interferencia por ARN (ARNi) o un mutante no funcional de PKC (o PKA) para demostrar la importancia de esta cascada de señalización en la respuesta funcional.

### 25 Ejemplo C: Efectos *in vivo* sobre el corazón.

Se reconoce que la función contráctil reducida y la fosforilación observada en respuesta a hRFRP-1 en miocitos aislados se traducen en un patrón similar de contractilidad reducida y fosforilación, más disfunción sistólica y/o diastólica *in vivo*.

La administración intravenosa de hRFRP-1  $10^{-8}$  M a través de la vena de la cola de ratones condujo a insuficiencia cardíaca; y se investigaron las respuestas cardíacas que requieren fosforilación de proteínas involucradas en el acoplamiento de excitación-contracción.

Los estudios de respuesta a la dosis de hRFRP-1 proporcionan una comprensión del intervalo de concentraciones que afectan la función cardíaca *in vivo*. El solicitante investigará el efecto del antagonista, p. ej., [A11]hRFRP-1, solo, y su influencia sobre los efectos de hRFRP-1 y en [Bpa3]hRFRP-1 *in vivo*. Se determinará si los agonistas inversos, p. ej., el análogo [Bpa<sub>3</sub>]hRFRP-1, aumenta la función cardíaca y contrarresta los efectos de la insuficiencia cardíaca provocada por hRFRP-1 y los efectos de hRFRP-1 y [Bpa3]hRFRP-1 en el estrés cardíaco.

El solicitante controlará las moléculas diana para la fosforilación *in vivo* en respuesta a hRFRP-1 en el corazón de ratón, y en respuesta al análogo de hRFRP-1 que aumenta la función cardíaca. También se explorarán los efectos de hRFRP-1 solo y los antagonistas, p. ej., LPLAF amida y [A11]hRFRP-1 en presencia y ausencia de hRFRP-1, y agonistas inversos, p. ej. [Bpa<sub>3</sub>]hRFRP-1 sobre la función cardíaca *in vivo* bajo estresores cardíacos, incluido el infarto de miocardio. La ecocardiografía se realizará como se describe en esta memoria.

Una primera serie de estudios incluyó hRFRP-1  $10^{-8}$  M (n = 3) y solución salina (n = 3). Según los resultados, un análisis de potencia indica que se logrará un nivel de confianza del 95% para los datos a n = 4.  $10^{-8}$  análogos se incluirá en las inyecciones; sin embargo, las concentraciones pueden variar debido a las condiciones de unión o la degradación. Se explorarán los efectos de los análogos de hRFRP-1 y la competencia entre el péptido original, hRFRP-1 y los análogos sobre los parámetros cardíacos incluidos FC, LVD, VS, FE% y GC. Además, se explorarán los efectos de hRFRP-1 y análogos en la función cardíaca *in vivo* en respuesta a un infarto de miocardio por factor estresante cardíaco debido al modelo de ligadura de la arteria coronaria descendiente anterior izquierda (LAD).

Para identificar los componentes moleculares de la vía de señalización *in vivo*, el solicitante analizará el tejido cardíaco mediante transferencia Western e inmunohistoquímica, y la reacción en cadena de la polimerasa para determinar si hay algún cambio en la expresión del receptor hRFRP-1 y en respuesta a un factor estresante cardíaco, MI. Además, los corazones se pueden aislar y procesar para realizar un ensayo de "retrofosforilación" como se describe (Michele *et al.* 2002 *Circ. Res.* 91: 255-262). Se puede utilizar PKC y/o PKA para retrofosforilar.

### Métodos alternativos

Algunos análogos pueden ser más sensibles a la degradación cuando se administran por vía intravenosa. Los tiempos de vida de los péptidos, una medida de degradación, en la hemolinfa, se pueden comparar al comprobar la presencia de uno o más análogos detectables, incluido un "marcador" en un análogo. Los métodos alternativos incluirían la incorporación de D-aminoácidos, que normalmente son menos sensibles a la degradación que los L-

aminoácidos, en el péptido o análogo, o al incluir inhibidores de proteasa con el inyectante (una referencia es inhibidor de proteasa solo).

#### Procedimientos experimentales

5 Frecuencia cardíaca de *Drosophila melanogaster* - Moscas de la cepa natural Oregon R de *D. melanogaster* se mantuvieron en medios de melaza de harina de maíz a 24°C en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los animales seleccionados para el análisis fueron larvas, prepupas o adultos; se analizaron tanto hembras como machos y no se observaron diferencias en la respuesta. Se colocó un animal en una cinta adhesiva doble adherida a una platina de microscopio y se controló la frecuencia cardíaca durante 2 minutos antes y 10 minutos después de administrar solución salina (referencia) o péptido como se describió anteriormente (Nichols, R. *et al.* (1999), Zornik, E. *et al.* (1999)). Se utilizó una micropipeta alargada para administrar solución salina o péptido (40  $\eta$ l) en la hemolinfa (sangre) en un sitio anterior al cerebro para evitar daños en los tejidos del sistema nervioso central y el vaso sanguíneo dorsal (aorta y corazón). Cada animal recibió solo una microinyección de solución salina o péptido. En algunos casos, las grabaciones se prolongaron hasta 1 hora para establecer el retorno a los valores iniciales. Se promediaron datos de varios animales ( $n \geq 10$ ) y se presentaron en relación con la frecuencia cardíaca inicial.

15 *Aislamiento de miocitos y medición del acortamiento de la longitud del sarcómero en miocitos aislados* - Se aislaron miocitos cardíacos ventriculares de rata y conejo adultos como se describió anteriormente (Westfall, M. V. *et al.* (1997), Westfall, M. V. y Borton, A. R. (2003)). Corazones de ratas Sprague-Dawley y conejos blancos de Nueva Zelanda se perfundieron y se digirieron enzimáticamente para aislar miocitos; el protocolo fue aprobado por el Committee on Use and Care of Animals de la Universidad de Michigan (UCUCA) según las normativas universitarias y federales. Partes alícuotas de miocitos ventriculares aislados se colocaron en portaobjetos de vidrio recubiertos con laminina en medio Eagle modificados con Dulbecco (Invitrogen, CA, EE. UU.) enriquecido con 5% de suero fetal bovino, y 50 U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de estreptomina (penic/estrep; Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.). Dos horas después, el medio se sustituyó por M199 exento de suero (Invitrogen) enriquecido con  $Ca^{2+}$  1,8 mM, HEPES 10 mM, glutatión 10 mM y penic/estrep. Los miocitos de rata se transfirieron a una cámara de estimulación y se estimularon eléctricamente el día después del aislamiento (Zomik, E. *et al.* (1999), Westfall, M. V. *et al.* (1997)). Los medios se cambiaron diariamente para todos los preparados de miocitos.

Se detectó acortamiento del sarcómero utilizando un sistema de detección basado en video (IonOptix, MA, EE. UU.) como se describió anteriormente (Westfall, M. V. y Borton, A. R. (2003)). Se estimularon miocitos de rata a 0,2 Hz y se estimularon miocitos de conejo a 0,5 Hz o 1,0 Hz para estos estudios. Los registros se realizaron antes de la aplicación de cada concentración de péptido, el inhibidor de la proteína cinasa C (PKC) bisindolilmaleimida-1, (bis-1; CalBiochem/EMD, NJ, EE. UU.), o solo en el medio (referencia, C) y en 1, 3, 5, 10 y 15 minutos después de la aplicación del péptido, bis-1 o medio. Los datos promediados de la señal se analizaron para determinar la longitud del sarcómero en reposo, la amplitud de acortamiento (acortamiento máximo), la tasa de acortamiento (velocidad de salida) y la tasa de realargamiento (velocidad de retorno), como se describió anteriormente (Westfall, M. V. *et al.* (1997), Westfall, M. V. y Borton, A. R. (2003)), en 7-20 miocitos de 3-4 ratas para cada concentración de péptido, bis-1 y medios.

35 Síntesis de péptidos - Se sintetizaron péptidos por el protocolo Fmoc convencional. Las estructuras, TDVDHVFLRFamida (DMS) (SEQ ID NO: 1), MPHSAANLPLRFamida (hRFRP-1) (SEQ ID NO: 2), VPHSAANLPLRFamida, (RFRP-1 de rata; rRFRP-1) (SEQ ID NO: 16); LAEELSSYSRRKGGFSFRFamida (26RFa (8-26)) (SEQ ID NO: 31); y KGGFSFRFamida (26RFa (19-26)) (SEQ ID NO: 32) se confirmaron mediante análisis de aminoácidos y espectrometría de masas.

45 *Análisis de fosforilación de proteínas de miocitos en respuesta a hRFRP-1* - Se cargaron miocitos cardíacos de conejo aislados con 100  $\mu$ Ci de  $^{32}P$ -ortofosfato durante 1 hora a 37°C en medio M199 enriquecido con penicilina/estreptomina. El medio radiactivo se reemplazó por medio no marcado que contenía el inhibidor de la fosfatasa, calcicolina A (10  $\eta$ M; Sigma-Aldrich) solo o además de hRFRP-1  $10^{-10}$  M durante 15 minutos a 37°C. La reacción de fosforilación se terminó enjuagando brevemente los cubreobjetos en una solución relajante enfriada con hielo (RS: EDTA 7 mM, imidazol 20 mM, pH 7,0,  $Mg^{2+}$  libre 1 mM, fosfato de creatina 14,5 mM y MgATP 4 mM con suficiente KCl para producir una fuerza iónica de 180 mM, pH 7,0), seguido de RS enfriado con hielo + 0,1% de Triton X-100 seguido de varios enjuagues en RS solo enfriado con hielo. Las células se recogieron en un amortiguador de la muestra y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se detectaron mediante tinción con plata como se describió anteriormente (Westfall, M. V., Lee, A. M. y Robinson, D. A. (2005)). La fosforilación se cuantificó utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.) después de exposición de geles secos a una casete de radioiluminografía.

55 *Ecocardiografía* - Se realizaron ecocardiogramas como se describió anteriormente (Boluyt, M. O. *et al.* (2004)) según las recomendaciones de la American Society of Echocardiography. Todas las ecocardiografías se realizaron con un ecocardiógrafo registrado. Se pesaron ratones C57BL/6 hembra para calcular con precisión la cantidad de péptido administrado por kilogramo de peso corporal (kg p. c.). El uso de animales para ecocardiografía fue aprobado por la Universidad de Michigan UCUCA según las normativas universitarias y federales. La solución salina fisiológica o el péptido se administraron por vía intravenosa mediante inyecciones en la vena de la cola hasta un volumen total de 60 150  $\mu$ l para conseguir 5  $\mu$ moles o 500  $\eta$ moles de hRFRP-1/kg de peso corporal. Cada animal se usó solo una vez para una inyección, ya sea solución salina fisiológica o péptido ( $n = 4-5$ ). En resumen, se colocó un ratón en una cámara de inducción y se sedó ligeramente con isoflurano al 4% mezclado con oxígeno al 100%, luego se colocó en

posición supina en una plataforma calentada con almohadillas de contacto para electrocardiogramas (VEVO™ mouse handling platform; VisualSonics, ON, CA), y su nariz se colocó en un cono con isoflurano al 1% en oxígeno al 100%. Se obtuvieron grabaciones de amplitud y cantidad de movimiento (modo M) guiadas en dos dimensiones de alta resolución con un cabezal de escaneo de microvisualización de 30 MHz en tiempo real, RMV™ 707B, interconectado a un sistema de microdiagnóstico por la imagen Vevo 770™ *in vivo* (VisualSonics). La frecuencia cardíaca junto con las dimensiones sistólica final y diastólica final del ventrículo izquierdo se midieron a partir de las exploraciones del sector bidimensional obtenidas del eje paraesternal largo y las vistas apicales de cuatro cámaras usando las convenciones de la American Society of Echocardiography. Para cada medición en modo M, se tomaron muestras de al menos tres ciclos cardíacos consecutivos. Los volúmenes del ventrículo izquierdo se midieron al final de la sístole ( $Vol_s$ ) y al final de la diástole ( $Vol_d$ ) y se usó para calcular el volumen sistólico ( $VS = Vol_d - Vol_s$ ) y la fracción de expulsión ( $FE\% = VS \text{ endocárdico} / Vol_d \text{ endocárdico} \times 100$ ). Se calculó el gasto cardíaco ( $GC = \text{frecuencia cardíaca} \times VS$ ) a partir del volumen sistólico y la frecuencia cardíaca.

*Análisis estadístico* - Todos los valores publicados se expresan como media  $\pm$  error típico de la media (SEM). Los datos se analizaron utilizando un análisis de varianza de 1 vía (ANOVA) y se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett como prueba *post hoc*; la significancia estadística se estableció a un valor de  $p < 0,05$ . Los valores de concentración eficaz media máxima ( $EC_{50}$ ) se calcularon a partir de las curvas más aptas utilizando el programa estadístico Microsoft Excel XP o GraphPad Prism 3.0 (GraphPad, CA, EE. UU.).

Ejemplo 1:

Efectos cardiovasculares de DMS (péptido con Dromiosupresina):

*DMS disminuye la frecuencia cardíaca de D. melanogaster.* La influencia del DMS (péptido con dromiosupresina; TDVDHVFLRFamida - SEQ ID NO: 1) sobre la frecuencia cardíaca *in vivo* en *D. melanogaster* se comparó con la solución salina fisiológica para evaluar los efectos en función de la dosis de miosupresina en la función cardíaca en un modelo adaptable a la genética molecular. La miosupresina de *Drosophila melanogaster* disminuyó drásticamente la frecuencia *in vivo* de las contracciones espontáneas del corazón de pupas en función de la dosis (Fig. 1). Los efectos dependientes de la dosis de dromiosupresina publicados se evaluaron en pupas porque los animales están inmóviles y, por lo tanto, esta fase de desarrollo es la más fácil de observar y registrar las contracciones del corazón. Los efectos de DMS se midieron en un intervalo de concentraciones de diez veces desde  $10^{-6}$  M hasta  $10^{-11}$  M y en comparación con la influencia de la solución salina fisiológica (media  $\pm$  SEM;  $91 \pm 3\%$  de tasa de contracción inicial a 1 minuto;  $n = 18$ ). El efecto máximo de DMS  $10^{-10}$  M subnanomolar (Fig. 1) se observó en 1 minuto y la frecuencia cardíaca disminuyó a  $77 \pm 4\%$  de la tasa de contracción inicial ( $n = 16$ ), aunque la reducción de la frecuencia cardíaca no fue estadísticamente diferente de la respuesta de control de la solución salina ( $p > 0,05$ ). Se detectaron reducciones significativas en la frecuencia cardíaca en respuesta a concentraciones de DMS de  $10^{-9}$  M y mayores, y las respuestas máximas se observaron en 1 minuto de la microinyección del péptido. Los efectos provocados por DMS se observaron normalmente durante 2-3 minutos, y fueron reversibles, volviendo a niveles iniciales de la tasa de contracción en aproximadamente 5 minutos en respuesta a  $10^{-8}$  M y  $10^{-9}$  M. A las concentraciones más altas analizadas,  $10^{-6}$  M y  $10^{-7}$  M, DMS redujo la frecuencia cardíaca a  $25 \pm 11\%$  ( $n = 14$ ) y  $25 \pm 7\%$  ( $n = 16$ ), respectivamente, en 1 minuto. Los efectos provocados por DMS se mantuvieron durante 3-5 minutos antes de que volvieran a niveles aproximadamente iniciales de la tasa de contracción en 30 minutos. El valor de  $EC_{50}$  más apto fue  $3 \times 10^{-9}$  M.

Un intervalo similar de concentraciones de DMS produjo respuestas menos robustas pero significativas en las contracciones del corazón en larvas y en adultos; los efectos del DMS en la frecuencia cardíaca variaron en amplitud y fueron más complejos con la edad (datos no mostrados). Los resultados demuestran una respuesta cardíaca dependiente de la dosis a concentraciones nanomolares de DMS, lo que sugiere que este péptido activa una vía de señalización con gran afinidad.

El análisis adicional de análogos de alanina sustituidos individualmente y análogos de DMS truncados en el extremo N identificaron la actividad de DMS y los núcleos de unión, un antagonista de DMS y análogos de DMS con los efectos opuestos de DMS (un agonista inverso). En estos análisis, el núcleo de actividad para el efecto de DMS en el corazón de la mosca se identificó como VDHVFLRFamida (SEQ ID NO: 33), con el fin de lograr una actividad similar al péptido DMS original; según lo determinado por una o más mediciones de contractilidad. En estos análisis, el núcleo de unión se identificó como FLRFamida. El núcleo de unión es un antagonista de DMS. Los análogos de DMS sustituidos con alanilo [A5]DMS (es decir, TDVDAVFLRFamida - SEQ ID NO: 34) y [A6]DMS (es decir, TDVDHAFLRFamida SEQ ID NO: 35) aumenta la frecuencia cardíaca, el efecto opuesto de DMS, el péptido original (TDVDHVFLRFamida - SEQ ID NO: 1). En experimentos adicionales en vuelo, se determinó que los péptidos truncados AFLRFamida (SEQ ID NO: 21) o VFLRFamida (SEQ ID NO: 25) son capaces no solo de unirse, sino de ejercer un efecto sobre la contractilidad cardíaca. En otras palabras, ambos péptidos truncados son cada uno individualmente capaces de unirse y la actividad cuando se administran *in vivo*. En este sentido, el ejercicio de uno o más efectos sobre la contractilidad se puede determinar al evaluar la frecuencia de la contractilidad, la amplitud de la contractilidad, la fracción de expulsión y el gasto cardíaco.

Con el fin de determinar el efecto de DMS sobre el paro cardíaco en un invertebrado superior, se aplicaron varias concentraciones de DMS a *Protophormia terraenovae* intacta, un moscardón y se registraron electrocardiogramas continuamente [Angioy *et al.* 2007]. DMS a  $10 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  y  $0,1 \text{ nM}$  se observó paro cardíaco en el 100% de los animales ( $n = 10$  en cada concentración); a concentraciones más bajas se observó paro cardíaco en ~50% de los



animales. Reanudada la señal en animales; el tiempo de recuperación se acortó a concentraciones más bajas de DMS. La solución salina no produjo paro cardíaco (n = 10).

*DMS se expresa en el cerebro y el corazón.* Se generaron antiseros contra TDVDHV (SEQ ID NO: 36), la parte N terminal de DMS, pero no incluyeron la RFamida C-terminal (RF-NH<sub>2</sub>); una estructura presente en otros péptidos que contienen RFNH<sub>2</sub>. Se utilizaron tinciones con antiseros específicos de péptidos para demostrar la distribución espacial y temporal de DMS [McCormick y Nichols 1993]. DMS está presente en el SNC durante todo el desarrollo. La expresión comienza tarde en el embrión y continúa a lo largo del desarrollo hasta el adulto. En general, las células producen DMS en el desarrollo inicial y en todas las fases de la vida del animal. Aunque relativamente pocas células producen DMS, se aporta a través de una extensa red arborizada de procesos a muchos objetivos dentro del cerebro. La síntesis y liberación de DMS puede estar bajo un amplio aporte reglamentario y sensorial.

Las fibras inmunorreactivas a DMS se proyectan desde el cerebro para inervar el corazón. Los datos del solicitante indican que el péptido se sintetiza en el cerebro y se envía al corazón. Los procesos inmunorreactivos de DMS se proyectan desde las neuronas del protocerebro superior en el cerebro para inervar la región anterior del vaso dorsal, la aorta y el corazón (flecha derecha), una región que contiene un marcapasos cardíaco. Los procesos están presentes en todas las fases de desarrollo [McCormick y Nichols 1993]. La presencia de DMS en todo el desarrollo en una región del corazón de *D. melanogaster* que contiene un marcapasos y la actividad de DMS apoya la hipótesis de los inventores de que el DMS neural desempeña una función o funciones importante(s) en la fisiología cardiovascular.

*Agonistas de DMS:* El análisis SAR adicional del solicitante para la actividad de DMS en el corazón de la mosca muestra que los aminoácidos V6, F7 y F10 (en referencia a los aminoácidos en las posiciones correspondientes en el péptido DMS original: TDVDHVFLRFamida (SEQ ID NO: 1) son esenciales para la actividad y la unión en base al análisis de análogos sustituidos en alanilo y truncados en el extremo N-terminal. Utilizando estos datos, el solicitante diseñó Y-[Bpa2]DMS, un análogo de DMS detectable con un reticulador fotoactivable p-benzoil-fenilalanina, Bpa [Shoelson *et al.* 1993] y tirosilo, Y, un sitio marcador (EC<sub>50</sub> = 1,3x10<sup>-10</sup> M; figura 8). El solicitante usó este análogo que contiene Bpa para identificar un receptor de DMS [Egerod *et al.* 2003]; en primer lugar, se confirmó que el análogo sustituido era un agonista de DMS (véase la figura 8). Los datos obtenidos con este análogo de Y se utilizaron para producir un análogo similar para experimentos con miocitos de mamíferos. Y-[Bpa2]DMS se refiere al péptido modificado: YT(Bpa)VDHVFLRFamida (SEQ ID NO: 37).

Es decir, con referencia al péptido original: TDVDHVFLRFamida (SEQ ID NO: 1), el segundo aminoácido (D) se sustituye por Bpa, y se agrega un resto de tirosilo N-terminal del primer aminoácido (T).

Ejemplo 2:

La RFRP-1 humana produce efectos dependientes de la dosis sobre la función contráctil de miocitos cardíacos de rata.

La influencia de hRFRP-1 en la función cardíaca se midió en miocitos cardíacos aislados de rata adulta para probar la hipótesis del solicitante de que este FaRP de vertebrado es un péptido similar a la miosupresina en mamíferos. Alteraciones agudas dependientes de la dosis en el acortamiento se midieron durante 15 minutos en respuesta a hRFRP-1 10<sup>-6</sup> M a 10<sup>-11</sup> M en miocitos aislados de rata adulta. El péptido RFRP-1 humano disminuyó dramáticamente la amplitud de acortamiento, y las tasas de acortamiento y realargamiento en los miocitos cardíacos aislados (Fig. 2B; Tabla 1). No hubo efecto significativo de hRFRP-1 10<sup>-11</sup> M en comparación con la referencia, y la longitud en reposo se mantuvo inalterada a todas las concentraciones de péptidos. Se detectaron reducciones significativas en las tasas de acortamiento y realargamiento en respuesta a concentraciones de hRFRP-1 10<sup>-10</sup> M y mayores (Fig. 2B; Tabla 1). Un aumento de diez veces, hRFRP-1 10<sup>-9</sup> M, y mayor se requirió para detectar reducciones significativas en la amplitud de acortamiento (Fig. 2B; Tabla 1). Los valores de EC<sub>50</sub> mejor ajustados fueron 5x10<sup>-11</sup> M, 5x10<sup>-11</sup> M, y 5x 10<sup>-10</sup> M para tasas de acortamiento y realargamiento, y acortamiento de la amplitud, respectivamente. Estos resultados demuestran que hRFRP-1 modula de forma aguda la función contráctil a nivel celular actuando directamente sobre los miocitos cardíacos de mamíferos, y sigue una dependencia de la dosis similar observada en la respuesta cronótropa de *D. melanogaster* a DMS.

