

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 328**

51 Int. Cl.:

C07K 7/04	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
A61K 38/08	(2009.01)
C12N 9/12	(2006.01)
A61P 25/16	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2017 PCT/IB2017/051460**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17158502**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2017 E 17712249 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3430026**

54 Título: **Compuesto de péptido farmacológicamente activo, procedimiento de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

14.03.2016 IT UA20161610

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

26.02.2021

73 Titular/es:

**MESSINA, ANGELA ANNA (14.3%)
Via Cervignano n. 32
95129 Catania, IT;
DE PINTO, VITO NICOLA (14.3%);
MAGRI', ANDREA (14.3%);
REINA, SIMONA (14.3%);
GUARINO, FRANCESCA MARIA (14.3%);
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE E
BIOTECNOLOGICHE (14.3%) y
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOLOGICHE
GEOLOGICHE E AMBIENTALI (14.3%)**

72 Inventor/es:

**MESSINA, ANGELA ANNA;
DE PINTO, VITO NICOLA;
MAGRI', ANDREA;
REINA, SIMONA y
GUARINO, FRANCESCA MARIA**

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 808 328 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

Compuesto de péptido farmacológicamente activo, procedimiento de preparación y uso del mismo

Sumario de la invención

5 El objeto de la invención es un compuesto de péptido farmacológicamente activo, en particular un péptido sintético que ha de ser utilizado como medicamento y composiciones que comprenden dicho péptido sintético. Además, la invención versa acerca de procedimientos para la producción de tal péptido sintético.

Antecedentes técnicos de la invención

Las patologías neurodegenerativas son un amplio número de trastornos del sistema nervioso central (SNC), que muestran como un rasgo común una degeneración crónica y selectiva y la muerte de la célula neuronal.

10 Entre las enfermedades neurodegenerativas, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como "enfermedad de Lou Gehrig", "enfermedad de Charcot" o "enfermedad de la motoneurona", es la enfermedad más común de la motoneurona que surge en adultos. La ELA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que provoca la degeneración y la muerte de las motoneuronas, es decir, las células nerviosas del cerebro y las células de la médula espinal que controlan los músculos voluntarios. La progresión de la enfermedad varía entre pacientes,
15 con efectos invariablemente graves sobre la calidad de vida y la esperanza de vida del paciente. El paciente perderá progresiva e irreversiblemente la deglución normal (disfagia), el habla (disartria), el control de los músculos esqueléticos y una parálisis con una extensión variable, que llega al bloque de músculos respiratorios, lo que requiere, consiguientemente, una respiración artificial y provoca finalmente la muerte.

20 En los últimos 30 años, ha aumentando la incidencia (es decir, el número de nuevos casos diagnosticados) de ELA. Se considera ahora que la tasa de incidencia es de 2-4 casos por 100.000 personas/año y la prevalencia, en los países occidentales, es de 10 casos por 100.000 personas.

En Italia existen, en la actualidad, 6.000 pacientes.

25 Las causas de la enfermedad son desconocidas: sin embargo, se acepta de forma generalizada que la ELA es una enfermedad multifactorial. Los factores genéticos desempeñan un papel importante en la ELA: hay más de 30 genes, cuyas mutaciones han sido asociadas con la enfermedad. Se sospecha que otros factores medioambientales y comportamientos de estilo de vida añaden factores de riesgo al inicio de la enfermedad.

30 Es sabido que las mutaciones en el gen *sod1*, correlacionadas con el cromosoma 21q22, están asociadas con aproximadamente un 10% de casos de ELA. El gen humano *sod1* codifica la enzima superóxido dismutasa-1, hSOD1, (EC 1-15-1-1, OMIM nº 147450). La SOD1 es una enzima antioxidante citoplasmática importante, expresada de forma omnipresente en el organismo y es un miembro de las enzimas oxidorreductasas. El papel fisiológico de SOD1 en diversos compartimentos celulares es metabolizar radicales superóxidos (O_2^-), producidos mediante diversas vías, formando oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), proporcionando, de esta manera, una defensa contra la toxicidad de los superóxidos aniónicos.

35 Se han asociado más de 160 mutaciones genéticas en el gen *sod1* con la ELA y se han descrito al menos 5 linajes distintos de herencia. El mecanismo aceptado de forma más generalizada de toxicidad de SOD1 mutado está vinculado con el mal plegamiento de la enzima (es decir, un plegamiento erróneo de la proteína recién sintetizada), dando lugar a una acumulación de agregados insolubles en las motoneuronas. Los cuerpos de agregados proteicos, durante la enfermedad, se acumulan de forma progresiva en el citosol de las motoneuronas, provocando, al final, la muerte celular. Este mecanismo patógeno encontrado en la ELA es similar al encontrado en otras enfermedades neurodegenerativas. En ratones transgénicos que expresan el SOD1 mutado también se ha descrito una agregación de proteínas similar en motoneuronas, y esto da lugar a un síndrome similar a la ELA: por esta razón tales cepas murinas con SOD1 mutado son aceptadas de forma generalizada como modelos animales de ELA. En particular, el ratón transgénico que sobreexpresa el SOD1 mutante G93A (SOD1-G93A) es el modelo animal de ELA más utilizado en exploraciones selectivas de fármaco dirigido terapéutico.

45 Las vías moleculares implicadas en la fisiopatología de ELA son diversos como, por ejemplo: la agregación de proteínas mal plegadas, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad, la apoptosis, la autofagia, el estrés oxidativo, el transporte axonal alterado, la regulación y la edición de la síntesis de ARN. Uno del nudo más central de la enfermedad a nivel celular es la disfunción mitocondrial, dado que las mitocondrias son entidades cruciales en la producción energética, en el metabolismo, en la homeostasis de Ca^{2+} y señalización, en la red de tomadores de decisiones apoptóticas. En consecuencia, está bien establecido que los daños de las mitocondrias se encuentran entre las causas destacadas de neurodegeneración, incluyendo las enfermedades de ELA, de Parkinson y de Alzheimer. En efecto, se ha descubierto que la degeneración de mitocondrias es un síntoma precoz en la degeneración de las motoneuronas, que aparece mucho antes que los síntomas clínicos.