Tabla 1: La influencia de hRFRP-1 en la función contráctil de miocitos cardíacos de rata adulta durante 15 minutos (\* indica significación estadística de la referencia,  $p < 0,05$ ).

| log[ ]     |    | % de cambio (media $\pm$ SEM) |                            |                          |                            |
|------------|----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| hRFRP-1    | n  | SL inicial ( $\mu\text{m}$ )  | v sal. ( $\mu\text{m/s}$ ) | h máx. ( $\mu\text{m}$ ) | v ret. ( $\mu\text{m/s}$ ) |
| -6         | 10 | $0,3 \pm 0,3$                 | $-35,2 \pm 3,8^*$          | $-31,2 \pm 4,4^*$        | $-29,7 \pm 5,4^*$          |
| -7         | 18 | $-0,3 \pm 0,2$                | $-28,2 \pm 4,6^*$          | $-27,9 \pm 4,9^*$        | $-31,0 \pm 4,6^*$          |
| -8         | 14 | $-0,01 \pm 0,2$               | $-27,7 \pm 3,5^*$          | $-26,6 \pm 2,9^*$        | $-30,1 \pm 3,2^*$          |
| -9         | 10 | $0,3 \pm 0,1$                 | $-29,5 \pm 7,9^*$          | $-26,8 \pm 7,4^*$        | $-31,7 \pm 6,2^*$          |
| -10        | 7  | $-0,06 \pm 0,2$               | $-23,1 \pm 4,3^*$          | $-9,6 \pm 2,7$           | $-21,8 \pm 2,9^*$          |
| -11        | 10 | $-0,2 \pm 0,2$                | $-14,7 \pm 5,2$            | $-6,3 \pm 4,7$           | $-11,2 \pm 4,5$            |
| Referencia | 20 | $-0,1 \pm 0,1$                | $-4,0 \pm 4,5$             | $-10,3 \pm 3,4$          | $-8,7 \pm 4,6$             |

Ejemplo 3:

5 RFRP-1 de rata imita la influencia de hRFRP-1 en miocitos cardíacos de rata contráctiles.

RFRP-1 de rata (VPHSAANLPLRFamida - SEQ ID NO: 16) difiere de hRFRP-1 (MPHSFANLPLRFamida - SEQ ID NO: 2) en dos aminoácidos en la ampliación del aminoácido N-terminal; M1  $\rightarrow$  V 1 y F5  $\rightarrow$  A5 (Tabla 2). La influencia de rRFRP-1  $10^{-8}$  M se comparó con hRFRP-1  $10^{-8}$  M y la referencia (media solo) en miocitos cardíacos de ratas adultas aislados (Fig. 3; Tabla 3) para comenzar una investigación de la especificidad de estructura de RFRP-1 en función contráctil. El péptido RFRP-1 de rata disminuyó la amplitud de acortamiento y las tasas de acortamiento y alargamiento ( $-17,7 \pm 4,3\%$ ,  $-22,1 \pm 6,0\%$ ,  $-25,5 \pm 3,9\%$ , respectivamente;  $n = 12$ ) sin cambios significativos en la longitud del sarcómero en reposo. Por lo tanto, se observaron cambios similares en las tasas de acortamiento y re-alargamiento con rRFRP-1  $10^{-8}$  M y hRFRP-1  $10^{-8}$  M. Sin embargo, el mayor efecto de hRFRP-1  $10^{-8}$  M sobre la amplitud de acortamiento en comparación con rRFRP-1  $10^{-8}$  M y las diferencias de aminoácidos entre los dos péptidos en la magnitud de hRFRP-1 frente a los efectos de rRFRP-1 en el acortamiento de la amplitud sugieren que las diferencias de estructura de las extensiones N-terminales de estos dos péptidos pueden proporcionar pistas importantes sobre la especificidad de estructura involucrada en la unión del ligando y la futura caracterización de uno o más receptores de RFRP-1.

20 Tabla 2: Estructuras peptídicas de RFamida comparadas; los aminoácidos y la modificación tras la traducción conservados estrictamente entre los péptidos RFRP-1 están en negrita (SEQ ID NO: 14, n°: 2, n°: 16, n°: 39 y n°: 32, respectivamente).

|                          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |                       |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|
| RFRP-1 bovina            |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | <b>M</b> | <b>P</b> | <b>P</b> | <b>S</b> | <b>F</b> | <b>A</b> | <b>N</b> | <b>L</b> | <b>P</b> | <b>L</b> | <b>R</b> | <b>F</b> | <b>NH<sub>2</sub></b> |
| RFRP-1 humana            |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | <b>M</b> | <b>P</b> | <b>H</b> | <b>S</b> | <b>F</b> | <b>A</b> | <b>N</b> | <b>L</b> | <b>P</b> | <b>L</b> | <b>R</b> | <b>F</b> | <b>NH<sub>2</sub></b> |
| RFRP-1 de rata           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | <b>V</b> | <b>P</b> | <b>H</b> | <b>S</b> | <b>A</b> | <b>A</b> | <b>N</b> | <b>L</b> | <b>P</b> | <b>L</b> | <b>R</b> | <b>F</b> | <b>NH<sub>2</sub></b> |
| 26RFa de rata<br>(8-26)  | <b>L</b> | <b>A</b> | <b>E</b> | <b>E</b> | <b>L</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>Y</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>K</b> | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>F</b> | <b>S</b> | <b>F</b> | <b>R</b> | <b>F</b> |          |          |          | <b>NH<sub>2</sub></b> |
| 26RFa de rata<br>(19-26) |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          | <b>K</b> | <b>G</b> | <b>G</b> | <b>F</b> | <b>S</b> | <b>F</b> | <b>R</b> | <b>F</b> |          | <b>NH<sub>2</sub></b> |

Tabla 3: La influencia de rFRP-1 en la función contráctil del miocitos cardíacos de rata adulta durante 15 minutos (\* indica significación estadística de la referencia, p <0,05).

|                            |    | % de cambio (media ± SEM) |               |              |               |
|----------------------------|----|---------------------------|---------------|--------------|---------------|
|                            | n  | SL inicial (µm)           | v sal. (µm/s) | h máx. (µm)  | v ret. (µm/s) |
| hRFRP-1 10 <sup>-8</sup> M | 14 | -0,01 ± 0,2               | -27,7 ± 3,5*  | -26,6 ± 2,9* | -30,1 ± 3,2*  |
| rRFRP-1 10 <sup>-8</sup> M | 12 | -0,3 ± 0,1                | -22,1 ± 6,0*  | -17,7 ± 4,3  | -25,5 ± 3,9*  |
| Referencia                 | 20 | -0,1 ± 0,1                | -4,0 ± 4,5    | -10,3 ± 3,4  | -8,7 ± 4,6    |

Ejemplo 4:

- 5 Los FaRP, 26RFa de vertebrados no imitan la influencia de RFRP-1 sobre la función contráctil de miocitos cardíacos de rata

Se investigó más la especificidad de la estructura de RFRP-1 utilizando 26RFa en miocitos cardíacos aislados de ratas adultas. El péptido 26RFa de rata es un FaRP y, por lo tanto, contiene un terminal C de RFamida idéntico al RFRP-1; sin embargo, no hay similitud en la estructura o longitud de la ampliación del terminal N de 26RFa en comparación con RFRP-1. Se midieron los efectos de 26RFa 10<sup>-8</sup> M (8-26) (LAEELSSYSRRKGGFSRFamida - SEQ ID NO: 31) y 26RFa 10<sup>-8</sup> M (19-26) (KGGFSRFamida - SEQ ID NO: 32) en miocitos aislados de ratas cardíacas (Fig. 4; Tabla 4). Las disminuciones en la amplitud de acortamiento y las tasas de acortamiento y realargamiento en respuesta a 26RFa 10<sup>-8</sup> (S-26) y 26RFa 10<sup>-8</sup>M (19-26) fueron modestas, y todas fueron estadísticamente diferentes de hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M (Fig. 4; Tabla 4; p < 0,05). Las respuestas a los péptidos 26RFa no fueron estadísticamente diferentes de la referencia (Fig. 4; Tabla 4). Estos resultados proporcionan pruebas directas de que la ampliación del terminal N presente en RFRP-1 se necesita por sus influencias sobre la función contráctil cardíaca. En otras palabras, la RFamida del terminal C estrictamente conservada, presente en todos los miembros de la superfamilia FaRP, incluidos los péptidos 26RFa, no es suficiente para provocar la respuesta producida por la RFRP-1 en la función de los miocitos cardíacos de los mamíferos. Estos resultados demuestran que los péptidos 26RFa no provocan una respuesta similar a RFRP-1 en los miocitos cardíacos; sin embargo, no demuestran si los péptidos 26RFa se unen al receptor RFRP-1.

Tabla 4: La influencia de los péptidos 26RFa en la función contráctil de miocitos cardíacos de rata adulta durante 15 minutos (\* indica significación estadística de la referencia, p <0,05).

|                                |    | % de cambio (media ± SEM) |               |              |              |
|--------------------------------|----|---------------------------|---------------|--------------|--------------|
|                                | n  | SL inicial (µm)           | v sal. (µm/s) | h máx. (µm)  | v ret.       |
| hRFRP-1 10 <sup>-8</sup> M     | 14 | -0,01 ± 0,2               | -27,7 ± 3,5*  | -26,6 ± 2,9* | -30,1 ± 3,2* |
| 26RFa(8-26)10 <sup>-8</sup> M  | 17 | -0,04 ± 0,1               | -6,0 ± 4,4    | -4,3 ± 5,7   | -7,3 ± 6,3   |
| 26RFa(19-26)10 <sup>-8</sup> M | 20 | -0,4 ± 0,2                | -5,3 ± 5,6    | -7,7 ± 4,8   | -8,1 ± 5,0   |
| Referencia                     | 20 | -0,1 ± 0,1                | -4,0 ± 4,5    | -10,3 ± 3,4  | -8,7 ± 4,6   |

25 Ejemplo 5:

La inyección intravenosa de hRFRP-1 por la vena de la cola de ratón provocó una disfunción cardíaca *in vivo*

Se investigó el efecto *in vivo* de hRFRP-1 en ratones. Se utilizó ecocardiografía (ECHO) para evaluar el efecto de hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M (n = 3) y la referencia (solución salina; n = 3) sobre la función cardíaca mediante la inyección en la vena de la cola; seis crías hembra de la misma camada C57BL/6, ~ 20 gramos y ~ 4 semanas de edad. Se realizaron estudios a ciegas, las inyecciones en la vena de la cola fueron realizadas por un técnico de laboratorio de animales registrado. Las mediciones de ECHO fueron realizadas por un ecocardiólogo registrado. Los datos son porcentajes de cambios en los parámetros t = 10 minutos después de la inyección en comparación con el valor a t = 0 minutos, antes de la inyección (figura 14). Los datos demuestran una reducción drástica en los latidos por minuto de la frecuencia cardíaca (FC, lpm) en respuesta a hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M (100 µl de hRFRP-1 10<sup>-7</sup>M inyectado). El área endocárdica sistólica (LVD) presentaba una respuesta drástica y opuesta, hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M (+ 36%) frente a la solución salina (-31%). Además, el volumen sistólico endocárdico (VS) difirió, hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M (-75%) frente a solución salina (+22%). La fracción de expulsión endocárdica (FE%) presentaba una respuesta drástica, hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M (-60%) en comparación con la solución salina (+25%). Un resultado interesante es que, en respuesta a hRFRP-110<sup>-8</sup> M, los valores de FE son indicativos de insuficiencia cardíaca; caen por debajo del 50%. El gasto cardíaco (GC) también presentaba una respuesta drástica y opuesta, hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M (- 91%) en comparación con la solución salina (+9%). Las imágenes en modo M ilustran los efectos de hRFRP-1; se reduce la contractilidad; 10 minutos después de la inyección, la función cardíaca no se recuperó en marcado contraste con la inyección posterior de solución salina donde se produjo una recuperación sustancial. El análisis de potencia de estos datos indica un nivel de confianza del 95% a n = 4.

El RFRP-1 humano produce efectos cardiodepresores en el ratón. La influencia de hRFRP-1 en la función cardiovascular *in vivo* se estudió más a fondo para determinar si se observan respuestas celulares e integradas similares en los mamíferos. Se midió la función cardíaca por ecocardiografía después de la administración de péptidos o solución salina (referencia) mediante inyecciones intravenosas en la vena de la cola en ratones. Registros representativos en modo M bidimensionales (Fig. 5) demuestran que la función cardíaca disminuyó en respuesta a 5  $\mu\text{mol/kg}$  de peso corporal de hRFRP-1 en comparación con la referencia. A ambas concentraciones (5  $\mu\text{mol}$  y 500  $\eta\text{mol/kg}$  de peso corporal), hRFRP-1 produjo un efecto máximo a los 5 minutos después de la inyección con una recuperación parcial de la función cardíaca en 15 minutos. La dosis más alta de hRFRP-1 produjo efectos agudos y dramáticos en la función cardiovascular (n = 5; Fig. 5 A antes de la inyección; Fig. 5B, 5 minutos después de la inyección; Tabla 5) en comparación con las modestas variaciones observadas en el grupo de control de solución salina (n = 4; Fig. 5C preinyección Fig. 5D 5 minutos después de la inyección; Tabla 5). Curiosamente, no hubo efecto cronótrópico negativo de la dosis más baja de hRFRP-1 (500  $\eta\text{mol/kg}$  de peso corporal), y aunque esta dosis disminuyó significativamente el volumen sistólico, la fracción de expulsión y el gasto cardíaco, la magnitud relativa se atenuó en comparación con la dosis más alta. (Tabla 5). Estos datos *in vivo* son coherentes con un efecto directo dependiente de la dosis sobre el miocardio según la influencia de hRFRP-1 observada en miocitos cardíacos aislados de rata.

Tabla 5: Evaluación ecocardiográfica de la función cardiovascular de ratón en respuesta a hRFRP-1 a los 5 minutos (\* indica significación estadística de la referencia, p <0,05).

|  | % de cambio (media $\pm$ SEM) |                |                 |               |
|--|-------------------------------|----------------|-----------------|---------------|
|  | FC                            | VS             | FE %            | GC            |
| Solución salina                        | -17 $\pm$ 6%                  | 17 $\pm$ 3%    | 32% $\pm$ 3%    | -20 $\pm$ 2%  |
| 500 $\eta\text{mol/kg}$ p.c. de RFRP-1 | -25 $\pm$ 2%                  | -28 $\pm$ 10%* | -33% $\pm$ 10%* | -44 $\pm$ 9%* |
| 5 $\mu\text{mol/kg}$ p.c. de hRFRP-1   | -54 $\pm$ 7%*                 | -57 $\pm$ 9%*  | -49% $\pm$ 8%*  | -79 $\pm$ 7%* |

Los análisis ecocardiográficos en ratones de hRFRP-1, hRFRP-1 y LPLAFamida, LPLAFamida sola y D-H3-hRFRP-1 mediante inyecciones en la vena de la cola demostraron que los efectos *in vivo* eran coherentes con las observaciones previas cuando los agentes se aplicaron a miocitos cardíacos aislados de ratas y conejos. Para hacer las evaluaciones se utilizaron parámetros ecocardiográficos incluidos la frecuencia cardíaca (FC), el volumen sistólico (VS), la fracción de expulsión (FE), la válvula mitral (VM) las ondas E y A, sus amplitudes y relación (E/A) y el gasto cardíaco (GC).

Por ejemplo, la disminución drástica en el rendimiento contráctil mostrada como resultado de la aplicación de hRFRP-1 a células aisladas y a animales completos fue bloqueada *in vivo* por LPLAFamida, un pentapéptido hRFRP-1 del terminal C previamente presentado que bloquea los efectos de hRFRP-1 en células aisladas. La LPLAFamida aplicada sola se demostró que presenta un ligero aumento de la función cardíaca *in vivo*, lo que puede deberse a un bloqueo de los efectos de hRFRP-1 endógena. Además, D-H3-hRFRP-1, que el solicitante demostró anteriormente que es un agonista inverso de hRFRP-1 en miocitos cardíacos aislados de rata, demostró un aumento en la función cardíaca *in vivo* medido por parámetros ecocardiográficos.

Ejemplo 6:

Fosforilación de proteínas en respuesta a hRFRP-1 en miocitos cardíacos aislados de rata.

Está publicado que el RFRP-1 humano se une a la proteína rfr-2 expresada, un supuesto GPCR; ningún artículo describe la fosforilación de la molécula diana en respuesta a la unión de hRFRP-1. La activación de la proteína cinasa es una vía importante involucrada en la modulación de la función contráctil cardíaca. Se fosforilan varias proteínas objetivo finales involucradas en el acoplamiento de excitación-contracción en respuesta a la activación de PKC y/o PKA, incluidas las proteínas del miofilamento troponina I cardíaca (cTnI), troponina T cardíaca (TnT) y la cadena ligera 2 de miosina (MLC<sub>2</sub>). Los datos del solicitante son coherentes con la fosforilación de proteínas del miofilamento, p. ej., cTnI, TnT, MLC<sub>2</sub>, en respuesta a hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M en miocitos cardíacos de rata (figura 13); siguiendo el protocolo descrito en Westfall *et al.* 2003.

Los resultados demostraron que PKI, un inhibidor de la proteína cinasa A, (PKA) modifica la actividad de hRFRP-1 en miocitos cardíacos ventriculares aislados.

Efectos de RFRP-1 humano sobre la función contráctil de miocitos cardíacos de rata en presencia de bis-1, un inhibidor de PKC.

Para iniciar estudios de los mecanismos implicados en la influencia de hRFRP-1 en la función cardíaca, se utilizó el inhibidor bis-1 de PKC. Se midió el efecto del inhibidor bis-1 de PKC (500  $\eta\text{M}$ ) sobre la influencia de hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M sobre el acortamiento y la relajación en miocitos cardíacos aislados de ratas adultas durante 15 minutos (Fig. 6, Tabla 6). El inhibidor bis-1 de PKC bloqueó en gran medida la influencia de hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M sobre la amplitud de acortamiento y las tasas de acortamiento y realargamiento (-0,58  $\pm$  4,8%, - 12,3  $\pm$  4,6%, -5,6  $\pm$  4,7%, respectivamente; n = 23) sin cambios significativos en la longitud del sarcómero en reposo. El efecto de bis-1 sobre la actividad de hRFRP-1 fue estadísticamente diferente del péptido en ausencia del inhibidor de PKC. Estos

resultados proporcionan pruebas directas para respaldar la conclusión de que el RFRP-1 modula de forma aguda la función contráctil por activación de la vía de señalización de PKC.

Tabla 6: La influencia de hRFRP-1 en presencia de Bis-1 en la función contráctil de miocitos cardíacos de rata adulta durante 15 minutos (\* indica significación estadística de la referencia,  $p < 0,05$ ).

|                                  | n  | % de cambio (media $\pm$ SEM) |                            |                          |                  |
|----------------------------------|----|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------|
|                                  |    | SL inicial ( $\mu\text{m}$ )  | v sal. ( $\mu\text{m/s}$ ) | h máx. ( $\mu\text{m}$ ) | v ret.           |
| hRFRP-1 $10^{-8}\text{M}$        | 14 | -0,01 $\pm$ 0,2               | -27,7 $\pm$ 3,5*           | -26,6 $\pm$ 2,9*         | -30,1 $\pm$ 3,2* |
| Bis-1; hRFRP-1 $10^{-8}\text{M}$ | 23 | -0,52 $\pm$ 0,2               | -12,3 $\pm$ 4,6            | 0,58 $\pm$ 4,8           | -5,6 $\pm$ 4,7   |
| Referencia                       | 20 | -0,1 $\pm$ 0,1                | -4,0 $\pm$ 4,5             | -10,3 $\pm$ 3,4          | -8,7 $\pm$ 4,6   |

5

Ejemplo 7:

El RFRP-1 humano atenúa la función contráctil de miocitos cardíacos de conejo.

Para evaluar además los efectos del péptido RFRP-1 sobre la función cardíaca, se utilizaron miocitos cardíacos de conejo. El RFRP-1 humano se examinó en miocitos cardíacos de conejo adulto aislados debido a su similitud en la frecuencia cardíaca en comparación con la de los seres humanos. Curiosamente, las concentraciones subnanomolares de hRFRP-1 redujeron significativamente la función cardíaca de los mamíferos. En comparación con la media solamente (referencia), hRFRP-1  $10^{-10}$  M redujo drásticamente la amplitud de acortamiento y las tasas de realargamiento en miocitos cardíacos de conejo adulto aislados (Fig. 7 A y 7B). La tasa de acortamiento también disminuyó en respuesta a  $1 \text{ Cf }^{10}\text{M}$  hRFRP-1; sin embargo, no fue significativo en los miocitos estudiados. Las grabaciones se realizaron a 0,5 Hz (Fig. 7A y 7B) y a 1 Hz (resultados no mostrados) para evaluar tanto el acortamiento como la posibilidad de iniciar contracciones arrítmicas. Los latidos arrítmicos y las contracciones posteriores no se observaron en respuesta a hRFRP-1 a ninguna frecuencia de estimulación. Además, el radiomarcaje de proteínas de miocitos aumentó significativamente en respuesta a hRFRP-1 (Fig. 7C). Específicamente, se observó un aumento de  $4,0 \pm 1,4$  veces en la fosforilación por encima del valor inicial para la banda detectada a 24 kDa. La radioluminografía ilustra un aumento reproducible en la fosforilación de múltiples proteínas en respuesta a hRFRP-1. La disminución en la fosforilación en respuesta a hRFRP-1 en presencia de bis-1 es coherente con el péptido que activa una PKC (datos no mostrados). En conjunto, los resultados funcionales y de fosforilación demuestran que las concentraciones fisiológicamente relevantes de hRFRP-1 disminuyeron drásticamente la función contráctil en los miocitos cardíacos tanto de rata como de conejo, lo que concuerda con RFRP-1 que es un ortólogo de DMS y sugiere que hRFRP-1 puede desempeñar una función directa en la modulación de la función cardíaca de mamíferos. Estos resultados sugieren que RFRP-1 es una molécula de señalización endógena cuyos efectos están mediados por la fosforilación de las proteínas de miocitos por PKC.