55 Las moléculas de SOD1 mutante, debido a su propensión a un mal plegamiento, pueden agregarse con facilidad para formar cuerpos insolubles que se asocian al lado citoplasmático de la membrana mitocondrial externa (OMM).

Este fenómeno es específico de las motoneuronas. Los agregados de proteína SOD1 mutante obstruyen la permeabilidad de la membrana, bloqueando el intercambio normal de iones y de metabolitos entre los dos lados de la membrana: esta acumulación, a su vez, tiene un impacto sobre las características bioenergéticas normales de la organela y provoca su disfunción y degeneración (Shi P. y otros, *J Alzheimer's Dis* (2010) 20 Supl 2:S311-24; Shi P. y otros, *Biochim Biophys Acta* (2010) enero; 1802(1):45-51; Tan W y otros, *Biochim Biophys Acta* (2014) 1842: 1295-1301).

Es sabido que el SOD1 mutante, pero no el SOD1 de tipo salvaje (es decir, no mutante) (SOD1WT), se une a VDAC1, una proteína principal ubicada en la OMM. Las VDAC son proteínas transmembranales formadoras de poros de la OMM, con el papel esencial de permitir la permeabilidad de la membrana a pequeños metabolitos, nucleótidos, iones, agua. En estudios que caracterizaron la interacción entre la OMM y el SOD1 mutado, o entre VDAC1 y el SOD1 mutado, se descubrió que el SOD1 mutado se une específicamente a la VDAC1 en la médula espinal, pero no en otros distritos neurológicos, como el cerebro, en un ratón de ELA. Además, se mostró una influencia directa sobre la capacidad de conductancia de VDAC 1 en sistemas *in vitro* en presencia de SOD1 mutado, confirmando la unión de la enzima a la proteína de canal. Esta unión es específica del SOD1 mutado, dado que el SOD1 wt no puede ejercer la misma inhibición. Es un efecto presente en una etapa presintomática de la enfermedad. La inhibición del SOD1 mutante de la conductancia de VDAC1 tiene el mismo tamaño de la inhibición resultante de la completa delección del gen *vdac1*.

La inactivación del gen *vdac1* acelera el inicio de la enfermedad, reduciendo en dos meses la supervivencia del ratón SOD1G37R/*VDAC1*^{+/-} de ELA, un ratón que expresa el SOD1 que tiene la mutación G37R junto con una forma heterocigota de *VDAC1*, y del ratón SOD1G37R/*VDAC1*^{-/-} de ELA, un ratón que carece completamente de cualquier expresión de *VDAC1*.

En la actualidad, no existe ninguna terapia contra la ELA.

Algunas moléculas que se propone que sean potenciales agentes terapéuticos contra la ELA están siendo estudiadas en la actualidad, pero muestran desventajas relevantes, junto con actividades favorables.

Se ha utilizado Dexamipexol, por ejemplo, un fármaco utilizado en la enfermedad de Parkinson, para contrarrestar una disfunción mitocondrial y un estrés oxidativo. No obstante, ensayos clínicos han mostrado que el Dexamipexol carece de cualquier eficacia en pacientes de ELA y es incluso ineficaz para ralentizar la enfermedad y proporcionar alivio de cualquier síntoma. Resultados sin éxito similares han mostrado que otras moléculas como la oleoxima y la creatina, utilizadas como estimuladoras de la función mitocondrial.

Además del trastorno metabólico también parece que la neuroinflamación desempeña un papel predominante en la etiología de la ELA (y otras enfermedades neurodegenerativas). En efecto, se ha descubierto en el cerebro y en la médula espinal de pacientes de ELA la inflamación avanzada de microglia y la presencia de células inmunitarias derivadas de la sangre. Estas células son estimuladas para liberar moléculas citotóxicas, implicadas en la muerte de las motoneuronas. Los macrófagos también pueden dañar las motoneuronas tras su invasión del SNC donde también pueden liberar moléculas tóxicas. Los macrófagos pueden reclutar, además, linfocitos T CD4, impulsores de una reacción inmunitaria mediada por los linfocitos B y CD8 hacia las neuronas. Existen en la actualidad varios ensayos clínicos o preclínicos con moléculas dirigidas a linfocitos T, microglia o macrófagos. Entre ellos, el Fingolimod, un fármaco autorizado para la terapia de esclerosis múltiple (EM), no muestra ninguna actividad en la ELA. Otros fármacos con una actividad similar contra los linfocitos T son CDP7657 (un modulador de las células T, anti-CD40L) y Tocilizumab, un fármaco biológico autorizado para la artritis reumatoide: muestran resultados contradictorios en la forma esporádica de ELA (ELAE). Otro ejemplo es NP001, que reduce la activación de macrófagos, y carbonato de litio, un compuesto inorgánico clásico, utilizado contra trastornos bipolares y la depresión, cuyo uso en ELA se ha descubierto que no influye sobre el avance de la enfermedad ni en la supervivencia. El Masitinib (un inhibidor de la quinasa dirigido al receptor de cKIT del factor celular estaminal (SCF), utilizado para detener la producción de citoquina y la migración de mastocitos), y el clorhidrato de Fasudil (inhibidor de ROCK, proteína quinasa asociada a Rho, que se ha demostrado que reduce la migración de células astrogliales y microgliales a la médula espinal) han sido utilizados para tratar una enfermedad inflamatoria incluyendo EM, pero han demostrado no ser eficaces en ELA. También se encuentran bajo investigación para la ELA, GSK2606414 (un inhibidor de PERK, quinasa similar a la proteína quinasa R, y, por consiguiente, de la muerte neuronal mediante la inhibición de una acumulación de TDP43), Kenpaullone (inhibidor de varias quinasas dependientes de ciclina como GSK3 α , una glucógeno sintasa quinasa que reduce la apoptosis neuronal y la acumulación de SOD1 mutado), Neurimmune NI204 (un MAb a la acumulación de SOD1 mal plegado en motoneuronas).

En otra clase de moléculas se ha propuesto que se podrían utilizar SOD1RX, un ARN antisentido dirigido al ARNm del SOD1 mutado, y C9orf72, un oligonucleótido antisentido contra la repetición de secuencia en el gen C9ORF72, en ELA para reducir la acumulación de proteínas mal plegadas. Sin embargo, estos compuestos presentan limitaciones fuertes, dado que no funcionan sobre repeticiones muy cortas o, por desgracia, no muestran ningún resultado productivo en la reducción de los niveles de expresión del gen diana. Otros compuestos que han de ser sometidos a ensayo son Nuedexta (tiene como diana el receptor sigma 1 de las neuronas) y GM604, un regulador de moléculas, ambos supuestamente protectores de las neuronas.

En la actualidad se dedica una atención considerable a la terapia celular. Una de las estrategias de estas terapias es la sustitución de astrocitos tóxicos por un trasplante de astrocitos normales o de células estaminales neuronales (NSC). En este tipo de tratamiento, cabe esperar la inyección en la médula espinal de astrocitos diferenciados por fibroblastos o incluso astrocitos derivados de un embrión humano. Los resultados de cocultivos experimentales de motoneuronas junto con astrocitos diferenciados de fibroblastos cutáneos de pacientes de ELA sugieren que los astrocitos tóxicos pueden ser letales únicamente en alguna forma esporádica de ELA. Las terapias celulares concebidas pueden ser muy complicadas y sumamente costosas. Los ensayos clínicos de terapias de NSC sugieren un potencial papel activo de fármacos antirrechazo utilizados durante la terapia. Por lo tanto, los inmunosupresores también están siendo investigados para un tratamiento de ELA. Por desgracia, estos últimos compuestos no parece que sean muy bien tolerados por los pacientes.

Otros mecanismos patoetiogénicos se encuentran bajo investigación como una posible diana terapéutica en ELA y se han realizado más preensayos o ensayos clínicos. Ha comenzado a estudiar la eficacia de Ozanezumab para luchar contra la degeneración de la unión neuromuscular en ELA. Ozanezumab es una NOGO-A dirigida a anticuerpos monoclonales, una proteína que contrasta el crecimiento axonal y cuya expresión se ha descubierto que está en ELA. Otras moléculas están siendo consideradas debido a que podrían mejorar las condiciones de vida o la esperanza de supervivencia de los pacientes. Se cree que esto se logra mediante una mejora directa o indirecta de la salud de las neuronas. Algunas moléculas parecen limitar daños adicionales a las neuronas, ralentizando de esta forma la progresión de la enfermedad. El Mexitileno actúa inhibiendo el canal de sodio y reduciendo, de esta manera, su hiperexcitación. El Tirasemvit es un activador selectivo de la troponina y modulador de la contractilidad de los músculos esqueléticos, pudiendo mejorar, de esta manera, la sensibilidad al calcio. Por lo tanto, se propuso que el Tirasemvit podría mejorar la fuerza de varios músculos esqueléticos, en particular aquellos responsables de la respiración: por desgracia, los experimentos sobre ratones modelo de ELA no confirmaron tal capacidad.

El único medicamento autorizado contra la ELA, hasta la fecha, por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE. UU. es Riluzol, cuya administración tiene capacidad para ampliar la esperanza de vida únicamente algunos meses, sin ningún efecto sobre la pérdida de fuerza de los músculos esqueléticos. Es probable que Riluzol reduzca la liberación de glutamato: la sobrecarga de glutamato sea uno de los mecanismos de degeneración de las motoneuronas. Por desgracia, un análisis estadístico mostró que el mejor resultado de una administración de Riluzol es la ampliación deficiente de la esperanza de vida de aproximadamente tres meses (Cochrane Database System Review, 14 de marzo de 2012; (3): CD001447). En general, es posible concluir que en la actualidad hay en marcha muy pocos ensayos clínicos, si los hay, con una probabilidad razonable de impacto sobre la ELA. Una necesidad urgente de nuevas estrategias y de nuevos planteamientos terapéuticos para desarrollar acciones terapéuticas contra la ELA y, en general, enfermedades neurodegenerativas es, por lo tanto, una responsabilidad de la comunidad científica.

Objetos de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto farmacológicamente activo para tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y, en general, enfermedades neurodegenerativas que aparecen en una edad adulta como la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA). Un objeto de la presente invención también es proporcionar un compuesto farmacológicamente activo eficaz para mejorar la esperanza de vida de pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas, ELA en particular.

Un objeto de la presente invención también es proporcionar un compuesto farmacológicamente activo eficaz para reducir los síntomas en pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas, ELA en particular.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un compuesto farmacológicamente activo eficaz para ralentizar la progresión de la enfermedad en pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas, ELA en particular.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un compuesto farmacológicamente activo eficaz para enfermedades neurodegenerativas, ELA en particular, cuya producción es sencilla, rápida y económica.

Descripción de la invención

Se obtienen estos y otros objetos que serán especificados con más detalle en la siguiente descripción mediante un péptido farmacéuticamente activo: el péptido sintético de secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1). Aquí también se da a conocer un péptido sintético que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90% de la identidad de la secuencia u homología con la secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1). En la divulgación, dicho péptido sintético tiene una identidad de secuencia con la secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1) comprendida entre un 95 y un 99%. Se ha observado, sorprendentemente, en la invención, en efecto, que el péptido con la secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1), también denominado "NHK1", es capaz de contrarrestar la unión entre la proteína mitocondrial VDAC1 y formas mutantes de SOD1, evitando la degeneración mitocondrial asociada con la unión VDAC1-SOD1mut y, por consiguiente, el aumento de ELA o de otras enfermedades neurodegenerativas como de Parkinson (EP) y de Alzheimer (EA).