En otra serie de estudios, el solicitante observó además que a concentraciones subpicomolares hRFRP-1 modula la función cardíaca de los mamíferos. Se aplicó hRFRP-1  $10^{-10}$  M a miocitos cardíacos de conejo aislados siguiendo el método de Westfall *et al.* 2005; el péptido disminuyó la amplitud de acortamiento del sarcómero y desaceleró la relajación. El efecto de hRFRP-1  $10^{-10}$  M ( $n = 20$ ) fue estadísticamente diferente de una referencia, sin péptido, solo media ( $n = 12$ ) para el acortamiento máximo, la velocidad de retorno y el tiempo desde el máximo hasta el 50% de realargamiento (50% de TTR). La longitud de reposo y el tiempo hasta el máximo (50% de TTP) no fueron significativamente diferentes,  $p < 0,05$  (\*) se consideró significativamente diferente de la referencia (Figura 17).

Ejemplo 8:

Y-hRFRP-1, análogo prolongado de tirosil N-terminal es un agonista de hRFRP-1.

El solicitante sintetizó Y-hRFRP-1 (el péptido: YMPHSFANLPLRFamida - SEQ ID NO: 40) y determinó que es un agonista de hRFRP-1 en miocitos cardíacos de ratas aislados (Figura 9A). Un análogo de tirosilo prolongado es una herramienta molecular importante para generar una "etiqueta" detectable para un receptor e investigar sus requisitos de tratamiento, expresión y unión al ligando. Un grupo tirosilo (Y) puede ser marcado de forma detectable, por ejemplo, ser yodado, tritiado o biotinilado para generar un agonista detectable; hRFRP-1 no contiene un Y evitando así la adición interna de un grupo voluminoso que puede inhibir el enlace péptido-receptor.

Ejemplo 9:

Un análogo estructural de hRFRP-1, [Bpa<sub>3</sub>]hRFRP-1, tiene los efectos opuestos de hRFRP-1 sobre la función cardíaca - Descubrimiento de un agonista inverso que aumenta la función cardíaca contráctil.

[Bpa<sub>3</sub>]hRFRP-1, un análogo estructural de hRFRP-1 (el péptido modificado: MP(Bpa)SFANLPLRFamida - SEQ ID NO: 41), tiene los efectos opuestos de hRFRP-1; aumenta la función cardíaca (figura 9B). La estructura de [Bpa<sub>3</sub>]hRFRP-1 corresponde a la del péptido original MPHSFANLPLRFamida (SEQ ID NO: 2), excepto que el tercer aminoácido (histidina) se reemplaza por p-benzoil-fenilalanina (Bpa). Bpa es un derivado de fenilalanina (Phe; F) y un reticulante fotoactivable. Estos datos se confirmaron a partir de las imágenes de datos de ECHO que demostraron que D-H3 HRFRP-1 también aumenta la función cardíaca. Otra confirmación de la actividad de D-H3

50

hRFRP-1 se demostró por análisis ecocardiográfico de los parámetros cardíacos cuando este análogo se administró mediante una inyección en la vena de la cola, tras lo cual se observó que la función cardíaca mejoraba.

Este descubrimiento es estimulante porque sugiere que los mecanismos relacionados con hRFRP-1, un péptido de origen natural, pueden dirigirse para aumentar la función cardíaca para contrarrestar la insuficiencia cardíaca. Este descubrimiento no solo identifica un análogo que aumenta la función cardíaca, sino que el análogo también puede estar reticulado covalentemente a su receptor para identificar la proteína receptora. Por lo tanto, la invención abarca métodos para identificar el (los) receptor(es) que une(n) hRFRP-1 y [Bpa3]hRFRP-1. La identificación del receptor o receptores que une(n) hRFRP-1 y [Bpa3]hRFRP-1 puede usarse además para caracterizar mecanismos relacionados con la disminución y el aumento de la función cardíaca, respectivamente. Los análogos de hRFRP-1 que contienen Bpa con Bpa en diferentes posiciones dentro de hRFRP-1 se pueden utilizar para producir otros agonistas y antagonistas valiosos.

Ejemplo 10: Una exploración con alanina identifica restos críticos para el efecto de hRFRP-1 en el acortamiento y la relajación del sarcómero.

El alto grado de identidad de la secuencia de RFRP-1 a través de las especies (Tabla 7) junto con sus efectos dramáticos sobre la función cardíaca y su presencia en el tronco encefálico, sugiere que es fisiológicamente importante. Los péptidos probablemente contienen la estructura requerida para la unión y para la activación de la señalización. Las estructuras de estos núcleos de unión y activación proporcionan datos importantes para diseñar agonistas y antagonistas. El solicitante analizó la contribución a la actividad de la cadena lateral de cada aminoácido en hRFRP-1 mediante el intercambio individual sistemático de cada resto en el péptido con L-alanina [Beck-Sickinger *et al.* 1993; Doherty *et al.* 1993].

Tabla 7: Secuencias peptídicas de RFRP-1.

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                 |               |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----------------|---------------|
| Humano  | M | P | H | S | F | A | N | L | P | L | R | F | NH <sub>2</sub> | SEQ ID n°: 2  |
| Bovino  | M | P | P | S | F | A | N | L | P | L | R | F | NH <sub>2</sub> | SEQ ID n°: 14 |
| Pollo   | V | P | N | S | V | A | N | L | P | L | R | F | NH <sub>2</sub> | SEQ ID n°: 15 |
| Ratón   | V | P | H | S | A | A | N | L | P | L | R | F | NH <sub>2</sub> | SEQ ID n°: 16 |
| Rata    | V | P | H | S | A | A | N | L | P | L | R | F | NH <sub>2</sub> | SEQ ID n°: 16 |
| Hámster | V | P | H | S | A | A | N | L | P | L | R | F | NH <sub>2</sub> | SEQ ID n°: 16 |
| Oveja   | M | P | P | S | A | A | N | L | P | L | R | F | NH <sub>2</sub> | SEQ ID n°: 17 |
| Rana    | S | L | K | P | A | A | N | L | P | L | R | F | NH <sub>2</sub> | SEQ ID n°: 18 |

Los datos de secuencias y estructuras son de Dardente *et al.* 2008 y referencias en la cita;

Ubaka T. *et al.* (2009) *PLoS One* 4 (22): e8400; páginas 1-7.

Se realizó una exploración con alanina para identificar restos críticos para la activación del receptor. El solicitante sintetizó un conjunto de análogos en los que se reemplazó cada aminoácido, individualmente excepto el resto de aminoácido n° 6, A, que se reemplazará por G. El solicitante probó el efecto de los análogos en miocitos cardíacos de rata aislados (figura 10; n = 20 ). Los análogos de alanina [A1]hRFRP-1, [A5]hRFRP-1, [A7]hRFRP-1, [A9]hRFRP-1 y [A11]hRFRP-1 eran significativamente diferentes en acortamiento máximo (h máx.) y relajación (v ret.) del péptido original no sustituido, hRFRP-1. La sustitución de R<sub>11</sub> → A fue drásticamente diferente de hRFRP-1 y similar a la referencia. Se realiza una exploración analógica truncada para identificar agonistas y antagonistas de hRFRP-1 adicionales.

Las denominaciones [A1]hRFRP-1, [A5]hRFRP-1, [A7]hRFRP-1, [A9]hRFRP-1, y [A11]hRFRP-1 corresponden al péptido hRFRP-1 original (MPHSFANLPLRFamida - SEQ ID NO: 2), donde el primero, quinto, 7º, 9º, o el 11º aminoácido se sustituye, respectivamente, por un resto alanilo (A); y los 11 aminoácidos restantes en cada uno de los cinco péptidos son los mismos que el péptido original. Por ejemplo, [A1]hRFRP-1 designa el péptido: APHSFANLPLRFamida (SEQ ID NO: 42); y [A7]hRFRP-1 designa el péptido: MPHSFAALPLRFamida (SEQ ID NO: 43); y así sucesivamente.

Ejemplo 11:

El análogo que contiene alanina [A11]hRFRP-1 es un antagonista de hRFRP-1.

Los análogos inactivos identificados en la exploración de alanina del solicitante pueden ser antagonistas de hRFRP-1, que bloquean la unión de hRFRP-1, pero no activan la señalización. Para identificar un antagonista funcional, el solicitante probó hRFRP-1 en miocitos aislados en presencia de un análogo inactivo. Los efectos de hRFRP-1 en presencia de [A11]hRFRP-1 se compararon con hRFRP-1 solo y con [A11]hRFRP-1 solo. Los efectos de hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M se redujeron drásticamente en presencia de [A11]hRFRP-1 10<sup>-7</sup> M en comparación con hRFRP-1 10<sup>-8</sup> M solo (figura 11).

La identificación de un antagonista de hRFRP-1 *in vivo* es una potente herramienta molecular para atenuar la función de hRFRP-1. Además, los antagonistas son importantes para delinear el enlace ligando-receptor y la activación de la vía de señalización. Se analizarán otros análogos inactivos para identificar más antagonistas. En otros experimentos, el péptido LPLAFamida se identificó como un antagonista de hRFRP-1 (figura 18). Los datos ecocardiográficos demostraron que LPLAFamida bloqueó los efectos de hRFRP-1, y LPLAFamida sola mejora la función cardíaca.

Ejemplo 12:

El antagonista de hRFRP-1, [A11]hRFRP-1, bloquea los efectos de [Bpa3]hRFRP-1.

Con el fin de obtener información sobre el receptor al que se une [Bpa3]hRFRP-1, el solicitante determinó sus efectos en presencia de [A11]hRFRP-1, un análogo de hRFRP-1 inactivo sustituido con alanilo, que no afecta la función cardíaca cuando se administra solo a miocitos cardíacos. [A11]hRFRP-1 atenúa los efectos de hRFRP-1 (figura 11), lo que sugiere que es un antagonista de hRFRP-1. [A11]hRFRP-1 también disminuye los efectos de [Bpa3]hRFRP-1 (figura 12), lo que puede interpretarse que sugiere que [A11]hRFRP-1 es un antagonista de [Bpa3]hRFRP-1. Estos datos también son coherentes con la unión de [Bpa3]hRFRP-1 y hRFRP-1 al mismo receptor.

Ejemplo 13:

Péptidos hRFRP-1 truncados

Se examinaron los efectos de los péptidos de referencia (solo medias), hRFRP-1 y hRFRP-1 truncados sobre la velocidad de salida, la altura máxima y la velocidad de retorno en miocitos cardíacos aislados de rata adulta (figuras 15). El tetrapéptido PQRfamida se examinó de manera similar (figura 16). El protocolo experimental fue como se describió anteriormente. Todos los péptidos se administraron a una concentración de  $10^{-8}$  M. En la figura 15 se utiliza el siguiente convenio para indicar cada truncamiento:

- hRFRP-1 describe el péptido: MPHFSANLPLRFamida (SEQ ID NO: 2),
- [2-12]hRFRP-1 describe el péptido: PHSF ANLPLRFamida (SEQ ID NO: 4),
- [3-12]hRFRP-1 describe el péptido: HSFANLPLRFamida (SEQ ID NO: 44),
- [4-12]hRFRP-1 describe el péptido: SFANLPLRFamida (SEQ ID NO: 45),
- [5-12]hRFRP-1 describe el péptido: FANLPLRFamida (SEQ ID NO: 46),
- [6-12]hRFRP-1 describe el péptido: ANLPLRFamida (SEQ ID NO: 47),
- [7-12]hRFRP-1 describe el péptido: NLPLRFamida (SEQ ID NO: 48),
- [8-12]hRFRP-1 describe el péptido: LPLRFamida (SEQ ID NO: 3),
- [9-12]hRFRP-1 describe el péptido: PLRFamida,
- [10-12]hRFRP-1 describe el péptido: LRFamida,

En estos conjuntos de experimentos, los péptidos LPLRFamida (SEQ ID NO: 3), FANLPLRFamida (SEQ ID NO: 46) y PQRfamida demostraron la capacidad para unirse y afectar la función contráctil de los miocitos cuando se administran individualmente a los miocitos; y, de una manera similar al péptido hRFRP-1 original.

Cualquiera de los péptidos truncados descritos en este ejemplo se analiza para determinar su capacidad para modular la función cardíaca *in vivo* (p. ej., mediante inyección en la vena de la cola del ratón, como se describe en esta memoria); y/o por su capacidad para afectar el enlace o la actividad de hRFRP-1 en miocitos aislados usando protocolos experimentales similares a los descritos en los ejemplos 11 y 12 o la proteína receptora expresada. Por lo tanto, puede probarse fácilmente cualquiera de los péptidos truncados inactivos como un antagonista de hRFRP-1 experimental *in vivo* o *in vitro*.

Los péptidos influyen en la disfunción cardíaca; sin embargo, la modulación peptidérgica del funcionamiento contráctil permanece relativamente sin caracterizar. En esta memoria el solicitante identificó un péptido humano que modula el funcionamiento contráctil de los mamíferos. Los miembros de la familia de péptidos relacionados con la FMRfamida (FaRP) contienen una RFamida C-terminal pero con extensiones N-terminales estructuralmente variantes. Los ejemplos expuestos anteriormente demuestran que la dromiosupresina (DMS), un FaRP de vertebrados, modula directamente la función cardíaca de *Drosophila melanogaster* en función de la dosis *in vivo*. Los péptidos-1 relacionados con la RFamida humana ortólogos de DMS (hRFRP-1) y RFRP-1 de rata disminuyeron de forma rápida y reversible el acortamiento y la relajación en miocitos cardíacos de mamíferos aislados en función de la dosis. Estos efectos funcionales coincidieron con un aumento de la fosforilación de proteínas de las proteínas de miocitos. El inhibidor de la proteína cinasa C (PKC) bisindolilmaleimida-1 bloqueó la actividad hRFRP-1. Además, la inyección intravenosa de hRFRP-1 en ratones produjo efectos cardiodepresivos al disminuir la frecuencia cardíaca, el volumen sistólico, la fracción de expulsión y el gasto cardíaco. En conjunto, estos descubrimientos sugieren que el RFRP-1 es una molécula de señalización cardíaca endógena que activa la PKC. La especificidad y los requisitos estructurales de RFRP-1 se demostraron utilizando FaRP, 26RFa, de mamífero relacionados con RFRP-1 solo por una RFamida; 26RFa no alteró la función contráctil de miocitos. En conjunto, el

descubrimiento de estos efectos cronótrópos, inótrópos y lusitropos negativos de hRFRP-1 es significativo; muestran respuestas directas agudas a nivel celular y de órganos en el corazón de los mamíferos. Este descubrimiento es la primera identificación de un FaRP con dramáticos efectos cardio-depresivos en mamíferos, y proporciona un área nueva en el campo de la modulación peptidérgica de funcionamiento contráctil.

5 Los ejemplos expuestos anteriormente demuestran las acciones cardíacas específicas de los ortólogos de miosupresina FaRP tanto de invertebrados como de mamíferos. Los efectos cardíacos dependientes de la dosis se encuentran a nivel del sistema orgánico tanto en invertebrados (Fig. 1) como en mamíferos (Fig. 5) y a nivel celular utilizando dos modelos de mamíferos y dos ortólogos de mamíferos (Figs. 2-4, 6, 7). Estas respuestas cardíacas se desarrollaron en un intervalo de concentración que cabría esperar si se libera un péptido como modulador neurohormonal de la función cardiovascular. La consistencia de los efectos cardiodepresivos en múltiples modelos de mamíferos y con los dos ortólogos de mamíferos sugiere que este grupo de péptidos desempeña una función conservada funcionalmente en la modulación del funcionamiento cardíaco. Estudios con los péptidos 26RFa (Fig. 4) demuestran que el terminal C de la RFamida conservado de la familia FaRP no es suficiente para producir esta respuesta. Más bien, para la actividad del RFRP-1 endógeno de vertebrados, se requiere la ampliación de aminoácido N-terminal frecuente en RFRP-1 de vertebrados. En general, los resultados expuestos en los ejemplos anteriores demuestran que la familia del péptido miosupresina es una nueva vía para modular la función cardíaca. El solicitante ha descubierto ahora los efectos de estos ortólogos de mamíferos muy conservados sobre la fisiología cardiovascular de los mamíferos. Los ortólogos de mamíferos incluyen los descritos en Ubuka *et al.* 2009, Fukusumi *et al.* 2001, Hinuma *et al.* 2000 y Lin *et al.* 2001.

20 Los miembros de un subgrupo FaRP generalmente tienen actividades funcionales similares, pero son diferentes de otros subgrupos dentro de la superfamilia RFamida. El presente estudio indica las acciones del subgrupo LRFamida que actúan como cardiodepresores tanto en invertebrados (Fig. 1) como en mamíferos (Figs. 2-4, 6, 7). La conservación de las actividades indica que las LRFamidas probablemente actúan mediante un mecanismo común dentro del corazón. Recientemente, se informó que otro FaRP de vertebrados, 26RFa aumenta la frecuencia cardíaca y la presión arterial en ratas (Fang *et al.*, 2009). Como se indicó anteriormente, los estudios descritos en este documento no muestran efectos significativos de este FaRP en el acortamiento o relajación de miocitos cardíacos aislados (Fig. 5). La respuesta específica de la estructura, de alta afinidad al RFRP-1 de mamíferos es compatible con un nuevo receptor peptidérgico, lo más probable unido a una o más vías de señalización celular. Además, la respuesta funcional sustancial al RFRP-1 nanomolar (Figs. 2-4, 7) es coherente con una vía que utiliza un receptor de alta afinidad. La identidad del receptor cardíaco RFRP-1 y los mecanismos de señalización molecular aún no se conocen. Sin embargo, otros FaRP pueden actuar a través de receptores acoplados a la proteína G (Liu, Q. *et al.* (2001), Fukusumi, S. *et al.* (2001), LJKena, K., y Tsutsui, K. (2001)).

35 Los resultados expuestos en los ejemplos en la presente memoria también demuestran algunas diferencias en los efectos funcionales de RFRP en miocitos cardíacos de mamíferos aislados en comparación con la función cardíaca en el ratón intacto (Figs. 2-4, 6, 7 frente a Fig. 5). La profunda disminución de la frecuencia cardíaca no se reflejó en las alteraciones del ritmo detectadas en los miocitos aislados. Esta diferencia puede deberse a efectos en los objetivos neuronales presentes en los estudios *in vivo*. Si bien no se detectaron alteraciones del ritmo a frecuencias de estimulación que oscilan entre 0,2 y 1 Hz en los estudios de miocitos aislados de 0,2, 0,5 y 1 Hz, sigue siendo posible que este aspecto de la respuesta no sea evidente a las frecuencias de estimulación más bajas utilizadas para los estudios funcionales en miocitos aislados. La disminución provocada por hRFRP-1 en la función sistólica observada *in vivo* es coherente con la respuesta celular, una indicación de que el efecto *in vivo* se debe, al menos en parte, a una supresión directa de la función contráctil de los miocitos cardíacos. Sin embargo, la ralentización de la relajación observada en miocitos adultos aislados no se detectó *in vivo*. Esta ralentización del realargamiento *in vitro* y la falta de cambio en el funcionamiento diastólico *in vivo* pueden reflejar la variabilidad en la evaluación no invasiva del funcionamiento diastólico, la detección atenuada debida a cambios en la función relacionados con la velocidad (Dias F. A. *et al.*, *J. Mol. Cell Cardiol.* 41: 330; 2006) y/o la influencia de factores como la carga y las respuestas compensatorias dentro de un modelo animal completo.

50 Los resultados presentes también están en contraste con trabajos anteriores que usan ortólogos de invertebrados en modelos de mamíferos. Ortólogos aviares o invertebrados (Mues *et al.*, (1982); Barnard, C. S., y Dockray, G. J. (1984), Dockray, G. J. *et al.* (1983)) supuestamente producen hipertensión, que no fue evidente en todo el registro de 15 minutos (Fig. 5). Los ortólogos de invertebrados y aves pueden tener diferencias estructurales que conducen a múltiples acciones en la función cardiovascular de los mamíferos en comparación con la hRFRP-1, cuando se administran a modelos de mamíferos. Alternativamente, las respuestas divergentes pueden deberse a diferencias de protocolo. Los estudios iniciales utilizaron mediciones invasivas de la presión arterial en contraste con el análisis ecocardiográfico no invasivo utilizado en esta memoria. Estos FaRP de invertebrados, heterólogos no endógenos pueden dirigirse a diferentes órganos y/o vías celulares cuando se administran a modelos animales de mamíferos.

60 Las neurohormonas desempeñan una función crítica en la modulación de la función cardíaca en condiciones fisiológicas, así como patofisiológicas agudas y crónicas. Aunque la señalización  $\beta$ -adrenérgica se ha estudiado intensivamente en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (Fang, Q. *et al.* (2009)), otras vías de señalización mediadas neuronalmente pueden desempeñar una función importante en la regulación de la función cardíaca (Brodde D. E. (1996); Lymperop A. *et al.* (2007)). De particular interés son las pequeñas moléculas de señalización peptidérgica con propiedades cardiorreguladoras. Los estudios descritos en este documento identifican acciones cardíacas específicas de un péptido de invertebrado conocido y demuestran que un nuevo ortólogo de mamífero que



pertenece a la misma familia de péptidos produce un efecto depresivo muy específico y dramático en los miocitos cardíacos de mamíferos y en el funcionamiento cardíaco *in vivo*. El presente trabajo describe la respuesta cardíaca sustancial y coherente a un nuevo FaRP de mamíferos, que proporciona un objetivo para diagnósticos y/o tratamientos terapéuticos. La información futura en la síntesis, liberación y señalización de hRFRP-1 es útil para el desarrollo de estrategias terapéuticas para prevenir o atenuar la disfunción cardíaca.

Ejemplo 13:

Identificación de un receptor RFRP-1

Se aisló ARNm de NPFFR2 a partir de miocitos ventriculares cardíacos de rata aislados y se generó ADNc. Se secuenció el ADNc (SEQ ID NO: 49; secuencia de aminoácidos - SEQ ID NO: 50) que demostró que el transcrito de NPFFR2 está presente en el corazón de rata. NPFFR2 es un receptor al que RFRP-1 se une *in vitro* según estudios de unión que utilizan la proteína receptora expresada. Los datos demostraron y argumentaron la presencia de una vía de señalización de RFRP-1 que actúa a través del supuesto receptor acoplado de proteína G (GPCR) que está presente en los miocitos cardíacos aislados.

El ARNm de NPFFR2 también se aisló de tejido ventricular cardíaco humano, a partir del cual se generó y secuenció un ADNc (SEQ ID NO: 51; secuencia de aminoácidos - SEQ ID NO: 52) para crear el transcrito de NPFFR2 presente en el corazón humano. Estos datos demostraron además y argumentaron la presencia de una vía de señalización RFRP-1 que actúa a través del supuesto GPCR que está presente en miocitos cardíacos aislados.

Ejemplo 14:

Evaluación de vías de señalización.

La amplificación del ARNm de 26RFa a partir de miocitos ventriculares cardíacos de rata no tuvo éxito, aunque se aisló un ADNc de 26RFa (SEQ ID NO: 53; secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 54) a partir de ARNm cerebral (una referencia para demostrar que los cebadores de PGR fueron capaces de amplificar el transcrito de 26RFa en el cerebro pero no en los miocitos), proporcionando así más pruebas de que la RFRP-1 es la molécula de señalización de la RFamida natural que se encuentra presente en los miocitos ventriculares.

La amplificación del ARNm de GPR103 (supuesto receptor 26RFa) de miocitos ventriculares cardíacos de rata aislados también fue infructuosa, aunque un ADNc de GPR103 de ARNm del cerebro de rata (SEQ ID NO: 55; secuencia de aminoácidos - SEQ ID NO: 56) (una referencia para demostrar que los cebadores de PGR eran capaces de amplificar el transcrito de GPR103 en el cerebro pero no en los miocitos, se generó así proporcionando más pruebas de que el RFRP-1 es la molécula de señalización de la RFamida natural presente en los miocitos ventriculares.

La amplificación del ARNm de NPFFR1 (supuesto receptor de NPFF) de miocitos ventriculares cardíacos de rata aislados fue infructuosa, pero se generó ADNc de NPFFR1 de ARNm cerebral (SEQ ID NO: 57; secuencia de aminoácidos 58), (una referencia para demostrar los cebadores de PCR eran capaces de amplificar el transcrito de NPFFR1 en el cerebro pero no en los miocitos), proporcionando así más pruebas de que RFRP-1 es la molécula de señalización de RFamida natural presente en los miocitos ventriculares y la señalización mediante NPFFR2.

Ejemplo 15:

Antisueros de hRFRP-1

Los antisueros, tanto monoclonales como policlonales, son reactivos probados para diagnosticar y tratar enfermedades. Los antisueros monoclonales (es decir, anticuerpos o antisueros) tienen determinadas ventajas sobre los policlonales, p. ej., la producción en masa es más barata y la especificidad es para un epítipo peptidérgico, aunque los antisueros policlonales, que reconocen múltiples epítopos, pueden ser ventajosos en el diagnóstico, especialmente si una forma estructural anómala de hRFRP-1 desconocida previamente, existe en un paciente, es probable que la avidéz y la detección de la forma variante sean mayores cuando se usa un antisuero policlonal que un anticuerpo monoclonal.

Como agente de diagnóstico, el antisuero específico para hRFRP-1 identifica la sobreexpresión o la expresión insuficiente del péptido o identifica una estructura de hRFRP-1 anómala y, por lo tanto, identifica a un paciente en situación de riesgo de enfermedad cardiovascular. Por consiguiente, los métodos de la descripción incluyen los que comprenden la etapa de poner en contacto una muestra de prueba con antisueros hRFRP-1 y determinar el nivel de expresión de hRFRP-1. Los métodos en los que la expresión está por encima de un nivel normal umbral, según lo determinado en uno o más individuos con función cardíaca normal, indican sobre expresión de hRFRP-1. En varios aspectos, la sobreexpresión es indicativa de la existencia o potencial de una enfermedad cardíaca en el individuo del cual se extrajo la muestra de prueba.

La sobreexpresión de hRFRP-1 (demasiado péptido) puede disminuir la función cardíaca por debajo de lo normal, por lo tanto, en una estrategia terapéutica se usaría antisuero contra hRFRP-1 para abordar la anomalía y devolver las funciones fisiológicas a la normalidad. Por consiguiente, la descripción proporciona métodos que comprenden la etapa de poner en contacto una muestra de prueba con antisueros hRFRP-1 para determinar la expresión de hRFRP-1, en donde la expresión sobre un valor umbral normal, determinado en un individuo con función cardíaca normal, indica la existencia o potencial de anomalía cardíaca.

La expresión insuficiente de hFRP-1 (muy poco péptido) puede aumentar la función cardíaca por encima de lo normal, por lo que se pondría en práctica una estrategia terapéutica, p. ej., un superagonista de hFRP-1, para abordar la anomalía y devolver las funciones fisiológicas a la normalidad. Por consiguiente, la descripción proporciona métodos que comprenden la etapa de poner en contacto una muestra de prueba con antisueros hFRP-1 para determinar la expresión de hFRP-1, en donde la expresión bajo un valor umbral normal, determinada en un individuo con función cardíaca normal, indica la existencia o potencial de anomalía cardíaca.

Una estructura de hFRP-1 aberrante puede aumentar o disminuir la función cardíaca dependiendo de si la diferencia en la estructura conduce a una variante más o menos potente del péptido de origen natural y, por lo tanto, causa un desequilibrio en las funciones fisiológicas normales. El antisuero contra hFRP-1 se usaría en una estrategia terapéutica para corregir la función cardíaca aumentada o disminuida y devolver las funciones fisiológicas a la normalidad.

Como agente terapéutico, los antisueros hFRP-1 pueden usarse para disminuir la cantidad de péptido presente y, de este modo, aliviar los síntomas relacionados con la insuficiencia cardíaca o la función cardíaca reducida. Por consiguiente, la descripción proporciona un método para tratar una afección cardíaca que comprende la etapa de administrar una cantidad de antisuero hFRP-1 en una cantidad eficaz para tratar la afección cardíaca.

#### Referencias

1. Jessup, M., y Brozena S. (2003) *N. Engl. J. Med.* 348, 2007-2018
2. Mues, G. *et al.* (1982) *Life Sci.* 31, 2555-2561
3. Barnard, C. S., y Dockray G. J. (1984) *Regul. Pept.* 8, 209-215
4. Dockray, G. J. *et al.* (1983) *Nature* 305, 328-330
5. Price, D. A., y Greenberg, M. J. (1977) *Science* 197, 670-671
6. Fukusumi, S. *et al.* (2006) *Peptides* 27, 1073-1086
7. Nichols, R. (1992) *J. Mol. Neurosci.* 3, 213-218
8. Nichols, R. (2003) *Annu. Rev. Entomol.* 48, 485-503
9. Robb, S. *et al.* (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 850-856
10. Robb, S., y Evans, P. (1994) *J. Exp. Biol.* 197, 437-442
11. Wasielewski, O., y Skonieczna, M. (2008) *J. Comp. Physiol. B* 178, 877-885
12. Stevens, J. S. *et al.* (2009) *J. Exp. Biol.* 212, 3961-3976
13. Angioy, A. M. *et al.* (2007) *Peptides* 28, 585-593
14. Hinuma, S. *et al.* (2000) *Nat. Cell Biol.* 2, 703-708
15. Liu, Q. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 36961-36969
16. Fukusumi, S. *et al.* (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1540, 221-232
17. Ukena, K. y Tsutsui, K. (2001) *Neurosci. Lett.* 300, 153-156
18. Yano, T. *et al.* (2003) *Brain Res.* 982, 156-167
19. Nichols, R. *et al.* (1999) *J. Neurogenet.* 13, 89-104
20. Zornik, E. *et al.* (1999) *Peptides* 20, 45-51
21. Westfall, M. V. *et al.* (1997) *Methods Cell Biol.* 52, 307-322
22. Westfall, M.V. y Borton, A.R. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 33694-33700.
23. Westfall, M. V., Lee, A. M., y Robinson, D. A. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 41324- 41331
24. Boluyt, M. O. *et al.* (2004) *J. Appl. Physiol.* 96, 822-828
25. McCormick, J. y Nichols, R. (1993) *J. Comp. Neurol.* 338, 278-288
26. Holman, G. M. *et al.* (1986) *Comp. Biochem. Physiol. C* 85, 219-224
27. Fang, Q. *et al.* (2009) *Eur. J. Pharmacol.* 621, 61 -66
28. Dias, F. A. L. *et al.* (2006) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41, 330-339
29. Brodde, O. E. (1996) *Basic Res. Cardiol.* 91, 35-40
30. Lymperopoulos, A. *et al.* (2007) *Trends Mol. Med.* 13, 503-511

31. Angioy, A. M., *et al.*, 2007, *Peptides* 28: 585-93.  
 32. Beck-Sickinger, A. G., *et al.*, 1994, *Eur. J. Biochem.* 3: 947-58  
 33. Dardente, H., *et al.*, 2008, *J. Neuroendocrinol.* 20: 1252-59  
 34. Doherty, A. M., *et al.*, 1993, *J. Med. Chem.* 36: 2585-94  
 5 35. McCormick, J. *et al.*, 1993, *J. Comp. Neurol.* 338: 278-88  
 36. Shoelson, S. E. *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 4085-91  
 37. Westfall, M. V. 2003, *Methods Mol. Biol.* 219: 159-66  
 38. Westfall, M. V. *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278: 33694-700  
 39. Westfall, M. V. *et al.*, 2005, *J. Biol. Chem.* 280: 41324-31  
 10 40. Fukusumi, S. *et al.*, 2001, *Biochim. Biophys. Acta* 1540: 221-232.  
 41. Ukena, K. *et al.*, 2001, *Neurosci. Lett.* 300: 153-156.  
 42. Yano, T., *et al.*, 2003, *Brain Res.* 982:156-167.  
 43. Nichols R., *et al.*, 2010, *Peptides* Nov.; 31 (11):2067-74.

15 **Listado de secuencias**

- <110> Nichols, et al.  
 <120> Péptidos de la familia RFamida y métodos relacionados  
 <130> 30275/46140  
 <150> 61/320,505  
 20 <151> 2010-04-02  
 <160> 58  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 10  
 25 <212> PRT  
 <213> Drosophila melanogaster  
 <220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (10)..(10)  
 30 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 1  
 Thr Asp Val Asp His Val Phe Leu Arg Phe  
 1 5 10  
 <210> 2  
 <211> 12  
 35 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (12)..(12)  
 40 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 2  
 Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
 1 5 10  
 <210> 3  
 <211> 5  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 3  
**Leu Pro Leu Arg Phe**  
 1 5

<210> 4  
 <211> 11  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 10 <221> RES\_MOD  
 <222> (11)..(11)  
 <223> AMIDACIÓN

<400> 4  
**Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe**  
 1 5 10

15 <210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido natural o modificado distinto de L-Arg

25 <400> 5  
**Ala Pro Leu Xaa Phe**  
 1 5

<210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 35 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido natural o modificado distinto de L-Arg

<400> 6  
**Ala Pro Gln Xaa Phe**  
 1 5

<210> 7  
 40 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

45 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido natural o modificado distinto de L-Arg

<400> 7  
**Ala Phe Leu Xaa Phe**  
 50 1 5

<210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (4)..(4)  
 10 <223> Xaa es cualquier aminoácido natural o modificado distinto de L-Arg  
 <400> 8  
**Ala Phe Gln Xaa Phe**  
**1 5**  
 <210> 9  
 <211> 5  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 20 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido natural o modificado distinto de L-Arg  
 <400> 9  
**Val Pro Leu Xaa Phe**  
**1 5**  
 25 <210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido natural o modificado distinto de L-Arg  
 35 <400> 10  
**Val Pro Gln Xaa Phe**  
**1 5**  
 <210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (4)..(4)  
 45 <223> Xaa es cualquier aminoácido natural o modificado distinto de L-Arg  
 <400> 11  
**Val Phe Leu Xaa Phe**  
**1 5**  
 <210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 5 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido natural o modificado distinto de L-Arg  
 <400> 12  
 Val Phe Gln Xaa Phe  
 1 5  
 <210> 13  
 10 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 15 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Met o está ausente  
 <220>  
 20 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Pro o está ausente  
 <220>  
 25 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es His o está ausente  
 <220>  
 30 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa es Ser o está ausente  
 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa es Phe o está ausente  
 35 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa es Ala o está ausente  
 <220>  
 40 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa es Asn o está ausente  
 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 45 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa es Leu o está ausente  
 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (9)..(9)  
 50 <223> Xaa es Pro o está ausente  
 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa es Leu or Gln o está ausente  
 55 <220>  
 <221> CARACT\_MISC

<222> (11)..(11)  
 <223> Xaa es Arg o está ausente

<400> 13  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe  
 1 5 10

5 <210> 14  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Bos primigenius

<220>  
 10 <221> RES\_MOD  
 <222> (12)..(12)  
 <223> AMIDACIÓN

<400> 14  
 Met Pro Pro Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
 1 5 10

15 <210> 15  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Gallus gallus

<220>  
 20 <221> RES\_MOD  
 <222> (12)..(12)  
 <223> AMIDACIÓN

<400> 15  
 Val Pro Asn Ser Val Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
 1 5 10

25 <210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<220>  
 30 <221> RES\_MOD  
 <222> (12)..(12)  
 <223> AMIDACIÓN

<400> 16  
 Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
 1 5 10

35 <210> 17  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Ovis aries

<220>  
 40 <221> RES\_MOD  
 <222> (12)..(12)  
 <223> AMIDACIÓN

<400> 17  
 Met Pro Pro Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
 45 1 5 10

<210> 18  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 50 <213> Rana magna

<220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (12)..(12)  
 <223> AMIDACIÓN

<400> 18  
**Ser Leu Lys Pro Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe**  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 10 <221> RES\_MOD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> AMIDACIÓN

<400> 19  
**Ala Pro Leu Arg Phe**  
 1 5

15 <210> 20  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> AMIDACIÓN

25 <400> 20  
**Ala Pro Gln Arg Phe**  
 1 5

<210> 21  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> RES\_MOD  
 35 <222> (5)..(5)  
 <223> AMIDACIÓN

<400> 21  
**Ala Phe Leu Arg Phe**  
 1 5

<210> 22  
 40 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 45 <221> RES\_MOD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> AMIDACIÓN

<400> 22  
**Ala Phe Gln Arg Phe**  
 50 1 5



<210> 23  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (5)..(5)  
 10 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 23  
 Val Pro Leu Arg Phe  
 1 5  
 <210> 24  
 <211> 5  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 20 <221> RES\_MOD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 24  
 Val Pro Gln Arg Phe  
 1 5  
 25 <210> 25  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> AMIDACIÓN  
 35 <400> 25  
 Val Phe Leu Arg Phe  
 1 5  
 <210> 26  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> AMIDACIÓN  
 45 <400> 26  
 Val Phe Gln Arg Phe  
 1 5  
 <210> 27  
 <211> 612  
 <212> ADN  
 50 <213> Mus musculus

ES 2 701 452 T3

<400> 27  
atggaaatta tttcatcaaa gcgattcatt ttattgactt tagcaacttc aagcttctta 60  
acttcaaaca ccctttgttc agatgaatta atgatgcccc attttcacag caaagaaggt 120  
tatggaaaat attaccagct gagaggaatc ccaaaagggg taaaggaaag aagtgtcact 180  
tttcaagaac tcaaagattg gggggcaaag aaagatatta agatgagtcc agcccctgcc 240  
aacaagtgc cccactcagc agccaacctt ccctgaggt ttgggaggaa catagaagac 300  
agaagaagcc ccagggcacg ggccaacatg gaggcagga ccatgagcca ttttcccagc 360  
ctgccccaaa ggtttgggag aacaacagcc agacgcatca ccaagacact ggctggtttg 420  
ccccagaaat ccctgcactc cctggcctcc agtgaattgc tctatgccat gaccgccag 480  
catcaagaaa ttcagagtcc tggtaagag caacctagga aacgggtgtt cacggaaca 540  
gatgatgcag aaaggaaaca agaaaaata ggaaacctcc agccagtcct tcaagggct 600  
atgaagctgt ga 612

5 <210> 28  
<211> 203  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 28  
Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr  
1 5 10 15  
Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met  
20 25 30  
Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg  
35 40 45  
Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu  
50 55 60  
Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala  
65 70 75 80  
Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg  
85 90 95  
Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala  
100 105 110  
Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr  
115 120 125  
Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser  
130 135 140

10

ES 2 701 452 T3

Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Leu Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln  
 145 150 155 160

His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val  
 165 170 175

Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn  
 180 185 190

Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu  
 195 200

<210> 29

<211> 1190

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 29

ataaacattg ggctgcacat agagacttaa ttttagattt agacaaaatg gaaattattt 60  
 catcaaaact attcatttta ttgacttttag ccacttcaag cttgttaaca tcaaacattt 120  
 tttgtgcaga tgaattagt atgtccaatc ttcacagcaa agaaaattat gacaaatatt 180  
 ctgagcctag aggataccca aaaggggaaa gaagcctcaa ttttgaggaa ttaaaagatt 240  
 ggggacccaa aaatgttatt aagatgagta cacctgcagt caataaaatg ccacactcct 300  
 tcgccaaact gccattgaga tttgggagga acgttcaaga agaaagaagt gctggagcaa 360  
 cagccaacct gcctctgaga tctggaagaa atatggaggt gagcctcgtg agacgtgttc 420  
 ctaacctgcc ccaaggttt gggagaacaa caacagccaa aagtgtctgc aggatgctga 480  
 gtgatttgtg tcaaggatcc atgcattcac catgtgcaa tgacttattt tactccatga 540  
 cctgccagca ccaagaaatc cagaatcccg atcaaaaaca gtcaaggaga ctgctattca 600  
 agaaaataga tgatgcagaa ttgaaacaag aaaaataaga aacctggagc ctgtccctaa 660  
 agctgtggcc tgtaatctac aaatggctct atagcgaaga ccacacggaa gagtagctac 720  
 atacacttca tcagctatgg atcatcaacg gcaatttttc cttgtcagta cagctataat 780  
 agtatcttga aagttgtaaa aaaattaaag catatttggt acgtaaagt aaatgattt 840  
 ttgtctgaat aaaaaaaaaag cattgcaaat gcttagaaa tctctgataa tggagagaga 900  
 gacagaggac cctcctcact accctatata aaaatcattg gcacagttac acttaataaa 960  
 aaaaatataa cagaagagca ccctgaaaaa cattatgatg gaaattaaat agtatgccag 1020  
 aataacatgg ttgacaaata agtgaacaag gattaaaaat cacttacaaa cgtgtttctg 1080  
 tacacccttt ctatogtgtc aaatgttaat gaatctgtga tcaattgaaa tgtaaatgtc 1140  
 tgtgtaaaac tacaaaataa aaactcttag actttagggg gaaaagaaaa 1190

<210> 30

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

ES 2 701 452 T3

<400> 30

Lys His Trp Ala Ala His Arg Asp Leu Ile Leu Asp Leu Asp Lys Met  
 1 5 10 15

Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr Ser  
 20 25 30

Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met Ser  
 35 40 45

Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg Gly  
 50 55 60

Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp Trp  
 65 70 75 80

Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys Met  
 85 90 95

Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val Gln  
 100 105 110

Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser Gly  
 115 120 125

Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro Gln  
 130 135 140

Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu Ser  
 145 150 155 160

Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu Phe  
 165 170 175

Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln Lys  
 180 185 190

Gln Ser Arg Arg Leu Leu Phe Lys Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu Lys  
 195 200 205

Gln Glu Lys Glu Thr Trp Ser Leu Ser Leu Lys Leu Trp Pro Val Ile  
 210 215 220

ES 2 701 452 T3

Tyr Lys Trp Leu Tyr Ser Glu Asp His Thr Glu Glu Leu His Thr Leu  
225 230 235 240

His Gln Leu Trp Ile Ile Asn Gly Asn Phe Ser Leu Ser Val Gln Leu  
245 250 255

Tyr Leu Glu Ser Cys Lys Lys Ile Lys Ala Tyr Leu Leu Arg Lys Val  
260 265 270

Lys Met Ile Phe Val Ile Lys Lys Lys His Cys Lys Cys Phe Arg Asn  
275 280 285

Leu Trp Arg Glu Arg Gln Arg Thr Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Lys Asn  
290 295 300

His Trp His Ser Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Arg Arg Ala Pro Lys Thr  
305 310 315 320

Leu Trp Lys Leu Asn Ser Met Pro Glu His Gly Gln Ile Ser Glu Gln  
325 330 335

Gly Leu Lys Ile Thr Tyr Lys Arg Val Ser Val His Pro Phe Tyr Arg  
340 345 350

Val Lys Cys Ile Cys Asp Gln Leu Lys Cys Lys Cys Leu Cys Lys Thr  
355 360 365

Thr Lys Lys Leu Leu Asp Phe Arg Glu Lys Arg Lys  
370 375 380

- <210> 31
- <211> 19
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

- <220>
- 10 <221> RES\_MOD
- <222> (19)..(19)
- <223> AMIDACIÓN

<400> 31  
Leu Ala Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Ser Arg Arg Lys Gly Gly Phe Ser  
1 5 10 15

Phe Arg Phe

- 15 <210> 32
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus

<220>  
<221> RES\_MOD  
<222> (8)..(8)  
<223> AMIDACIÓN

- 20 <400> 32
- Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe  
1 5

<210> 33  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (8)..(8)  
 10 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 33  
 Val Asp His Val Phe Leu Arg Phe  
 1 5  
 <210> 34  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 20 <221> RES\_MOD  
 <222> (10)..(10)  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 34  
 Thr Asp Val Asp Ala Val Phe Leu Arg Phe  
 1 5 10  
 25 <210> 35  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (10)..(10)  
 <223> AMIDACIÓN  
 35 <400> 35  
 Thr Asp Val Asp His Ala Phe Leu Arg Phe  
 1 5 10  
 <210> 36  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 36  
 Thr Asp Val Asp His Val  
 1 5  
 45 <210> 37  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> RES\_MOD