En efecto, se ha descubierto que el péptido sintético con una secuencia de aminoácidos IAAQLLAYYFT (ID de SEC. nº 1) según la invención y su homólogo definido anteriormente, es capaz de dificultar la interacción entre SOD1 mutado y VDAC1, y es capaz de contrarrestar la pérdida de viabilidad de células en las que se ha dañado la función mitocondrial por las formas mutadas de SOD1 y por la unión de estas moléculas mutantes a VDAC1. En la divulgación, el péptido sintético se caracteriza por tener una longitud entre 11 y 21 aminoácidos, preferiblemente entre 11 y 15 aminoácidos. Cuando el péptido tiene una longitud de 21 aminoácidos, su secuencia es la siguiente: MIAAQLLAYYFTELKDDQVKK (ID de SEC nº 9) dada a conocer en la base de datos Geneseq, 17-02-2011; número de referencia GSP:AJG39018. Cuando el péptido tiene una longitud de 15 aminoácidos, su secuencia es la siguiente: MIAAQLLAYYFTELK (ID de SEC nº 10) dada a conocer en la base de datos Geneseq, 19-02-2009, número de referencia AUL95755. En estas descripciones, se documentan las secuencias de aminoácidos en la dirección desde el N-terminal hacia el C-terminal; por ejemplo, en la secuencia IAAQLLAYYFT (ID de SEC nº 1), el residuo "I" (isoleucina) es el residuo N-terminal, mientras que el residuo "T" (Treonina) es el residuo C-terminal.

En una realización de la presente invención, en un procedimiento para la síntesis, se marca el péptido sintético con una sonda detectable.

Se considera una "sonda detectable" una molécula que puede ser detectada y localizada con técnicas disponibles: como ejemplo existen radioisótopos emisores, fluoróforos (proteicos y no proteicos) y etiquetas de proteínas. Estas sondas detectables son especialmente útiles debido a que permiten localizar con especificidad, precisión y facilidad el péptido al que están unidas, permitiendo una purificación más sencilla y/o haciendo más sencillo su estudio tanto *in vitro* como *in vivo*.

En una célula, por ejemplo, la sonda detectable permitirá, según la invención, hacer un "seguimiento" del péptido sintético con técnicas disponibles. En una realización preferida de la invención, el péptido sintético está unido a una sonda detectable escogida entre una etiqueta de HA (etiqueta de hemaglutinina), biotina e isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Un objeto de la presente invención también versa acerca del procedimiento para la síntesis del péptido según la invención, es decir con la secuencia IAAQLLAYYFT (ID de SEC nº 1): tal procedimiento utilizará al menos una etapa de alargamiento en la dirección desde el C-terminal hacia el N-terminal. En aras de la claridad, en el siguiente texto se denominará al procedimiento sintético "procedimiento químico" o "síntesis química".

En el procedimiento químico, la síntesis del péptido sintético se lleva a cabo desde el C-terminal hacia el N-terminal, es decir, en la dirección contraria que la síntesis ribosomal que es llevada a cabo, en cambio, desde el N-terminal hacia el C-terminal. Según la presente invención, la síntesis química desde el C-terminal hacia el N-terminal seguirá las siguientes etapas:

1) unión del primer aminoácido a un soporte sólido; la unión preferida al soporte sólido será mediante el grupo α -carboxílico del primer aminoácido;

2) alargamiento del péptido desde el C-terminal hacia el N-terminal, mediante la formación de un enlace covalente entre el grupo α -carboxílico de cada aminoácido añadido con el grupo α -amino del aminoácido que lo precede y, por lo tanto, forma el N-terminal del péptido en crecimiento; y

3) separación del péptido sintético del soporte sólido.

Al final, el aminoácido unido al soporte sólido en la fase 1) será el residuo C-terminal del péptido sintético, al final de la síntesis.

Como un ejemplo según una realización preferida, la síntesis química del péptido sintético desde el C-terminal hacia el N-terminal, en la presente invención, seguirá las siguientes etapas:

1) unión del primer aminoácido a un soporte sólido; la unión preferida al soporte sólido será mediante el grupo α -carboxílico del aminoácido;

2a) unión de un segundo aminoácido al primer aminoácido con la formación de un enlace peptídico entre el segundo aminoácido y el primer aminoácido; en otras palabras, el grupo α -carboxílico del segundo aminoácido forma un enlace covalente con el grupo α -amino del primer aminoácido;

2b) adición secuencial de aminoácidos que siguen al segundo: el grupo α -carboxílico de cada aminoácido forma un enlace covalente con el grupo α -amino del aminoácido precedente;

3) separación.

En este último ejemplo, el alargamiento en la dirección desde el C-terminal hacia el N-terminal comprende las etapas 2a) y 2b) descritas anteriormente; las etapas 2a) y 2b) son repetidas cíclicamente para cada aminoácido que sigue al primero (unido al soporte sólido), hasta que se obtiene la secuencia programada de aminoácidos.

El soporte sólido preferido que ha de ser utilizado en el procedimiento químico que produce la síntesis del péptido sintético desde el C-terminal hacia el N-terminal en la presente invención son resinas poliméricas inertes.

Ejemplos de resinas preferidas son el cloruro de 2-clorotritilo (resina de Cl) o, en general, resinas a base de poliestireno o de PEG, o de poliacrilamida.

5 Preferiblemente, los aminoácidos utilizados en el procedimiento sintético dirigidos desde el C-terminal hacia el N-terminal tienen el grupo α -amino N-terminal protegido por un grupo covalente unido. En este caso, el grupo protector puede ser eliminado a continuación, permitiendo la reacción con el siguiente aminoácido. La reacción preferida espera que el grupo protector sea eliminado del aminoácido poco después de que se una el aminoácido al residuo precedente en el péptido que ha de ser sintetizado.