<222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Bpa  
 <400> 37  
 Tyr Thr Xaa Val Asp His Val Phe Leu Arg Phe  
 1 5 10  
 5 <210> 38  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> Péptido sintético  
 <400> 38  
 Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
 1 5 10  
 <210> 39  
 <211> 19  
 15 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (19)..(19)  
 20 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 39  
 Leu Ala Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Arg Arg Arg Lys Gly Gly Phe Ser  
 1 5 10 15  
 Phe Arg Phe  
 <210> 40  
 <211> 13  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 30 <221> RES\_MOD  
 <222> (13)..(13)  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 40  
 Tyr Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
 1 5 10  
 35 <210> 41  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> CARACT\_MISC  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Bpa  
 45 <220>  
 <221> RES\_MOD  
 <222> (12)..(12)  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 41  
 50 Met Pro Xaa Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe

|    |                            |     |     |
|----|----------------------------|-----|-----|
|    | 1                          | 5   | 10  |
|    | <210> 42                   |     |     |
|    | <211> 12                   |     |     |
| 5  | <212> PRT                  |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial |     |     |
|    | <220>                      |     |     |
|    | <223> Péptido sintético    |     |     |
|    | <220>                      |     |     |
| 10 | <221> RES_MOD              |     |     |
|    | <222> (12)..(12)           |     |     |
|    | <223> AMIDACIÓN            |     |     |
|    | <400> 42                   |     |     |
|    | Ala                        | Pro | His |
|    | Ser                        | Phe | Ala |
|    | Asn                        | Leu | Pro |
|    | Leu                        | Arg | Phe |
|    | 1                          | 5   | 10  |
| 15 | <210> 43                   |     |     |
|    | <211> 12                   |     |     |
|    | <212> PRT                  |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial |     |     |
|    | <220>                      |     |     |
| 20 | <223> Péptido sintético    |     |     |
|    | <400> 43                   |     |     |
|    | Met                        | Pro | His |
|    | Ser                        | Phe | Ala |
|    | Ala                        | Leu | Pro |
|    | Leu                        | Arg | Phe |
|    | 1                          | 5   | 10  |
|    | <210> 44                   |     |     |
|    | <211> 10                   |     |     |
| 25 | <212> PRT                  |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial |     |     |
|    | <220>                      |     |     |
|    | <223> Péptido sintético    |     |     |
|    | <220>                      |     |     |
| 30 | <221> RES_MOD              |     |     |
|    | <222> (10)..(10)           |     |     |
|    | <223> AMIDACIÓN            |     |     |
|    | <400> 44                   |     |     |
|    | His                        | Ser | Phe |
|    | Ala                        | Asn | Leu |
|    | Pro                        | Leu | Arg |
|    | Phe                        |     |     |
|    | 1                          | 5   | 10  |
| 35 | <210> 45                   |     |     |
|    | <211> 9                    |     |     |
|    | <212> PRT                  |     |     |
|    | <213> Secuencia artificial |     |     |
|    | <220>                      |     |     |
| 40 | <223> Péptido sintético    |     |     |
|    | <220>                      |     |     |
|    | <221> RES_MOD              |     |     |
|    | <222> (9)..(9)             |     |     |
|    | <223> AMIDACIÓN            |     |     |
| 45 | <400> 45                   |     |     |
|    | Ser                        | Phe | Ala |
|    | Asn                        | Leu | Pro |
|    | Leu                        | Arg | Phe |
|    | 1                          | 5   |     |
|    | <210> 46                   |     |     |
|    | <211> 8                    |     |     |
|    | <212> PRT                  |     |     |
| 50 | <213> Secuencia artificial |     |     |
|    | <220>                      |     |     |
|    | <223> Péptido sintético    |     |     |



<400> 46  
Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
1 5

<210> 47  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
10 <221> RES\_MOD  
<222> (7)..(7)  
<223> AMIDACIÓN

<400> 47  
Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
1 5

15 <210> 48  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Péptido sintético

<220>  
<221> RES\_MOD  
<222> (6)..(6)  
<223> AMIDACIÓN

25 <400> 48  
Asn Leu Pro Leu Arg Phe  
1 5

<210> 49  
<211> 1254  
<212> ADN  
30 <213> Rattus norvegicus

ES 2 701 452 T3

<400> 49  
atgggcaaga gatgggactc aaactcttca ggaagctggg atcacatctg gagtggcaat 60  
gacacacagc atccttggta ttcagatata aacatcacat acatgaacta ctatctccac 120  
cagccccacg tgacagctgt cttcattagc tcctacttcc tgatcttctt cctgtgcatg 180  
gtgggaaaca ctgtcgtttg ctttgttgta ataaggaata ggtacatgca cacggtcact 240  
aatttcttca tcttcaacct cgcaataagt gacttactgg ttggaatatt ctgcatgcct 300  
atcacattgc tggacaacat catagcagga tggccggttg gaagcagcat gtgcaagatc 360  
agcgggctgg tgcaagggat atcgggtgcc gcttctgtct tcaccttggg tgccatagcc 420  
gtagacagat tccggtgtgt ggtctacccc ttaagocca agctcactgt caagacagcc 480  
tttgtcatga tcgtgatcat ctggggcctg gccatcacca ttatgacccc atctgcaatc 540  
atgttacatg tacaggaaga aaaatactac cgtgtgaggc tcagctccca caataaaacc 600  
agcacagtct actgggtgtcg ggaggattgg ccaaaccagg aaatgaggag gatctacacc 660  
accgtgctct ttgccactat ctacctggct ccactctccc tcattgttat catgtatgca 720  
aggattgggg cttccctctt caagacctca gcacacagca caggtaagca ggcctggag 780  
cagtggcatg tatccaagaa gaaacagaag gtcacaaaga tgctgctgac tgtggccctc 840  
cttttcatcc tttcctggct tcccctgtgg actctgatga tgctctcaga ctatgctgac 900  
ctgtcaccta acaaactacg tgtcatcaat atttatgtct acccttttgc ccactggctc 960  
gccttctgca atagcagtgat caaccccatc atttatggtt tctttaatga aaattttcgc 1020  
agtggtttcc aagatgcttt ccagttctgc caaaagaaag tcaaacccca ggaagcctat 1080  
ggcctaagag ctaaacgcaa cctggacata aacacatctg gcctggttgg ccatgaacct 1140  
gcatctcaaa acccaagtgg ggaaaacttg ggatgtagaa aaagtgcaga caatcccaca 1200  
caggaatcct tgatggagga aacgggagaa gctaccaaca gtactgagac ttag 1254

<210> 50

<211> 417

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 50

Met Gly Lys Arg Trp Asp Ser Asn Ser Ser Gly Ser Trp Asp His Ile  
1 5 10 15

ES 2 701 452 T3

Trp Ser Gly Asn Asp Thr Gln His Pro Trp Tyr Ser Asp Ile Asn Ile  
 20 25 30

Thr Tyr Met Asn Tyr Tyr Leu His Gln Pro His Val Thr Ala Val Phe  
 35 40 45

Ile Ser Ser Tyr Phe Leu Ile Phe Phe Leu Cys Met Val Gly Asn Thr  
 50 55 60

Val Val Cys Phe Val Val Ile Arg Asn Arg Tyr Met His Thr Val Thr  
 65 70 75 80

Asn Phe Phe Ile Phe Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Val Gly Ile  
 85 90 95

Phe Cys Met Pro Ile Thr Leu Leu Asp Asn Ile Ile Ala Gly Trp Pro  
 100 105 110

Phe Gly Ser Ser Met Cys Lys Ile Ser Gly Leu Val Gln Gly Ile Ser  
 115 120 125

Val Ala Ala Ser Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Ala Val Asp Arg Phe  
 130 135 140

Arg Cys Val Val Tyr Pro Phe Lys Pro Lys Leu Thr Val Lys Thr Ala  
 145 150 155 160

Phe Val Met Ile Val Ile Ile Trp Gly Leu Ala Ile Thr Ile Met Thr  
 165 170 175

Pro Ser Ala Ile Met Leu His Val Gln Glu Glu Lys Tyr Tyr Arg Val  
 180 185 190

Arg Leu Ser Ser His Asn Lys Thr Ser Thr Val Tyr Trp Cys Arg Glu  
 195 200 205

Asp Trp Pro Asn Gln Glu Met Arg Arg Ile Tyr Thr Thr Val Leu Phe  
 210 215 220

Ala Thr Ile Tyr Leu Ala Pro Leu Ser Leu Ile Val Ile Met Tyr Ala  
 225 230 235 240

Arg Ile Gly Ala Ser Leu Phe Lys Thr Ser Ala His Ser Thr Gly Lys  
 245 250 255

Gln Arg Leu Glu Gln Trp His Val Ser Lys Lys Lys Gln Lys Val Ile

ES 2 701 452 T3

260 265 270

Lys Met Leu Leu Thr Val Ala Leu Leu Phe Ile Leu Ser Trp Leu Pro  
 275 280 285

Leu Trp Thr Leu Met Met Leu Ser Asp Tyr Ala Asp Leu Ser Pro Asn  
 290 295 300

Lys Leu Arg Val Ile Asn Ile Tyr Val Tyr Pro Phe Ala His Trp Leu  
 305 310 315 320

Ala Phe Cys Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Phe Phe Asn  
 325 330 335

Glu Asn Phe Arg Ser Gly Phe Gln Asp Ala Phe Gln Phe Cys Gln Lys  
 340 345 350

Lys Val Lys Pro Gln Glu Ala Tyr Gly Leu Arg Ala Lys Arg Asn Leu  
 355 360 365

Asp Ile Asn Thr Ser Gly Leu Leu Val His Glu Pro Ala Ser Gln Asn  
 370 375 380

Pro Ser Gly Glu Asn Leu Gly Cys Arg Lys Ser Ala Asp Asn Pro Thr  
 385 390 395 400

Gln Glu Ser Leu Met Glu Glu Thr Gly Glu Ala Thr Asn Ser Thr Glu  
 405 410 415

Thr

<210> 51

<211> 1656

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 51

catcatgaat gagaaatggg acacaaactc ttcagaaaac tggcatccca tctggaatgt 60

caatgacaca aagcatcatc tgtactcaga tattaatatt acctatgtga actactatct 120

tcaccagcct caagtggcag caatcttcat tatttcctac tttctgatct tctttttgtg 180

catgatggga aatactgtgg tttgctttat tgtaatgagg aacaaacata tgcacacagt 240

cactaatctc ttcattctaa acctggccat aagtgattta ctagttggca tattctgcat 300

gcctataaca ctgctggaca atattatagc aggatggcca tttggaaaca cgatgtgcaa 360

gatcagtgga ttggtccagg gaatatctgt cgcagcttca gtctttacgt tagttgcaat 420

ES 2 701 452 T3

tgctgtagat aggttccagt gtgtggtcta cccttttaa ccaaagctca ctatcaagac 480  
 agcgtttgtc attattatga tcatctgggt cctagccatc accattatgt ctccatctgc 540  
 agtaatgtta catgtgcaag aagaaaaata ttaccgagtg agactcaact cccagaataa 600  
 aaccagtcca gtctactggt gccgggaaga ctggccaaat caggaaatga ggaagatcta 660  
 caccactgtg ctgtttgcc aacatctacct ggctcccctc tccctcattg tcatcatgta 720  
 tggaaggatt ggaatttcac tcttcagggc tgcagttctt cacacaggca ggaagaacca 780  
 ggagcagtgg cacgtggtgt ccaggaagaa gcagaagatc attaagatgc tcctgattgt 840  
 ggccctgctt tttattctct catggctgcc cctgtggact ctaatgatgc tctcagacta 900  
 cgctgacctt tctccaaatg aactgcagat catcaacatc tacatctacc cttttgcaca 960  
 ctggctggca ttcggcaaca gcagtgtcaa tcccatcatt tatggtttct tcaacgagaa 1020  
 tttccgcggt ggtttccaag aagctttcca gctccagctc tgccaaaaaa gagcaaagcc 1080  
 tatggaagct tatgccctaa aagctaaaag ccatgtgctc ataaacacat ctaatcagct 1140  
 tgtccaggaa tctacatttc aaaaccctca tggggaaacc ttgctttata ggaaaagtgc 1200  
 tgaaaaacc caacaggaat tagtgatgga agaattaaaa gaaactacta acagcagtga 1260  
 gatttaaaaa gagctagtgt gataatccta actctactac gcattatata tttaaatcca 1320  
 ttgctttttg tggctttgca cttcaaattt ttcaaagaat gttctaaata aaacatttac 1380  
 tgaaagccct ctctggcaaa aaaattaaaa ataaacaaaa atggtcataa gatcataaac 1440  
 aatcttatgt tgtataaaaa tacgtagagt gacttagaca tgtttgcatg aataaatata 1500  
 tttctagaga acagtttaca aagcctcatc tttccaaact taaccatttg tgtatgcgtc 1560  
 aatcaagcc tgcacgcgtg cgtgcatgtg tgtgtgtatt ttcccctaat ggtgatgatg 1620  
 agcagtgctt tgcataaac tagattttat caattt 1656

<210> 52

<211> 536

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ile Met Asn Glu Lys Trp Asp Thr Asn Ser Ser Glu Asn Trp His Pro  
 1 5 10 15

Ile Trp Asn Val Asn Asp Thr Lys His His Leu Tyr Ser Asp Ile Asn  
 20 25 30

Ile Thr Tyr Val Asn Tyr Tyr Leu His Gln Pro Gln Val Ala Ala Ile  
 35 40 45

Phe Ile Ile Ser Tyr Phe Leu Ile Phe Phe Leu Cys Met Met Gly Asn

5

ES 2 701 452 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|----|
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  | 60 |
| Thr | Val | Val | Cys | Phe | Ile | Val | Met | Arg | Asn | Lys | His | Met | His | Thr | Val |  |  |    |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |    |
| Thr | Asn | Leu | Phe | Ile | Leu | Asn | Leu | Ala | Ile | Ser | Asp | Leu | Leu | Val | Gly |  |  |    |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |    |
| Ile | Phe | Cys | Met | Pro | Ile | Thr | Leu | Leu | Asp | Asn | Ile | Ile | Ala | Gly | Trp |  |  |    |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |    |
| Pro | Phe | Gly | Asn | Thr | Met | Cys | Lys | Ile | Ser | Gly | Leu | Val | Gln | Gly | Ile |  |  |    |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |    |
| Ser | Val | Ala | Ala | Ser | Val | Phe | Thr | Leu | Val | Ala | Ile | Ala | Val | Asp | Arg |  |  |    |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |    |
| Phe | Gln | Cys | Val | Val | Tyr | Pro | Phe | Lys | Pro | Lys | Leu | Thr | Ile | Lys | Thr |  |  |    |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |    |
| Ala | Phe | Val | Ile | Ile | Met | Ile | Ile | Trp | Val | Leu | Ala | Ile | Thr | Ile | Met |  |  |    |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |  |  |    |
| Ser | Pro | Ser | Ala | Val | Met | Leu | His | Val | Gln | Glu | Glu | Lys | Tyr | Tyr | Arg |  |  |    |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |    |
| Val | Arg | Leu | Asn | Ser | Gln | Asn | Lys | Thr | Ser | Pro | Val | Tyr | Trp | Cys | Arg |  |  |    |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |    |
| Glu | Asp | Trp | Pro | Asn | Gln | Glu | Met | Arg | Lys | Ile | Tyr | Thr | Thr | Val | Leu |  |  |    |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |    |
| Phe | Ala | Asn | Ile | Tyr | Leu | Ala | Pro | Leu | Ser | Leu | Ile | Val | Ile | Met | Tyr |  |  |    |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |    |
| Gly | Arg | Ile | Gly | Ile | Ser | Leu | Phe | Arg | Ala | Ala | Val | Pro | His | Thr | Gly |  |  |    |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |    |
| Arg | Lys | Asn | Gln | Glu | Gln | Trp | His | Val | Val | Ser | Arg | Lys | Lys | Gln | Lys |  |  |    |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |    |
| Ile | Ile | Lys | Met | Leu | Leu | Ile | Val | Ala | Leu | Leu | Phe | Ile | Leu | Ser | Trp |  |  |    |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |    |
| Leu | Pro | Leu | Trp | Thr | Leu | Met | Met | Leu | Ser | Asp | Tyr | Ala | Asp | Leu | Ser |  |  |    |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |    |

ES 2 701 452 T3

Pro Asn Glu Leu Gln Ile Ile Asn Ile Tyr Ile Tyr Pro Phe Ala His  
305 310 315 320

Trp Leu Ala Phe Gly Asn Ser Ser Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Phe  
325 330 335

Phe Asn Glu Asn Phe Arg Arg Gly Phe Gln Glu Ala Phe Gln Leu Gln  
340 345 350

Leu Cys Gln Lys Arg Ala Lys Pro Met Glu Ala Tyr Ala Leu Lys Ala  
355 360 365

Lys Ser His Val Leu Ile Asn Thr Ser Asn Gln Leu Val Gln Glu Ser  
370 375 380

Thr Phe Gln Asn Pro His Gly Glu Thr Leu Leu Tyr Arg Lys Ser Ala  
385 390 395 400

Glu Lys Pro Gln Gln Glu Leu Val Met Glu Glu Leu Lys Glu Thr Thr  
405 410 415

Asn Ser Ser Glu Ile Lys Glu Leu Val Ser Leu Tyr Tyr Ala Leu Tyr  
420 425 430

Ile Ile His Cys Phe Leu Trp Leu Cys Thr Ser Asn Phe Ser Lys Asn  
435 440 445

Val Leu Asn Lys Thr Phe Thr Glu Ser Pro Leu Trp Gln Lys Asn Lys  
450 455 460

Thr Lys Met Val Ile Arg Ser Thr Ile Leu Cys Cys Ile Lys Ile Arg  
465 470 475 480

Arg Val Thr Thr Cys Leu His Glu Ile Tyr Phe Arg Thr Val Tyr Lys  
485 490 495

Ala Ser Ser Phe Gln Thr Pro Phe Val Tyr Ala Ser Asn Gln Ala Cys  
500 505 510

Thr Arg Ala Cys Met Cys Val Cys Ile Phe Pro Lys Trp Ala Val Leu  
515 520 525

Cys Met Lys Leu Asp Phe Ile Asn  
530 535

<210> 53

<211> 601

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus

ES 2 701 452 T3

<400> 53  
 agacctggg gatcctgggg cctgggatcc tatgtggcca aatggtggcc actcaccccc 60  
 tcttctctcc ccttcctgtg ctcagatgag gtgcctctgc tcttggcttt gcctcctcct 120  
 gcctctgagt gcctgctttc ctctgctgga cagaagggga cccacagaca tcggtgacat 180  
 cggagccaga atgagctggg tccagctgac tgagggacac acccccgct cagttcaaag 240  
 tccacggcca caggccctgc tcgtggtggc caaggagcag caggcctctc gcaggagca 300  
 cactggcttc cgtctagga ggcaggacag tggcagtga gccacggggt tcctgcccac 360  
 tgactcagag aaggccagcg gcccctggg gactctggca gaggagctca gcagctacag 420  
 ccggcggaag ggaggcttca gcttccgctt cggccggtga gggcctgcgt ggactctgcc 480  
 ctgactgtcc actcaagtct gggccccaac cttgagagag aatatacaaa tgaatctggt 540  
 ggtgaatagg tgtgtgtttg tttttathta caactttgct aaagtgaaag acctgggtgg 600  
 t 601

<210> 54  
 <211> 198  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 54  
 Asp Leu Gly Asp Pro Gly Ala Trp Asp Pro Met Trp Pro Asn Gly Gly  
 1 5 10 15  
 His Ser Pro Pro Leu Leu Ser Pro Ser Cys Ala Gln Met Arg Cys Leu  
 20 25 30  
 Cys Ser Trp Leu Cys Leu Leu Leu Pro Leu Ser Ala Cys Phe Pro Leu  
 35 40 45  
 Leu Asp Arg Arg Gly Pro Thr Asp Ile Gly Asp Ile Gly Ala Arg Met  
 50 55 60  
 Ser Trp Val Gln Leu Thr Glu Gly His Thr Pro Arg Ser Val Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Arg Pro Gln Ala Leu Leu Val Val Ala Lys Glu Gln Gln Ala Ser  
 85 90 95  
 Arg Arg Glu His Thr Gly Phe Arg Leu Gly Arg Gln Asp Ser Gly Ser  
 100 105 110  
 Glu Ala Thr Gly Phe Leu Pro Thr Asp Ser Glu Lys Ala Ser Gly Pro  
 115 120 125



ES 2 701 452 T3

Leu Gly Thr Leu Ala Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Ser Arg Arg Lys Gly  
 130 135 140

Gly Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg Gly Pro Ala Trp Thr Leu Pro Leu  
 145 150 155 160

Ser Thr Gln Val Trp Ala Pro Thr Leu Arg Glu Asn Ile Thr Met Asn  
 165 170 175

Leu Val Val Asn Arg Cys Val Phe Val Phe Ile Tyr Asn Phe Ala Lys  
 180 185 190

Val Lys Asp Leu Gly Gly  
 195

<210> 55  
 <211> 1302  
 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 55  
 atgcaggcgc tcaacatcac cgccggagcag ttctcccggc tgctgagcgc gcacaacctg 60  
 actcgggagc agttcattca tcgctatggg ctgagaccgc tggctctacac tccggagctg 120  
 cccgcgcgctg ctaaagtggc ctttgcgctg gcaggagcac tcatttttgc cctggcgctc 180  
 ttcggcaact ctctgggtcat ctatgtggtg acccgcagca aggccatgcg caccgtcacc 240  
 aacatcttca tctgctctct ggcactcagt gatctgctca ttgccttctt ctgcatcccc 300  
 gtcacgatgc tccagaacat ctccgacaag tggctgggtg gtgccttcat ctgcaagatg 360  
 gtaccctttg tccagtccac ggccgctcgtg acagaaatcc tcacatgac ctgcatcgct 420  
 gttgagaggc accaaggact tgtccatcct tttaaaatga agtggcagta caccaccgga 480  
 agggccttca cgatcttggg cgtgggtctgg ttggcggcca tcatcgtagg atcacccatg 540  
 tggcacgtgc aacgccttga gattaagtat gacttcctct atgaaaaaga acacatctgc 600  
 tgcttgaag aatgggccag ccccgtgcac cagagaatct acagcacctt cattctcgtc 660  
 atcctcttcc tctgcctct tgtggtaatg ctagtctct atagcaagat tggctatgaa 720  
 ctgtggatca agaagagagt gggagacagt tcagcgcttc aaactatcca cgggaaagaa 780  
 atgtcaaaaa tagccaggaa gaagaagcgg gctgtcatta tgatggtgac tgtggtggct 840  
 ctctttgctg catgctgggc acctttccac gttgttcaca tgatggttga gtacagtaat 900  
 tttgaaaaag aatatgatga tgtcacaatc aagatgggtct ttgctgtcgc gcagacaatt 960  
 ggctttttca actccatctg taatcccttt gtgtatgctt ttatgaatga aaacttcaaa 1020  
 aagaattttc tgtctgctgt ttgttattgc atagtgaaag aatcctcctc cccagcacgg 1080  
 aagcctggga attctggaat atcaatgatg cagaagagag caaagttatc tgcaccacag 1140  
 cgtccagtgg aagaaaccaa aggagacaca ttcagtgatg ccagcattga tgtcaaattg 1200  
 tgcgagcagc cgcggggagaa aagacaactc aagagacagc tagccttctt cagttctgaa 1260  
 ctttctgaaa actctacttt tggtagtggc catgaactgt aa 1302