10 Los ejemplos preferidos de grupos protectores son: 9-Fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) o terc-butiloxycarbonilo (t-Boc). El proceso sintético preferido del péptido según la invención es el procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) (R. B. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis. The Synthesis of a Tetrapeptide", Journal of the American Chemical Society, 1963, 85 (14): 2149, identificador de objeto digital (doi): 10.1021/ja00897a025).

15 Un objeto más de la presente invención es un procedimiento de la síntesis del compuesto peptídico de secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1): comprendiendo dicho procedimiento preferido al menos una etapa en la que se inserta al menos un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido sintético con la secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1) en al menos una célula. Se denominará a este procedimiento en el siguiente texto "procedimiento biotecnológico" o "síntesis biotecnológica".

20 Se escogen las células preferidas que han de ser utilizadas en la "síntesis biotecnológica" del péptido según la invención entre células eucariotas y/o procariontes, en particular son preferidas las células eucariotas.

La síntesis biotecnológica preferida prevista, comprende al menos una etapa de transfección de células eucariotas con al menos un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho péptido sintético.

Se prefiere que las células eucariotas sean células de mamíferos.

25 Se prefiere que las células eucariotas sean de líneas celulares estables, como ejemplo células HeLa, NSC34, SH-SY5Y, HEK293; como alternativa, también pueden utilizarse células iPSC. Las células iPSC son proporcionadas partiendo de células humanas adultas reprogramadas para convertirse en células madre e inducidas a ser motoneuronas. También se pueden utilizar iPS, es decir, células madre pluripotentes inducidas. Las células iPS son un modelo útil de enfermedad, debido a que son obtenidas de pacientes y, por lo tanto, contienen ellas mismas una o más mutaciones genéticas asociadas con la enfermedad.

30 Según la presente invención, el vector de expresión puede ser cualquier vector, de cualquier origen, útil para la clonación genética. Los vectores de expresión según la invención son vectores plasmídicos y virales. El vector preferido de expresión es un vector plasmídico. El péptido sintético tiene la secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1), comprendiendo el vector de expresión al menos la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido con la secuencia de aminoácidos IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1).

35 La secuencia preferida de nucleótidos que codifica el péptido con la secuencia de aminoácidos IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1) es: 5'-ATCGCCGCGCAGCTCCTGGCCTACTTCACTGGA-3' (ID de SEC nº 2). Dado que el código genético se degenera, se pueden utilizar igualmente otras secuencias de nucleótidos, distintas de la ID de SEC nº 2, para codificar la secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1).

40 Preferiblemente, la inserción de al menos un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido sintético en al menos una célula, preferiblemente una célula eucariota, se lleva a cabo con técnicas conocidas.

Un objeto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido sintético con la secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1).

45 Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención comprende otros agentes espesantes y/o aditivos utilizados habitualmente en la técnica farmacéutica.

La presente invención también versa acerca del péptido sintético IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1) que ha de ser utilizado como un medicamento (fármaco).

50 La presente invención también versa acerca del péptido sintético IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1) que ha de ser utilizado en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o, en general, de enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer.

Según se ha documentado anteriormente, en particular, dicho péptido sintético, que es el objeto de la presente invención, demostró una eficacia sorprendente a la hora de contrarrestar la unión entre la proteína mitocondrial VDAC1 y las formas mutadas de la proteína SOD1, evitando la degeneración mitocondrial debida a las interacciones entre estas dos proteínas.

5 Como consecuencia, el péptido sintético de la presente invención puede aplicarse, de forma ventajosa, en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Por lo tanto, la presente invención hace referencia a un péptido sintético con la secuencia IAAQLLAYYFT (ID de SEC. nº 1) que ha de ser utilizado como un medicamento (fármaco) para tratar enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente en ELA.

10 La presente invención también versa acerca del péptido sintético IAAQLLAYYFT (ID de SEC. nº 1) que ha de ser utilizado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer.

15 Según se ha documentado anteriormente, en particular, dicho péptido sintético, que es el objeto de la presente invención, demostró una eficacia sorprendente en la protección de las mitocondrias, evitando la degeneración mitocondrial, implicada en varias enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, ELA, enfermedades de Parkinson o de Alzheimer.

La presente divulgación también versa acerca del péptido sintético IAAQLLAYYFT (ID de SEC. nº 1) que ha de ser utilizado en un tratamiento contra el cáncer.

20 Según se ha documentado anteriormente, en particular, el péptido sintético que es el objeto de la presente invención demostró una interacción sorprendente con la proteína mitocondrial VDAC1 que es capaz de producir un efecto proapoptótico en células tumorales, provocando la muerte celular de células tumorales y, por lo tanto, bloqueando su proliferación.

25 Un objeto adicional de la invención es una mezcla farmacéutica que ha de ser utilizada como un medicamento (fármaco), que comprende el péptido sintético de la presente invención. Asimismo, un objeto de la presente invención es la composición farmacéutica que comprende el péptido sintético de la presente invención, que ha de ser utilizada como un medicamento (fármaco) para tratar enfermedades neurodegenerativas, en particular para tratar la ELA.

La presente divulgación también versa acerca de la composición farmacéutica que comprende el péptido sintético de la presente invención, que ha de ser utilizada como un medicamento (fármaco) en un tratamiento contra el cáncer.

30 Se describirá con detalle la presente invención con referencia a la siguiente parte experimental, únicamente como un objetivo explicativo, pero no limitada al mismo.

Los resultados experimentales se detallan en las Figuras adjuntas.

35 - La Figura 1 muestra un experimento de inmunotransferencia de un ensayo de interacción llevado a cabo entre perlas magnéticas que contienen moléculas VDAC1 que interactúan con SOD1-G93A (SOD1 mutante G93A) o SOD1WT (fenotipo de tipo salvaje). B: SOD1 unido a VDAC1; U: SOD1 no unido a VDAC1.