10

<210> 56  
 <211> 433

ES 2 701 452 T3

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 56

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Ala Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Ser  
1 5 10 15

Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile His Arg Tyr Gly Leu Arg  
20 25 30

Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Val Ala Phe  
35 40 45

Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser  
50 55 60

Leu Val Ile Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr  
65 70 75 80

Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Ala Phe  
85 90 95

Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Lys Trp Leu  
100 105 110

Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala  
115 120 125

Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His  
130 135 140

Gln Gly Leu Val His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Thr Arg  
145 150 155 160

Arg Ala Phe Thr Ile Leu Gly Val Val Trp Leu Ala Ala Ile Ile Val  
165 170 175

Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Arg Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe  
180 185 190

ES 2 701 452 T3

Leu Tyr Glu Lys Glu His Ile Cys Cys Leu Glu Glu Trp Ala Ser Pro  
 195 200 205

Val His Gln Arg Ile Tyr Ser Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu  
 210 215 220

Leu Pro Leu Val Val Met Leu Val Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu  
 225 230 235 240

Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Ser Ser Ala Leu Gln Thr Ile  
 245 250 255

His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val  
 260 265 270

Ile Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Ala Cys Trp Ala Pro  
 275 280 285

Phe His Val Val His Met Met Val Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu  
 290 295 300

Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Val Phe Ala Val Ala Gln Thr Ile  
 305 310 315 320

Gly Phe Phe Asn Ser Ile Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn  
 325 330 335

Glu Asn Phe Lys Lys Asn Phe Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val  
 340 345 350

Lys Glu Ser Ser Ser Pro Ala Arg Lys Pro Gly Asn Ser Gly Ile Ser  
 355 360 365

Met Met Gln Lys Arg Ala Lys Leu Ser Arg Pro Gln Arg Pro Val Glu  
 370 375 380

Glu Thr Lys Gly Asp Thr Phe Ser Asp Ala Ser Ile Asp Val Lys Leu  
 385 390 395 400

Cys Glu Gln Pro Arg Glu Lys Arg Gln Leu Lys Arg Gln Leu Ala Phe  
 405 410 415

Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu  
 420 425 430

Leu

<210> 57

<211> 1307

5 <212> ADN

<213> Rattus norvegicus

ES 2 701 452 T3

<400> 57  
cagacagtat ggaggcggag ccctcccagc ctcccaacgg cagctggccc ctgggtcaga 60  
acgggagtga tgtggagacc agcatagcaa ccagcctcac cttctcctcc tactaccaac 120  
actcctctcc ggtggcagcc atgttcatcg cggcctacgt gctcatcttc ctctctgca 180  
tgggtgggcaa caccctggtc tgcttcattg tgctcaagaa ccggcacatg cgcactgtca 240  
ccaacatggt tctcctcaac ctggccgtca gcgacctgct ggtgggcatc ttctgcatgc 300  
ccacaaccct tgtggacaac cttatcactg gttggccttt tgacaacgcc acatgcaaga 360  
tgagcggctt ggtgcagggc atgtccgtgt ctgcatcggg ttccacactg gtggccatcg 420  
ctgtgaaag gttccgctgc atcgtgcacc ctttccgga gaagctgacc cttcggaagg 480  
cgctgttcac catcgcgggtg atctgggtc tggcgtgct catcatgtgt ccctcggcgg 540  
tcactctgac agtcaccgga gaggagcatc acttcatgct ggatgctcgt aaccgctcct 600  
acccgctcta ctctgtctgg gaggcctggc ccgagaaggg catgcgcaag gtctacaccg 660  
cgggtctctt cgcgcacatc tacctggtgc cgctggcgt catcgtagtg atgtacgtgc 720  
gcatcgcgcg caagctatgc caggcccccg gtctcgcgcg cgacacggag gaggcggtagg 780  
ccgagggtag cgcacttcg cggcgtaggg cccgctgggt gcacatgctg gtcattgtagg 840  
cgctcttctt cacgttgtcc tggctgccac tctgggtgct gctgctgctc atcgactatg 900  
gggagctgag cgagctgcaa ctgcacctgc tgtcggctca cgccttccc ttggcacact 960  
ggctggcctt ctccacagc agcccaacc ccatcatcta cggctacttc aacgagaact 1020  
tccgccgagg cttccaggct gccttccgtg cacagctctg ctggcctccc tgggccgccc 1080  
acaagcaagc ctactcggag cggccaacc gcctcctgcg caggcgggtg gtggtggacg 1140  
tgcaaccag cgactccggc ctgccatcag agtctggccc cagcagcggg gtcccagggc 1200  
ctggccggct gccactgcga aatgggcgtg tggcccatca ggatggcccg ggggaagggc 1260  
caggctgcaa ccacatgccc ctcaccatcc cggcctggaa catttga 1307

<210> 58

<211> 434

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 58

Asp Ser Met Glu Ala Glu Pro Ser Gln Pro Pro Asn Gly Ser Trp Pro  
1 5 10 15

5

ES 2 701 452 T3

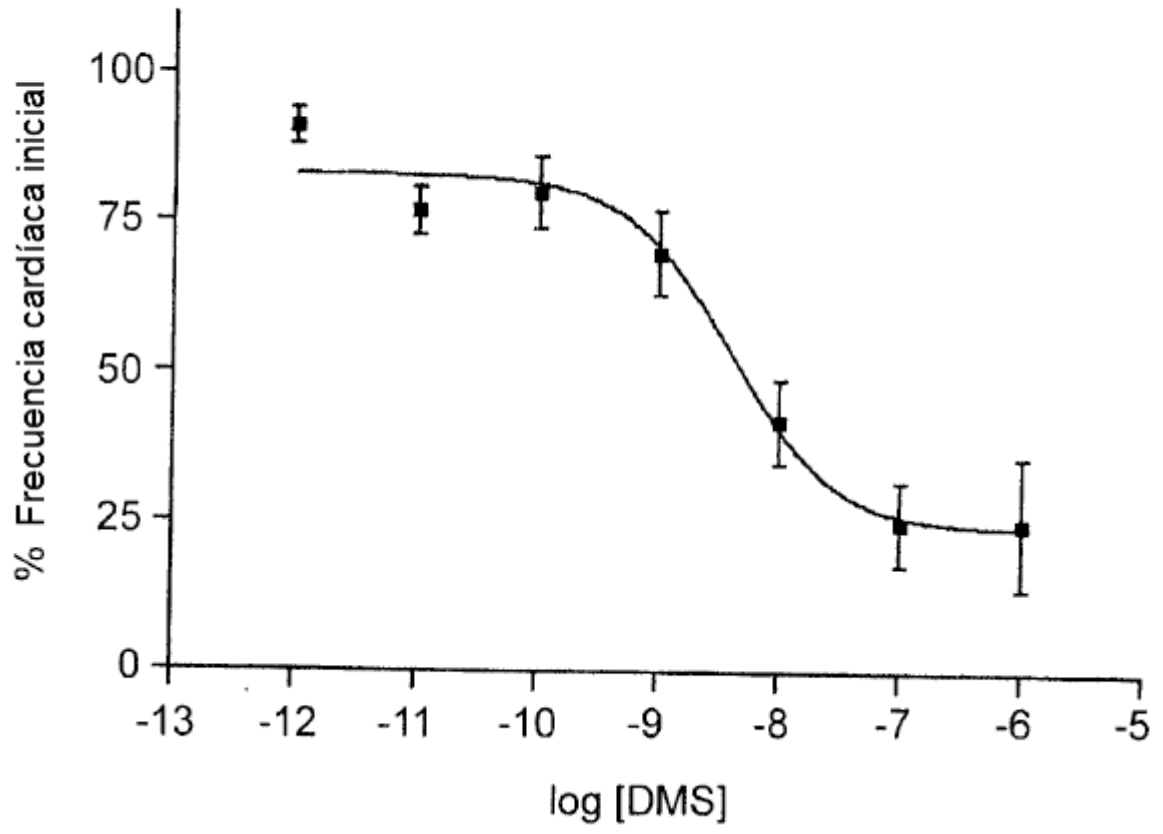
Leu Gly Gln Asn Gly Ser Asp Val Glu Thr Ser Ile Ala Thr Ser Leu  
 20 25 30  
 Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr Gln His Ser Ser Pro Val Ala Ala Met Phe  
 35 40 45  
 Ile Ala Ala Tyr Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Met Val Gly Asn Thr  
 50 55 60  
 Leu Val Cys Phe Ile Val Leu Lys Asn Arg His Met Arg Thr Val Thr  
 65 70 75 80  
 Asn Met Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Val Gly Ile  
 85 90 95  
 Phe Cys Met Pro Thr Thr Leu Val Asp Asn Leu Ile Thr Gly Trp Pro  
 100 105 110  
 Phe Asp Asn Ala Thr Cys Lys Met Ser Gly Leu Val Gln Gly Met Ser  
 115 120 125  
 Val Ser Ala Ser Val Phe Thr Leu Val Ala Ile Ala Val Glu Arg Phe  
 130 135 140  
 Arg Cys Ile Val His Pro Phe Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Lys Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Phe Thr Ile Ala Val Ile Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ile Met Cys  
 165 170 175  
 Pro Ser Ala Val Thr Leu Thr Val Thr Arg Glu Glu His His Phe Met  
 180 185 190  
 Leu Asp Ala Arg Asn Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Ser Cys Trp Glu Ala  
 195 200 205  
 Trp Pro Glu Lys Gly Met Arg Lys Val Tyr Thr Ala Val Leu Phe Ala  
 210 215 220  
 His Ile Tyr Leu Val Pro Leu Ala Leu Ile Val Val Met Tyr Val Arg  
 225 230 235 240  
 Ile Ala Arg Lys Leu Cys Gln Ala Pro Gly Pro Ala Arg Asp Thr Glu  
 245 250 255  
 Glu Ala Val Ala Glu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val

ES 2 701 452 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 260 |     | 265 |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | His | Met | Leu | Val | Met | Val | Ala | Leu | Phe | Phe | Thr | Leu | Ser | Trp | Leu |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Pro | Leu | Trp | Val | Leu | Leu | Leu | Leu | Ile | Asp | Tyr | Gly | Glu | Leu | Ser | Glu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Leu | Gln | Leu | His | Leu | Leu | Ser | Val | Tyr | Ala | Phe | Pro | Leu | Ala | His | Trp |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Leu | Ala | Phe | Phe | His | Ser | Ser | Ala | Asn | Pro | Ile | Ile | Tyr | Gly | Tyr | Phe |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     | 335 |
| Asn | Glu | Asn | Phe | Arg | Arg | Gly | Phe | Gln | Ala | Ala | Phe | Arg | Ala | Gln | Leu |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |
| Cys | Trp | Pro | Pro | Trp | Ala | Ala | His | Lys | Gln | Ala | Tyr | Ser | Glu | Arg | Pro |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Asn | Arg | Leu | Leu | Arg | Arg | Arg | Val | Val | Val | Asp | Val | Gln | Pro | Ser | Asp |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Leu | Pro | Ser | Glu | Ser | Gly | Pro | Ser | Ser | Gly | Val | Pro | Gly | Pro |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Gly | Arg | Leu | Pro | Leu | Arg | Asn | Gly | Arg | Val | Ala | His | Gln | Asp | Gly | Pro |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Gly | Glu | Gly | Pro | Gly | Cys | Asn | His | Met | Pro | Leu | Thr | Ile | Pro | Ala | Trp |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     |     | 430 |     |
| Asn | Ile |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

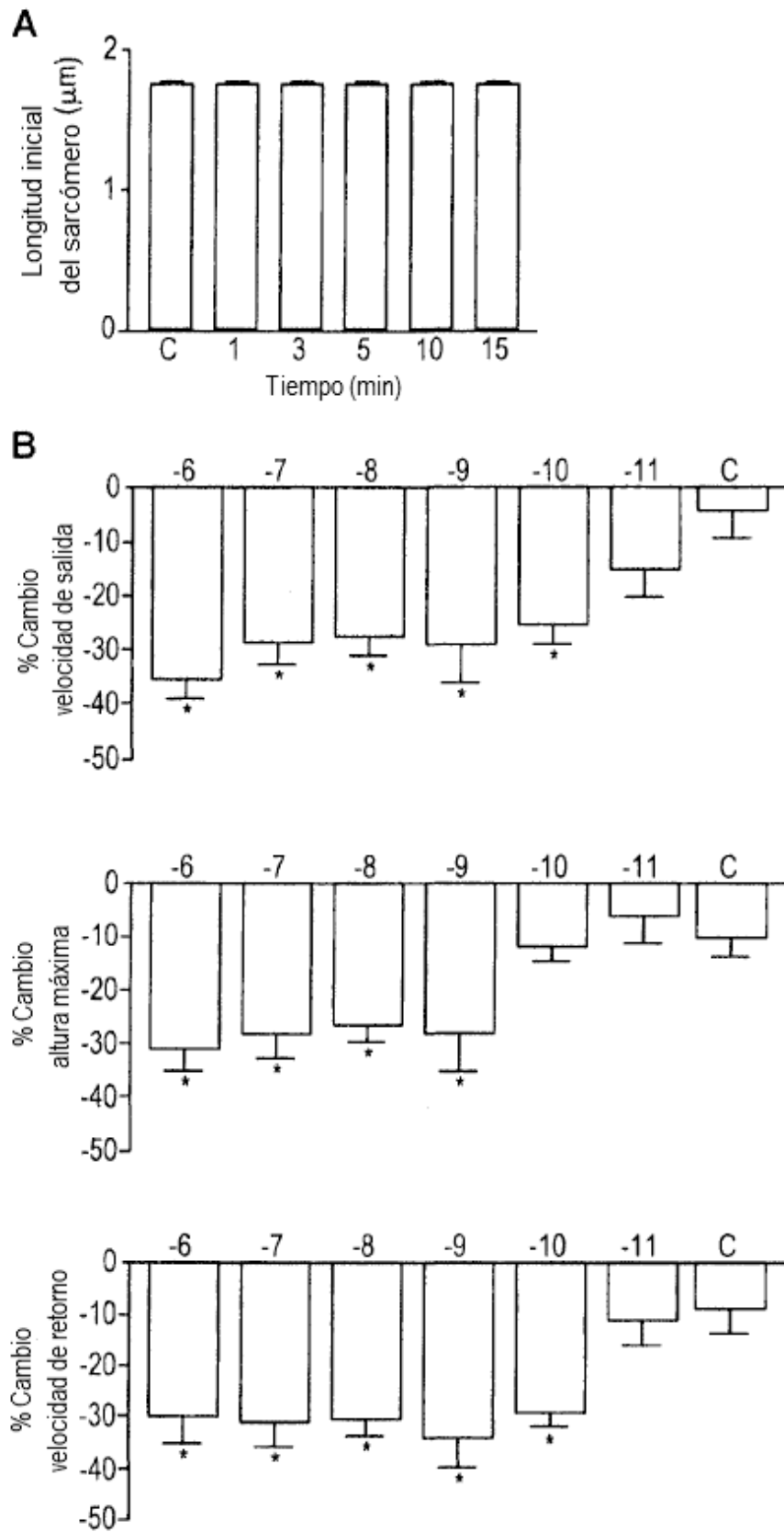
**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos:  
L-P-L-A-Famida en donde,  
dicho péptido modula la función cardíaca en un vertebrado; o una sal, amida o éster del mismo.