40 - La Figura 2 muestra un experimento de inmunotransferencia de un ensayo de interacción llevado a cabo entre perlas magnéticas que contienen moléculas VDAC1 que interactúan con SOD1-G93A en presencia del péptido NHK1, es decir, dicho péptido sintético objeto de la invención y con la secuencia IAAQLLAYYFT (ID de SEC. nº 1). B: SOD1 unido a VDAC1; U: SOD1 no unido a VDAC1.

45 - La Figura 3 muestra una traza electrofisiológica representativa (n=3) de VDAC1 incorporado en una bicapa lipídica plana artificial con una tensión aplicada de +25 mV en 1 M de KCl, antes y después de la adición del péptido NHK1. Tras la aplicación de tensión, la conductancia de VDAC1 es baja (estado cerrado); la adición de dicho péptido sintético objeto de la invención (NHK1) provoca una inestabilidad significativa de la conductancia del canal, que se abre y cierra con distintos eventos de diversos tamaños.

50 - La Figura 4 muestra un experimento de inmunotransferencia de un ensayo de interacción llevado a cabo entre mitocondrias aisladas de las células NSC34 con SOD1-G93A, en presencia de 60 µM de péptido NHK1, es decir, dicho péptido sintético objeto de la invención con la secuencia IAAQLLAYYFT (ID de SEC. nº 1). En presencia del péptido sintético, SOD1-G93A se une a mitocondrias en un grado mucho menor. S: fracción sobrenadante, es decir, la fracción que contiene moléculas no unidas a mitocondrias; M: fracción mitocondrial, es decir, la fracción que contiene mitocondrias y las moléculas unidas a ellas.

55 - La Figura 5 muestra: Panel A) Imágenes representativas obtenidas mediante microscopia confocal de células NSC34 que sobreexpresan SOD1 wt (lado izquierdo) o SOD1-G93A (lado derecho), ambas fusionadas con eGFP. Solo SOD1-G93A induce la formación de agregados intracelulares. Panel B) La sobreexpresión de SOD1 tiene un impacto sobre la vitalidad de las células NSC34. En células que expresan SOD1WT, incluso a niveles muy elevados,

no hay ningún cambio especial. Al contrario, en células que expresan el SOD1-G93A, 24 h después de la transfección, la vitalidad celular ha sido reducida aproximadamente un 20% (en comparación con el control).

- 5 - La Figura 6 muestra modificaciones de la vitalidad celular en NSC34-SOD1WT o SOD1-G93A tras la expresión del péptido NHK1 o un péptido codificado, utilizado como péptido de control.

Sección experimental

Experimento 1: Síntesis del péptido sintético NHK1 (procedimiento)

Experimento 1A: Síntesis química del péptido sintético NHK1

10 El péptido sintético NHK1 de la presente invención, con secuencia NH₂-IAAQLLAYFT-COOH (ID de SEC. nº 1), o Isoleucina-Alanina-Alanina-Glutamina-Leucina-Leucina-Alanina-Tirosina-Tirosina-Fenilalanina-Treonina, peso molecular 1.273,42, pI = 5,50, ha sido sintetizado mediante el procedimiento químico estándar de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) en un sintetizador automatizado. A diferencia de la síntesis natural en ribosoma, la SPPS sintetiza el péptido en la dirección desde el C-terminal hacia el N-terminal. Por lo tanto, la síntesis del péptido NHK1 se produce desde el aminoácido C-terminal Treonina (Thr o T) hacia el aminoácido N-terminal Isoleucina (Ile o I). El N-terminal de cada aminoácido que ha de ser añadido en la secuencia está protegido por el grupo 9-Fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). Se forma el enlace peptídico entre el grupo amino N-terminal del péptido inmovilizado a través de su C-terminal hasta la fase sólida (una resina insoluble) y el aminoácido entrante, cuyo N-terminal está protegido por un grupo Fmoc. En la siguiente etapa se escinde el grupo Fmoc y se desprotege el aminoácido y el nuevo N-terminal se vuelve disponible para unirse a un nuevo aminoácido. Por esta razón, después de cada reacción, se llevan a cabo muchas etapas de lavado con disolventes apropiados, buscando eliminar por completo los reactivos de la fase líquida y los bioproductos de la fase de acoplamiento, mientras que el péptido en crecimiento se une covalentemente con la resina insoluble.

25 La SPPS es, por lo tanto, un proceso cíclico de reacciones repetidas en el que: el aminoácido unido al péptido en crecimiento es desprotegido —etapas de lavado—, con la adición y la reacción del (siguiente) aminoácido entrante con el aminoácido desprotegido y el alargamiento del péptido en crecimiento por el nuevo aminoácido – etapas de lavado.

Estas fueron las etapas técnicas de la síntesis SPPS de dicho péptido NHK1:

30 i) unión del primer aminoácido protegido por Fmoc (Fmoc-Treonina) a la resina de cloruro de 2-clorotritilo (resina Cl): los reactivos utilizados como activadores del acoplamiento de aminoácidos son Diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt);

ii) desprotección del grupo Fmoc mediante 25% de piperidina en N,N-Dimetilformamida (DMF);

35 iii) neutralización del grupo amino expuesto;

40 iv) unión del siguiente aminoácido protegido por Fmoc (Fmoc-AA) como en i). Existe una excepción: la secuencia de péptidos -AQLL (ID de SEC nº 11) requiere la activación de la reacción de acoplamiento mediante N,N-Diisopropiletilamina (DIEA) y N[(Dimetilamino)-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridin-1-ilmetileno]-N metilmetanaminio hexafluorofosfato N-óxido (HATU), debido a problemas de síntesis;

v) liberación del grupo Fmoc;

vi) liberación del péptido de la resina de unión mediante ácido trifluoroacético (TFA) y desprotección de los residuos laterales, también bloqueados.