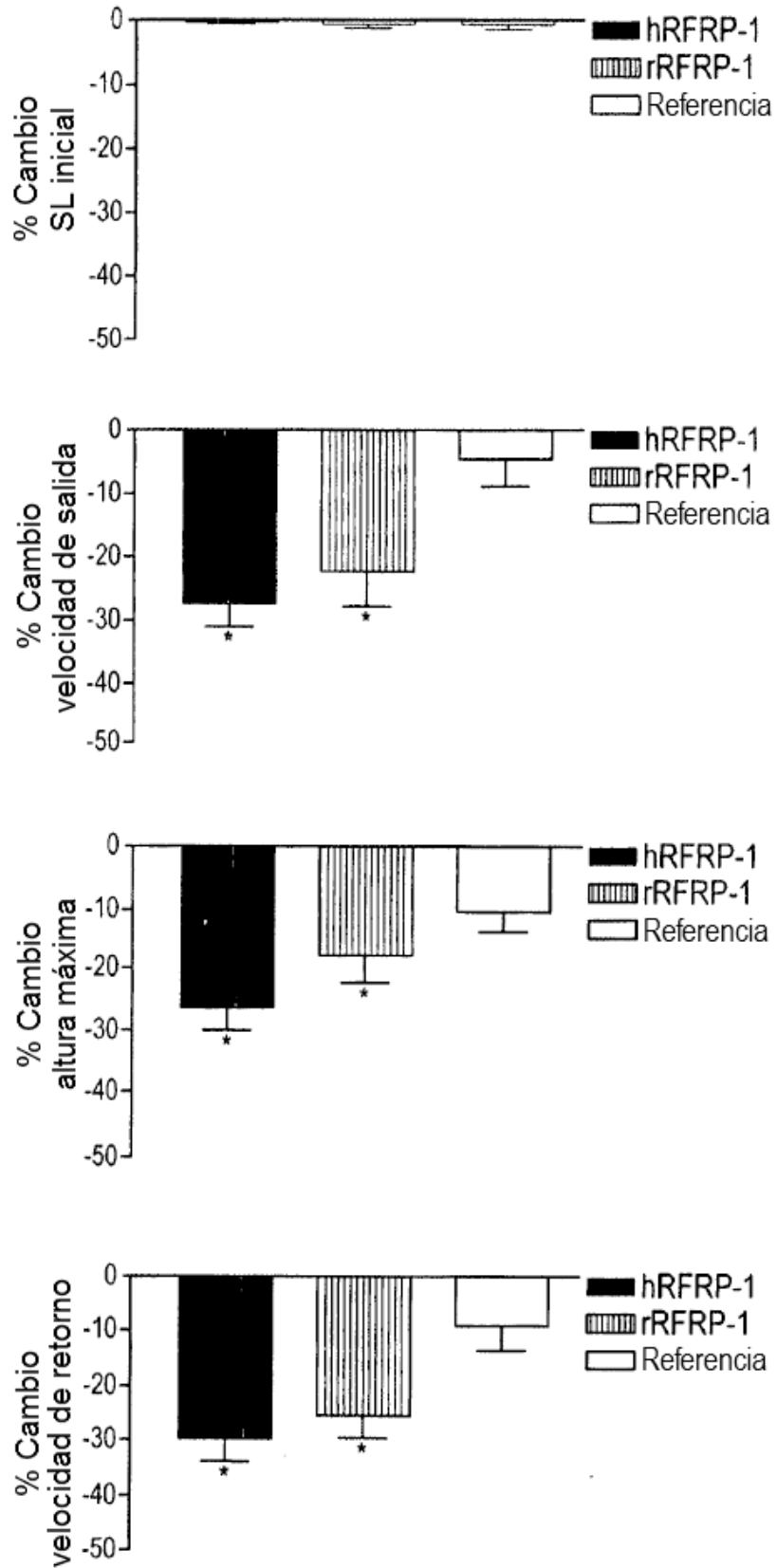
**Figura 1**



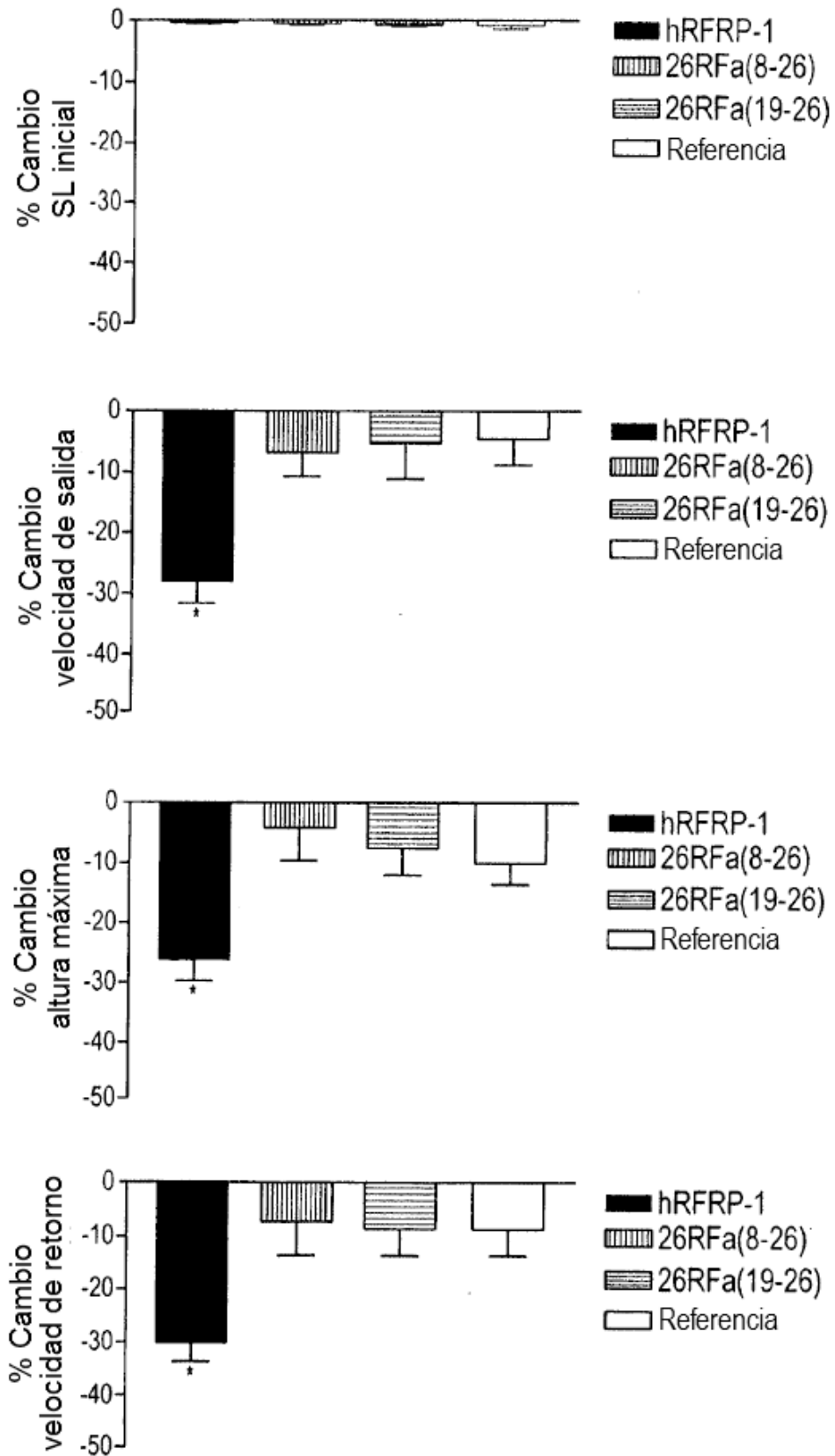
**Figura 2**



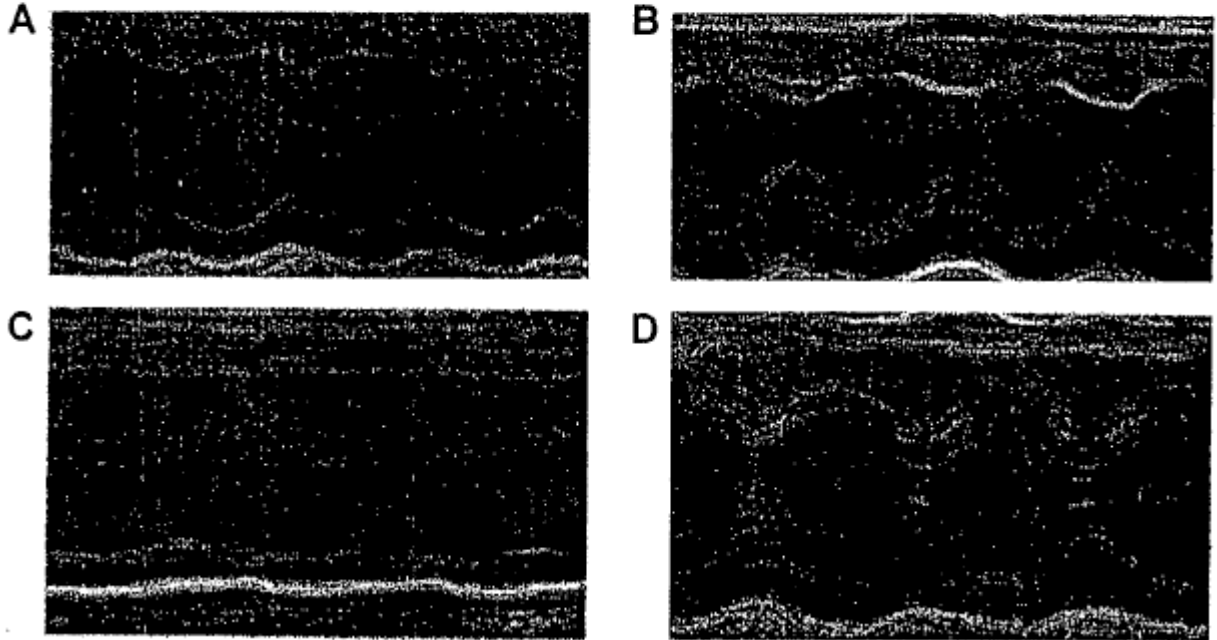
**Figura 3**



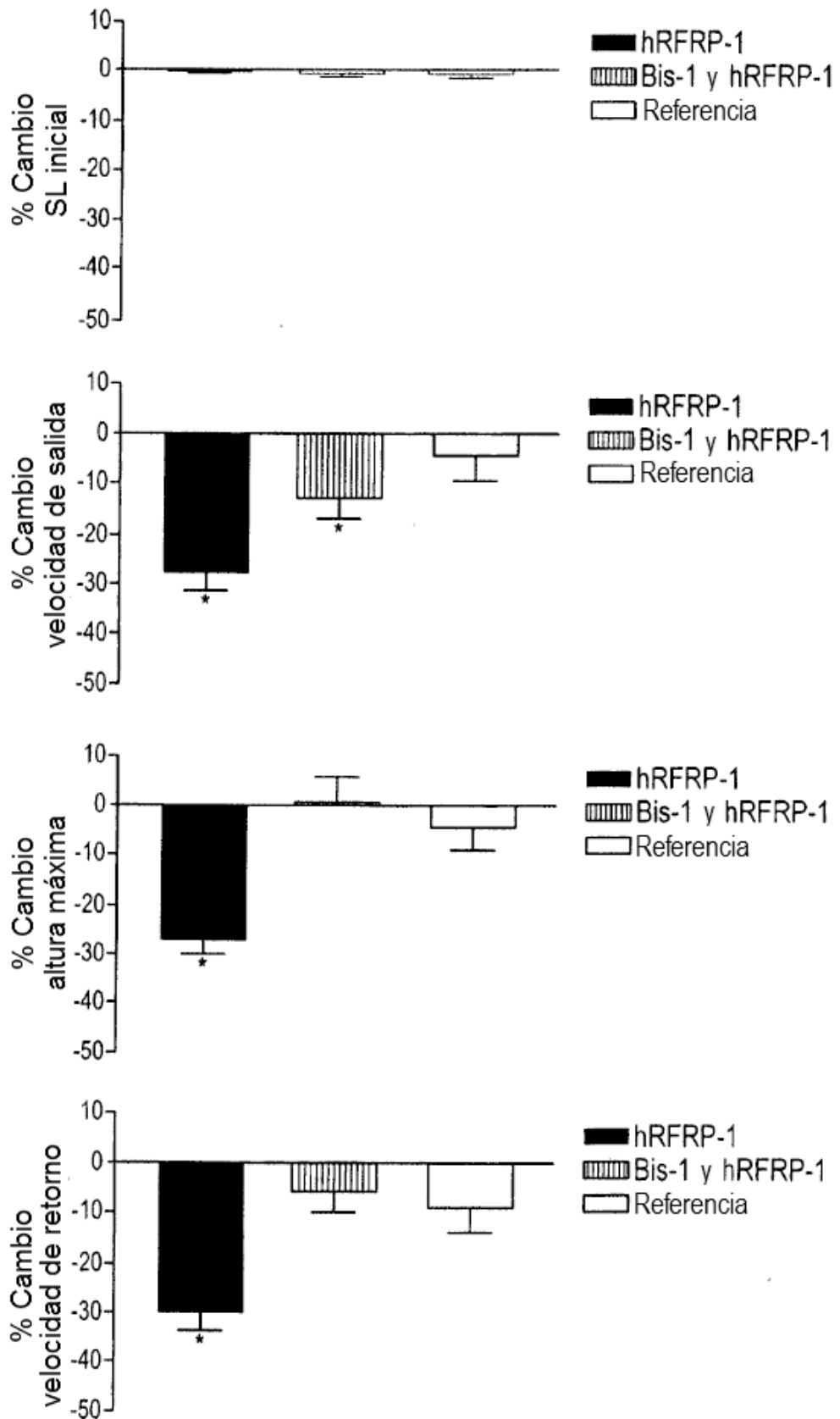
**Figura 4**



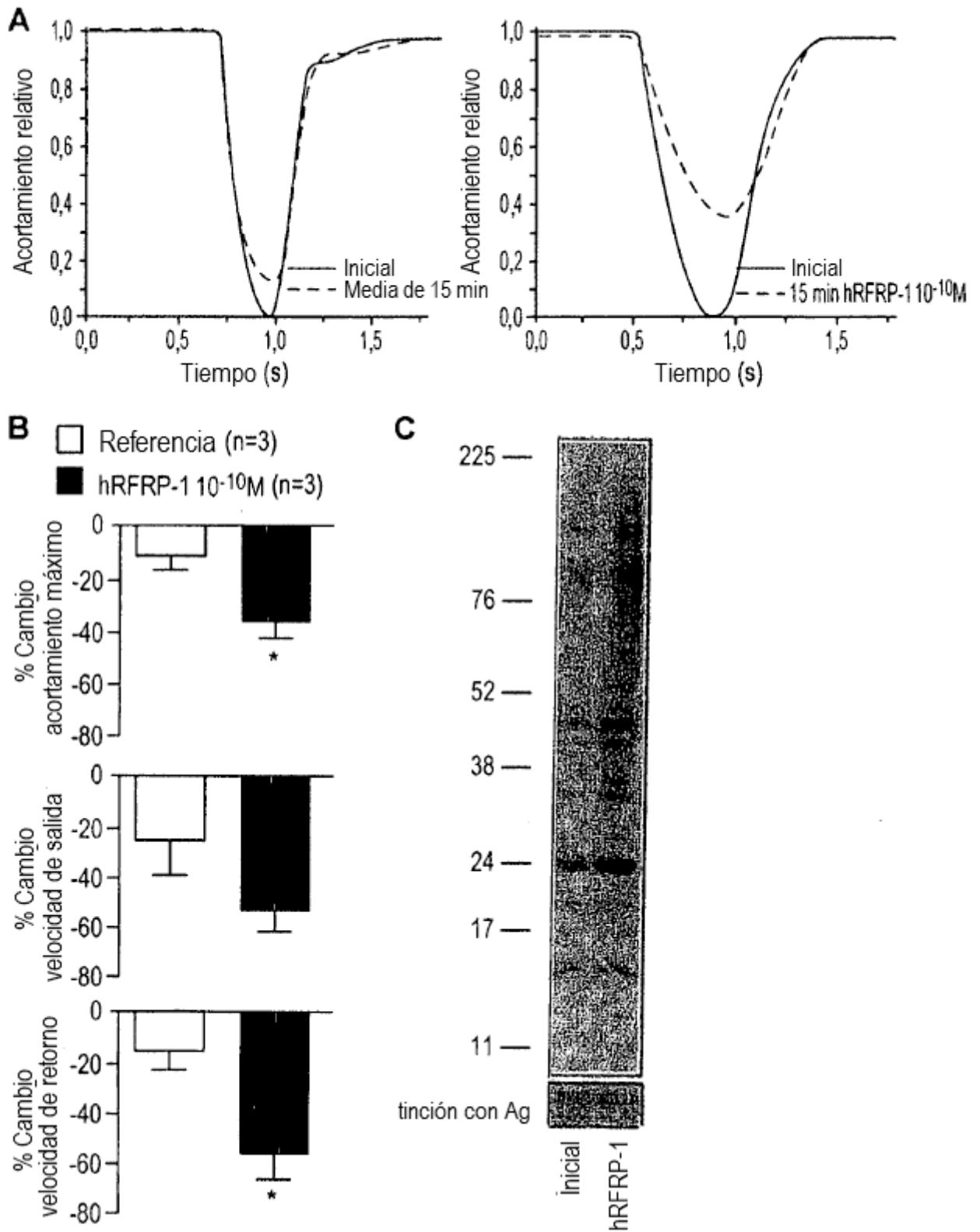
*Figura 5*



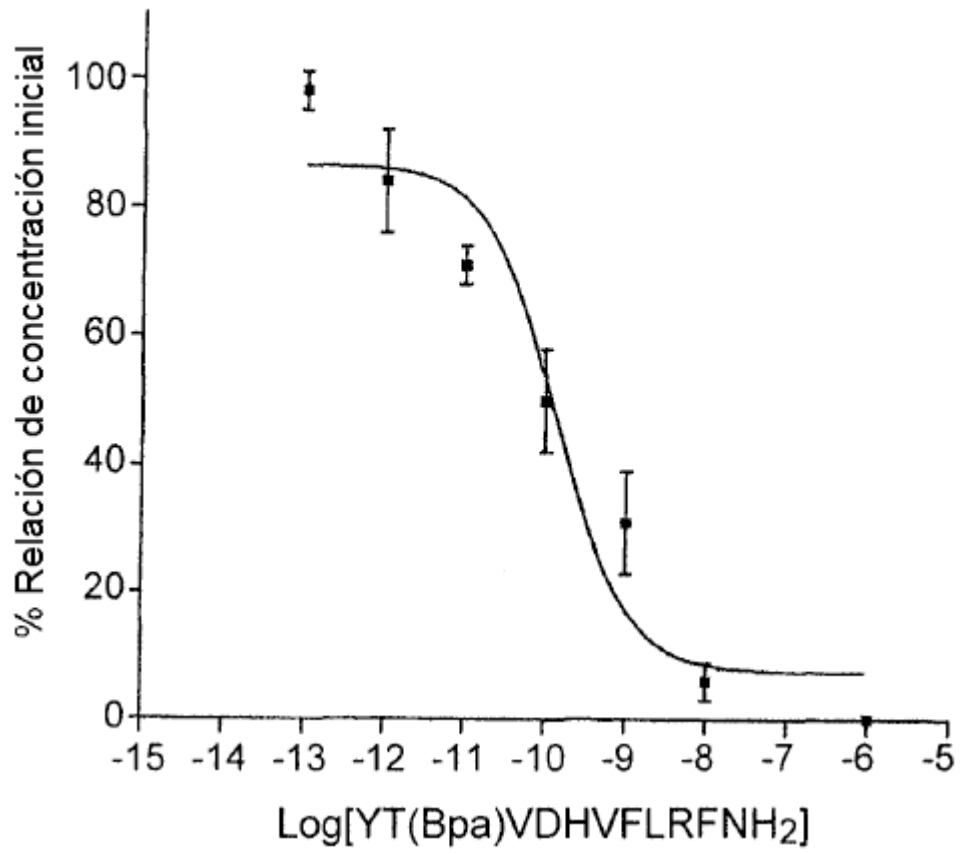
**Figura 6**



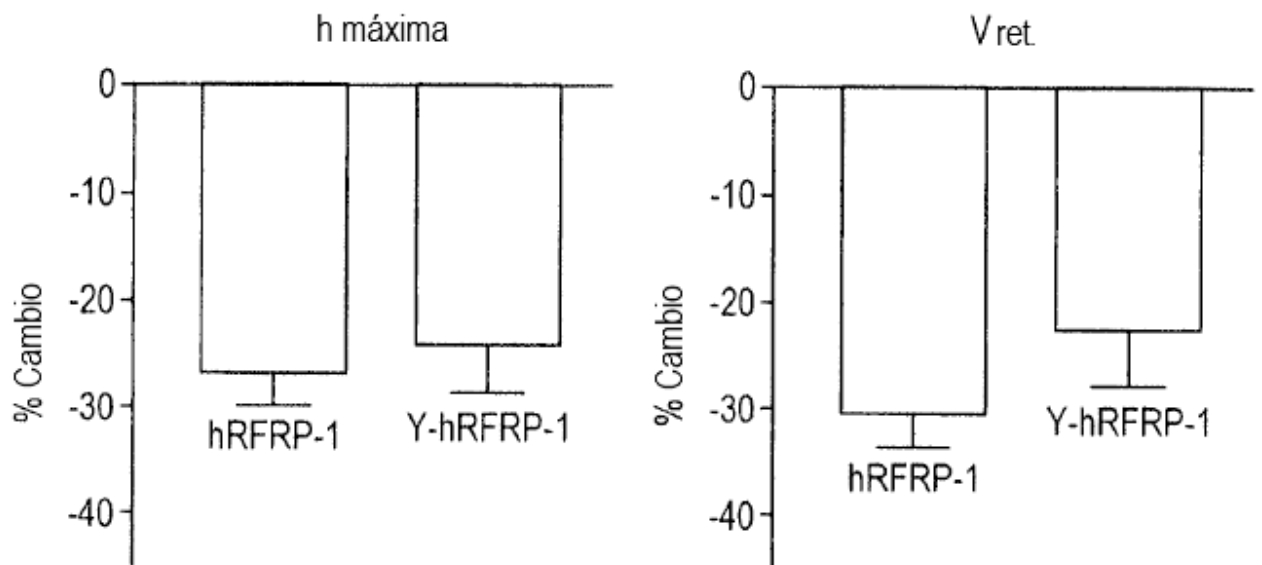
**Figura 7**



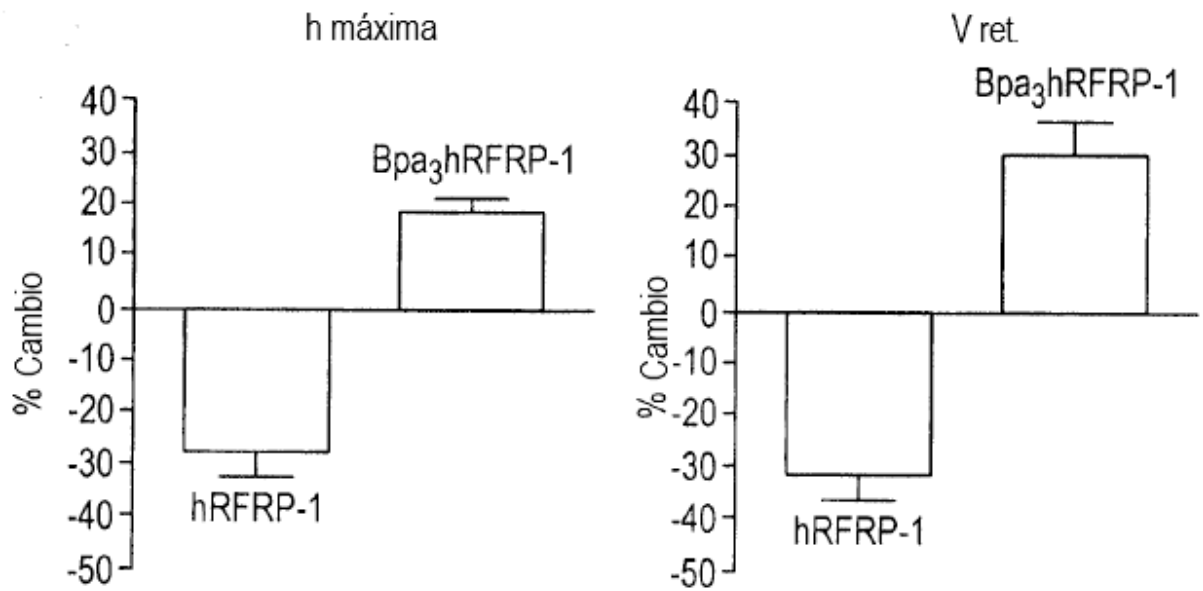
**Figura 8**



**Figura 9A**

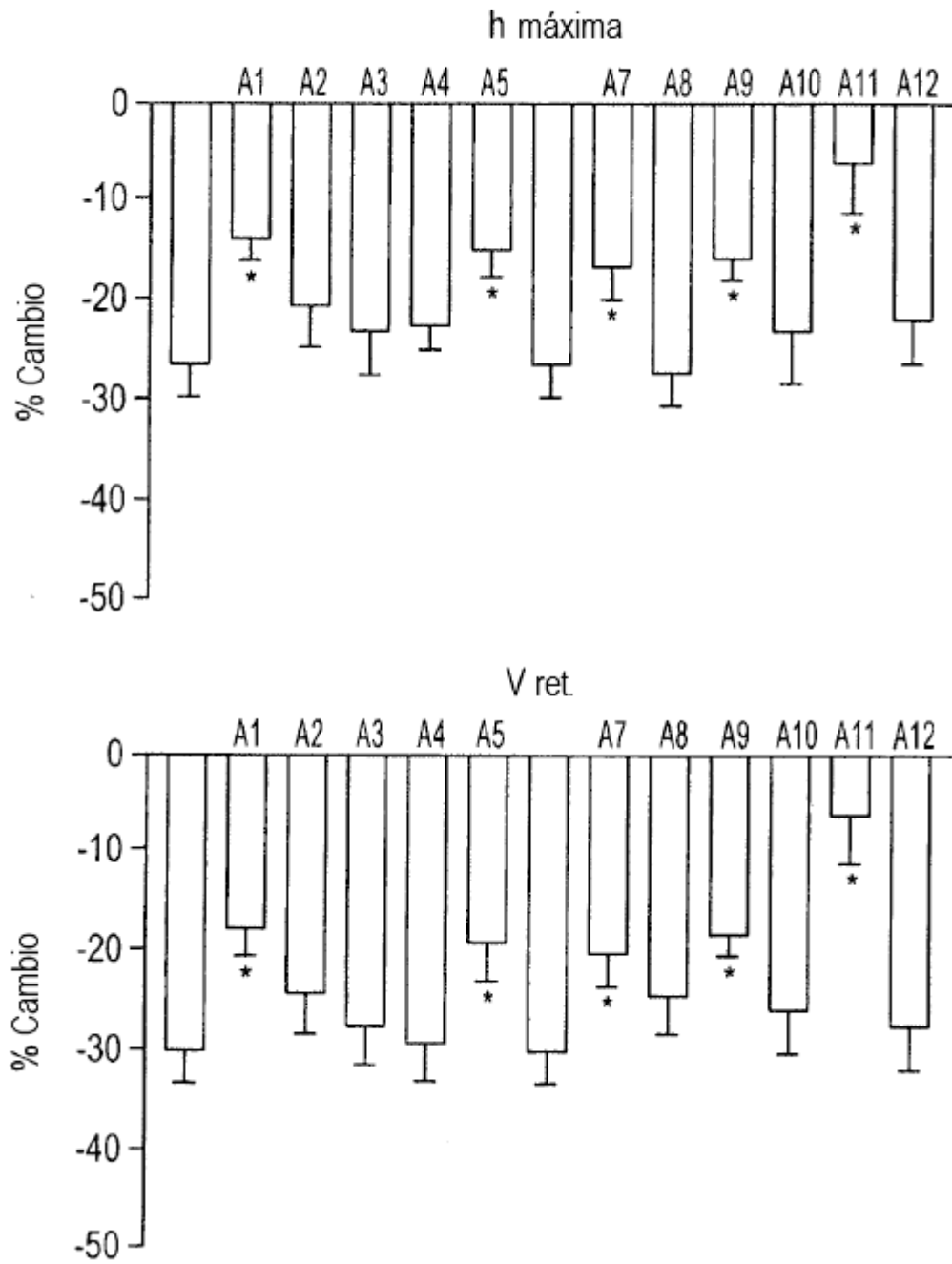


**Figura 9B**

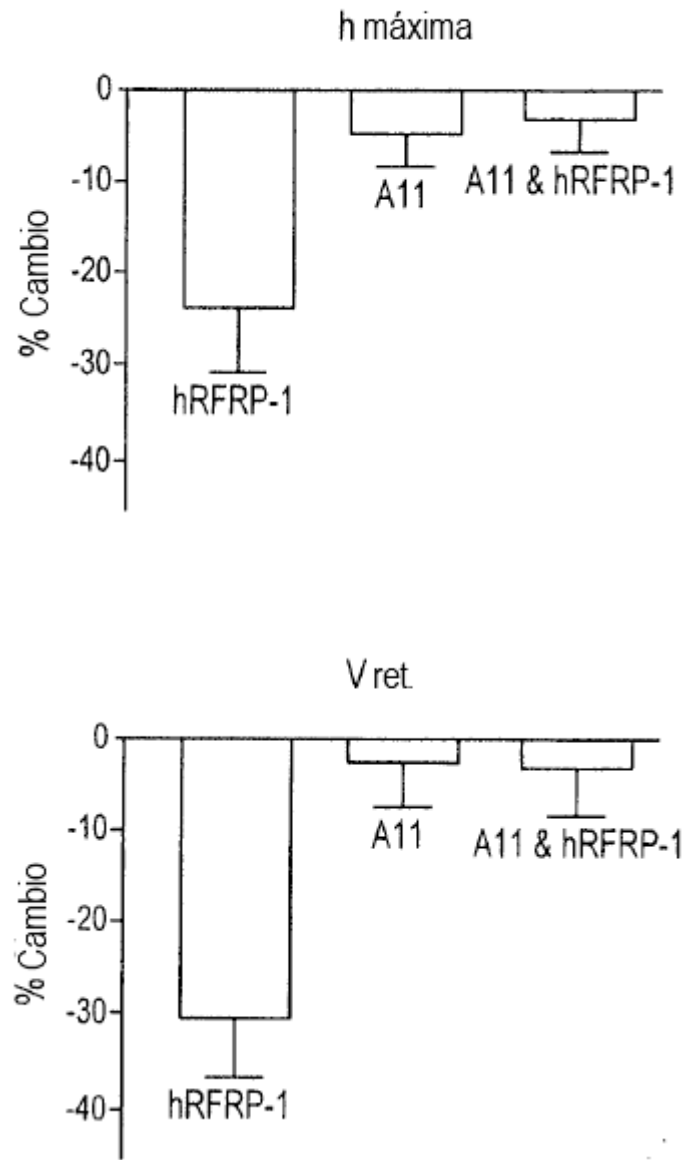




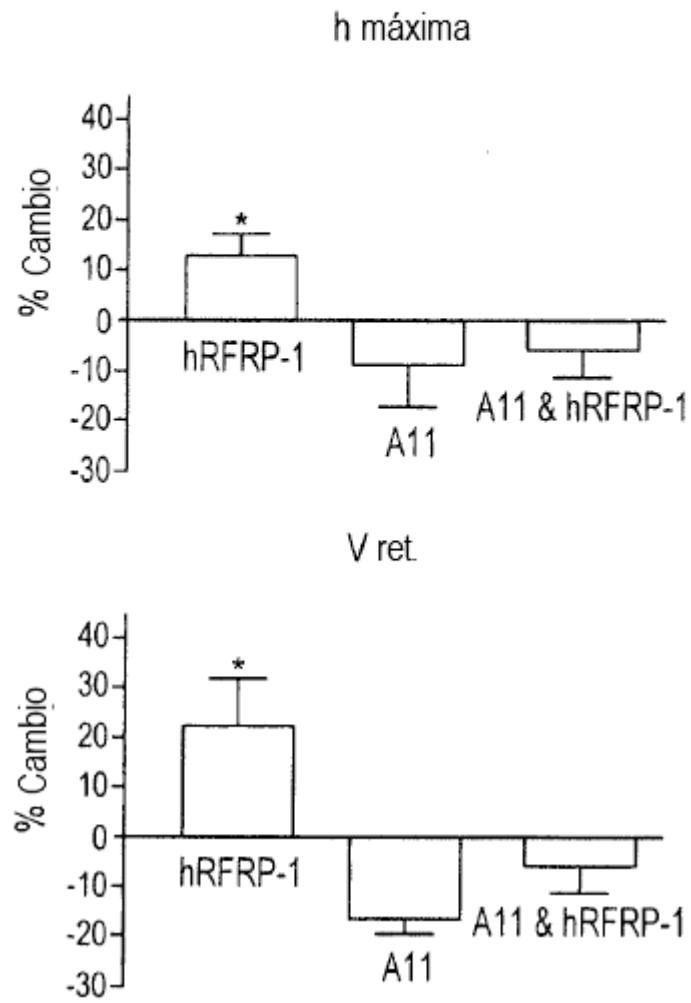
**Figura 10**



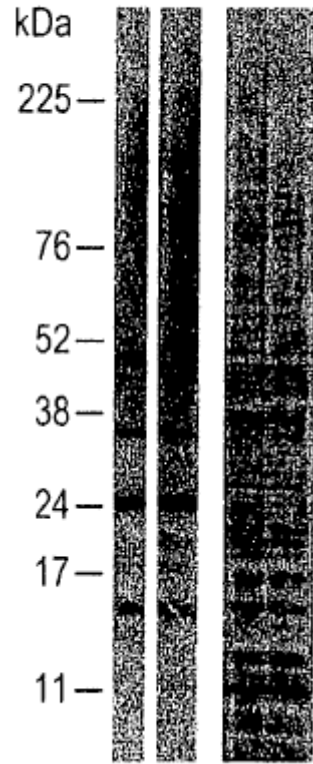
**Figura 11**



**Figura 12**



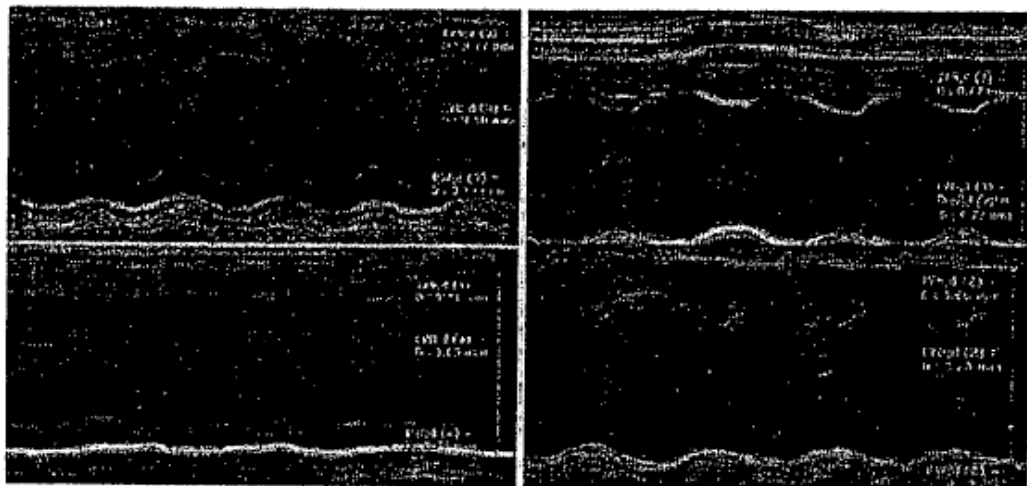