45 Las etapas ii) a iv) son repetidas como un ciclo para cada nuevo aminoácido introducido en la secuencia. Las etapas v) y vi) son las etapas finales de la síntesis del péptido, llevadas a cabo una vez se logra la secuencia deseada.

50 La etapa iii) neutralización de grupos amino se lleva a cabo con trietilamina, preferiblemente. La neutralización del grupo amino transforma la amina protonada en una amina libre, por lo tanto nucleófila, y con capacidad para atacar al anhídrido simétrico en la siguiente reacción (etapa iv). De esta forma, se obtuvo el péptido sintético denominado NHK1, objeto de la presente invención, con la secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1).

Experimento 1B: Síntesis biotecnológica del péptido sintético NHK1 mediante expresión en célula de mamífero

55 Se produjo dicho péptido NHK1, objeto de la presente invención, con la secuencia IAAQLLAYFT (ID de SEC. nº 1) expresando un vector plasmídico que comprende la secuencia de nucleótidos 5'-ATCGCCGCGCAGCTCCTGGCCTATTACTTCACGTGA- 3' (ID de SEC nº 2) bajo el control de un promotor eucariota, en líneas celulares estables (en particular, las líneas celulares estables HeLa y NSC-34).

En la primera etapa se han sintetizado químicamente dos oligonucleótidos complementarios con las siguientes secuencias:

5'-CTAGCATGATCGCCGCGCAGCTCCTGGCCTATTACTTCACGTGAG-3' (ID de SEC nº 3);

5 3' -GTACTAGCGGCGGTCGAGGACCGGATAATGAAGTGCACTCAGCT-5' (ID de SEC nº 4).

Los oligonucleótidos contienen secuencias compatibles con los sitios de restricción NdeI y Sall (subrayados). La hibridación entre estas dos secuencias de oligonucleótidos produjo un ADN bicatenario (ADNbc-NHK1) que contenía la secuencia que codifica el péptido NHK1 de la presente invención, flanqueada por secuencias monocatenarias correspondientes, respectivamente, a las obtenidas tras la digestión de los sitios de restricción NdeI y Sall.

10 A continuación, se clonó la secuencia ADNbc-NHK1 en un vector plasmídico de expresión para células eucariotas pCMSmtRed, un pCMS-eGFP modificado (Clontech), cuyo marcador eGFP de transfección fue sustituido por la secuencia de la proteína fluorescente roja (RFP) procedente de *Discosoma spp* fusionada después de la secuencia de acceso mitocondrial obtenida del gen humano citocromo c oxidasa subunidad VIII; esta secuencia expresa la proteína fluorescente a las mitocondrias y es un marcador de transfección [Tomasello F. y otros, The voltage-dependent anion selective channel 1 (VDAC1) topography in the mitochondrial outer membrane as detected in intact cell. PLoS One 2013; 8:e81522.]. Este constructo ha sido denominado pCMSmtRed-NHK1.

Además, se produjo una versión adicional de dicho péptido NHK1 objeto de la invención, que tiene fusionada en su C-terminal la secuencia de hemaglutinina (etiqueta de HA) (NHK1-HA). La secuencia de HA utilizada como etiqueta se corresponde con la secuencia de aminoácidos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la influenza, una glucoproteína ubicada en la superficie del virus y requerida para la infección viral. La secuencia de nucleótidos de etiqueta de HA es la siguiente: 5'-TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT- 3' (ID de SEC nº 5); la secuencia correspondiente de aminoácidos es la siguiente: YPYDVPDYA (ID de SEC nº 6) (la secuencia de aminoácidos es en la dirección desde el N-terminal (residuo Y) hacia el C-terminal (residuo A)). Está bien establecido que la adición de la etiqueta de HA no produce ninguna interferencia con la actividad o el acceso de la proteína a la que está fusionada.

Para proporcionar la proteína de fusión NHK1-HA, se sintetizó un segundo par de oligonucleótidos complementarios correspondientes al ADNbc que codifica la secuencia NHK1 fusionada en su C-terminal con la secuencia de HA. Este ADNbc contiene sitios de restricción NdeI y Sall, respectivamente, uno en cada extremidad:

30 5'CTAGCATGATCGCCGCGCAGCTCCTGGCCTATTACTTCACGTGATACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTG-3' (ID de SEC nº 7)

3'GTACTAGCGGCGGTCGAGGACCGGATAATGAAGTGCACTATGGGTATGCTACAAGGTCTAATGCGACAGCT-5' (ID de SEC nº 8).

Los oligonucleótidos contienen secuencias compatibles con sitios de restricción NdeI y Sall (subrayados) y la secuencia que codifica la etiqueta de HA (negrita).

35 La hibridación entre estas dos secuencias de oligonucleótidos produjo un ADN bicatenario (ADNbc-NHK1-HA). La secuencia ADNbc-NHK1-HA fue clonada en los sitios de restricción NdeI y Sall del vector plasmídico de expresión pCMS-mtDsRed y se denominó a este constructo pCMS-mtDsRed-NHK1-HA.

La acción de dicho péptido NHK1 sobre el complejo VDAC1/SOD1-G93A, es decir el complejo formado por la interacción entre la proteína VDAC1 y la enzima mutante SOD1 (exactamente la G93A mutante, en la que se sustituyó la glicina 93 por alanina) fue evaluada mediante experimentos *in vitro* e *in cellulo*, es decir, en la línea celular NSC34. NSC34 es una línea celular híbrida obtenida fusionando motoneuronas murinas con células de neuroblastoma. La línea celular NSC34 es reconocida de forma generalizada como modelo celular de motoneuronas y, después de su transfección con SOD1 mutado, es considerada un modelo de referencia de ELA [Cashman NR y otros, Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. Dev. Dyn. (1992) 194:209-21; Durham HD y otros., Evaluation of the spinal cord neuron X neuroblastoma hybrid cell line NSC- 34 as a model for neurotoxicity testing. Neurotoxicology (1993) 14:387-395.].