**Figura 13**



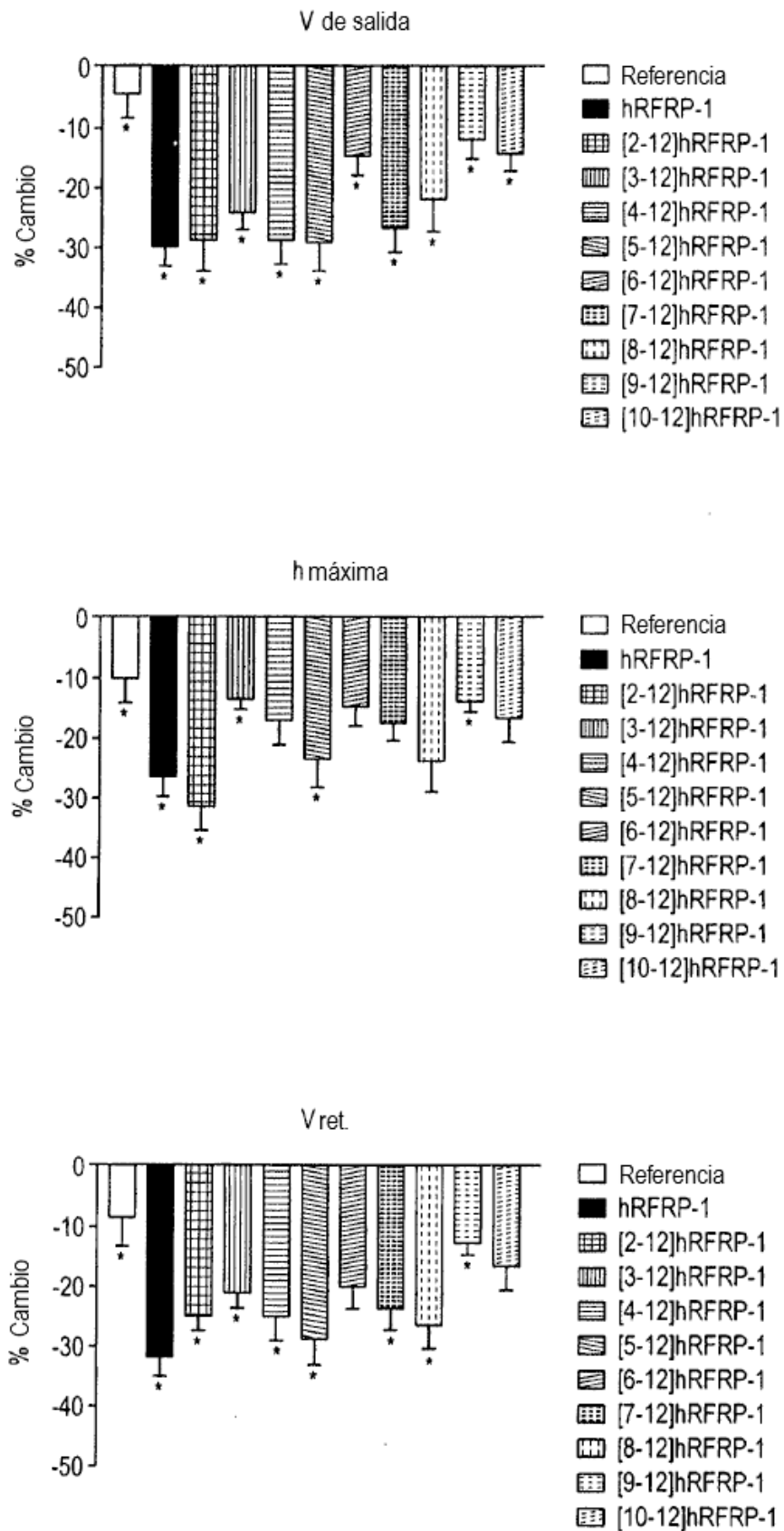
**Figura 14**

Resultados de ecocardiografía en ratón en respuesta a inyecciones en la vena de la cola

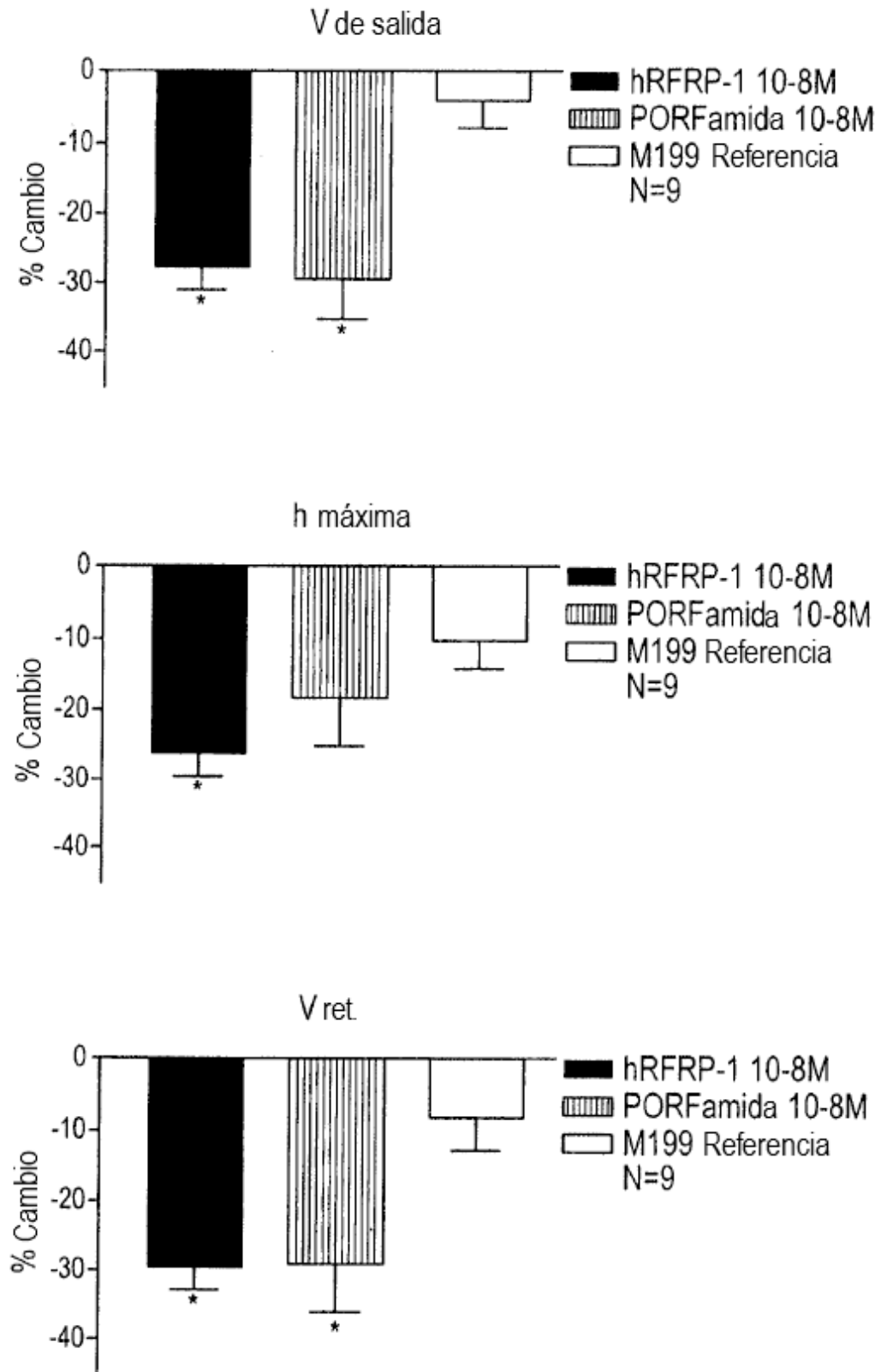
|                            | FC (lpm) | LVD (mm <sup>2</sup> ) | VS (μl/lat) | FE % | GC (ml/mm) |
|----------------------------|----------|------------------------|-------------|------|------------|
| Solución salina            | -3%      | -31%                   | +22%        | +25% | +9%        |
| hRFRP-1 10 <sup>-8</sup> M | -64%     | +36%                   | -75%        | -60% | -91%       |



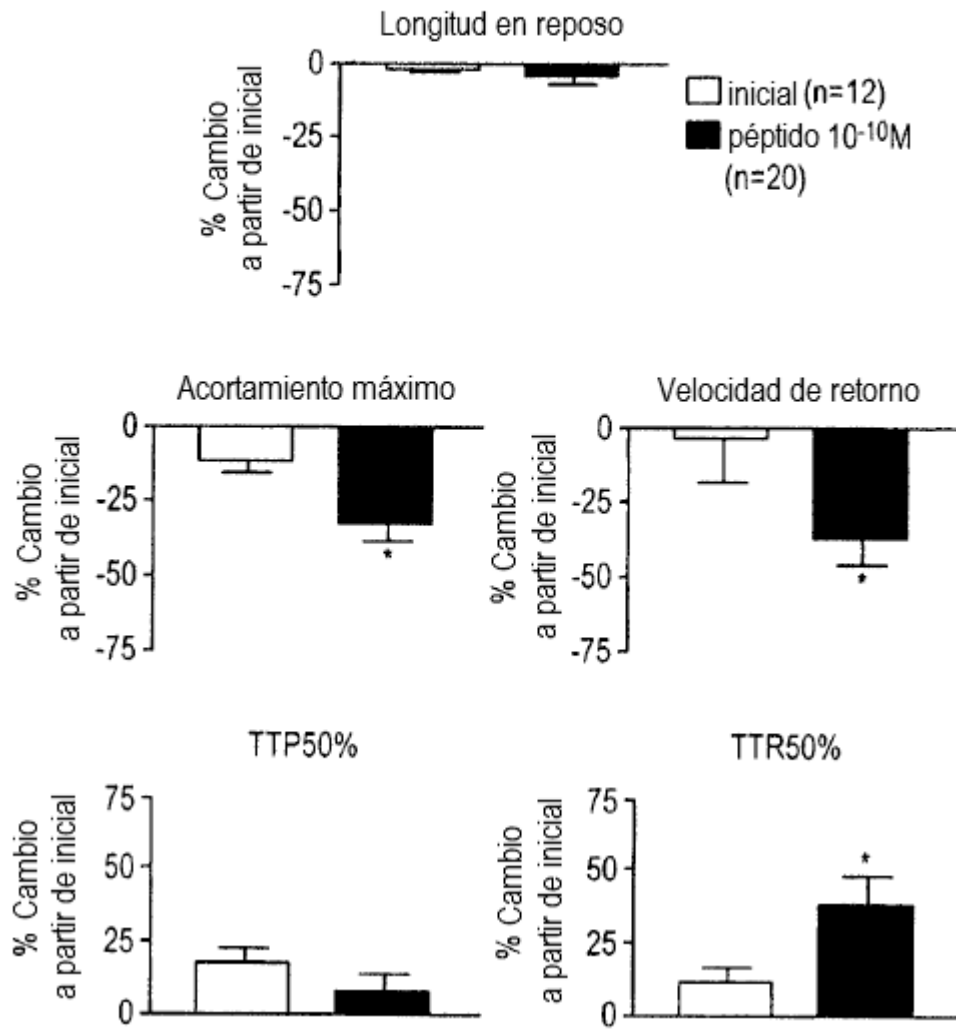
**Figura 15**



**Figura 16**

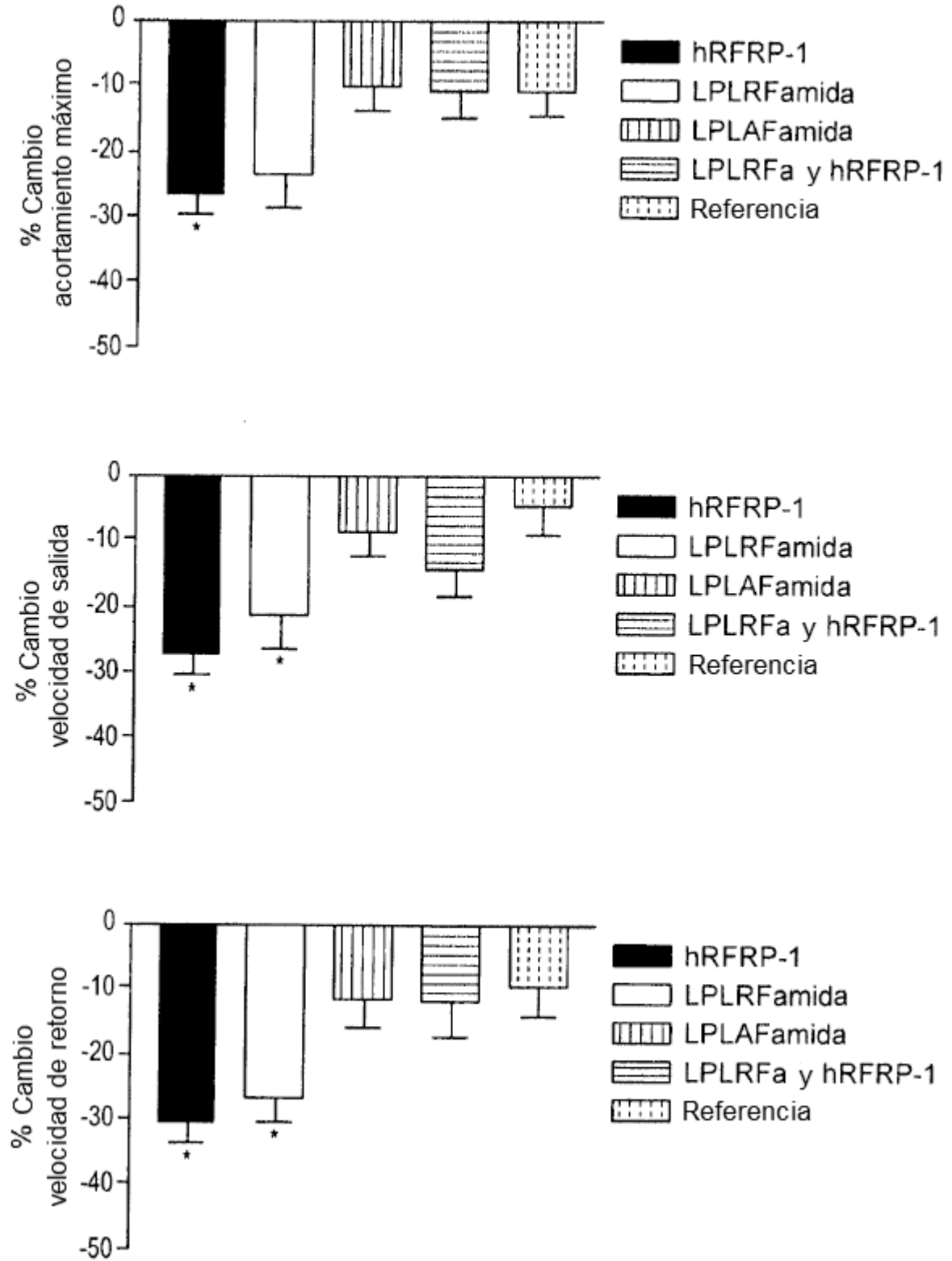


**Figura 17**





**Figura 18**



**Figura 19**