Experimento 2 - Producción y purificación de VDAC1, SOD1-G93A, SOD1WT

En experimentos *in vitro*, la acción del péptido NHK1 ha sido analizada directamente en tubos de ensayo contra el complejo VDAC1/SOD1-G93A formado por la interacción de proteínas recombinantes y purificadas. Las proteínas humanas VDAC1, SOD1-G93A y SOD1WT fueron producidas y purificadas de forma preliminar. Se expresaron SOD1 humano (tanto mutante como wt) y VDAC1 humano en *Escherichia coli* BL21 (DE3) fusionado en el C-terminal con la etiqueta de Strep (SOD1-G93A y SOD1WT) o la etiqueta de His (VDAC1). Se expresaron primero SOD1 humano (tanto SOD1 mutante como SOD1WT, ID de gen: 6647) clonados en vector pET52b(+), produciendo los constructos pET-SOD1WT y pET-SOD1G93A. De la misma forma, se clonó la secuencia de VDAC1 humano (ID de gen: 7461) en vector pET21a(+), produciendo el constructo pET-VDAC1. Se purificaron SOD1-G93A y SOD1WT

mediante cromatografía de afinidad con resina Strep-Tacting (Qiagen) y se purificó VDAC1 mediante cromatografía de afinidad con resina Ni-NTA (Qiagen).

Ambos procedimientos de purificación fueron llevados a cabo siguiendo los protocolos del fabricante (Qiagen).

5 Se volvió a plegar VDAC1 purificada, una proteína de membrana, en una solución tampón que contenía 1% de N-óxido de lauril-dimetilamina (LDAO). Se comprobó el plegamiento correcto de VDAC1 recombinante mediante caracterización electrofisiológica de sus características de formación de poros en una bicapa lipídica plana (PLB) [Checchetto V. y otros, Recombinant human Voltage Dependent Anion selective Channel isoform 3 (hVDAC3) forms pores with a very small conductance. Cell Physiol Biochem (2014) 34(3): 842-853.]. Las condiciones experimentales en el ensayo de PLB fueron las siguientes: composición de la membrana: difitanoilfosfatidilcolina/n-decano; la membrana fue bañada por ambos lados con 1 M de KCl en agua; el potencial aplicado a la membrana fue de 10 mV; T constante = 25°C.

En estos experimentos *in vitro* se evaluó la acción de interferencia del péptido sintético NHK1 sobre el complejo VDAC1/SOD1-G93A.

Experimento 3: Unión de VDAC1 a SOD1-G93A y a SOD1WT.

15 Se evaluó la capacidad de SOD1-G93A y de SOD1WT para unirse a VDAC1 en las siguientes condiciones experimentales: se incubaron 30 µM de VDAC1 purificada y plegada de nuevo, en su conformación nativa, con 50 µL de microperlas paramagnéticas revestidas con resina Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético) de Qiagen. La resina se une específicamente a la etiqueta de 6XHis ubicada en el C-terminal de VDAC1, revistiendo las perlas con la propia proteína VDAC1. VDAC1 unido a las perlas paramagnéticas interactúa con una afinidad significativa con SOD1-G93A humana purificada, añadida a las microperlas revestidas con VDAC1 a una concentración de 6,5 µM. En las mismas condiciones no hay unión alguna de SOD1WT a las microperlas revestidas con VDAC1 (Figura 1).

Este resultado coincide con la bibliografía, es decir, la capacidad específica de la SOD1 mutante, pero no de la SOD1 WT, de interactuar con VDAC1 (*in vivo*) [Israelson A. y otros, Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a Mouse Model of Inherited ALS. Neuron (2010) 26 de agosto; 67(4):575-587].

25 Experimento 4: Acción del péptido sintético NHK1 contra el complejo VDAC1/SOD1-G93A.

Se repitió el mismo experimento descrito como Experimento 3 en presencia de concentraciones crecientes de péptido sintético NHK1 (intervalo de concentración desde 0 hasta 25 µM). Se añadió el péptido a VDAC1 a una concentración de 30 µM unido a 50 µL de perlas magnéticas. A continuación, se añadieron 6,5 µM de SOD1-G93A (o, de forma alternativa, SOD1WT como control). Se evaluó la interacción mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-SOD1 después de la separación de las fracciones unidas/no unidas. Los inventores han descubierto que se redujo la SOD1-G93A unida a VDAC1 en paralelo al aumento de la concentración del péptido NHK1 y casi desapareció a la máxima concentración aplicada del péptido (Figura 2).

En particular, los inventores han observado que se redujo un 40% la SOD1-G93A unida a VDAC1 en presencia de 10 µM de NHK1 y se redujo un 80% en presencia de 25 µM de NHK1.

35 Experimento 5: Efecto del péptido sintético NHK1 sobre la conductancia de VDAC1 porcino

En un experimento de un único canal de registro de la conductancia de VDAC1, se observó la actividad de formación de poros del VDAC1 antes y después de la adición en la cubeta cis del péptido sintético NHK1 (Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. Reconstitution of purified VDAC1 into a lipid bilayer and recording of channel conductance. Cold Spring Harb Protoc. 1 de enero de 2014; 2014(1):100-5. doi: 10.1101/pdb.prot073148. PubMed PMID: 24371316).

La Figura 3 muestra una traza representativa de la conductancia de VDAC1 en 1 M de KCl a una tensión aplicada constante de +25 mV, antes y después de la adición del péptido sintético NHK1. A la tensión aplicada, el canal VDAC1 está presente el denominado estado "cerrado" (parcialmente), según se define en la bibliografía. Después de la adición de 15 µM de péptido sintético NHK1, se desestabilizó el estado cerrado, mostrando fluctuaciones rápidas que alcanzaban mayores niveles de conductancia y varios estados cerrados distintos.

Experimento 6: Localización celular del péptido sintético NHK1

Se evaluó la localización de péptido sintético NHK1 mediante dos sondas fluorescentes distintas en una célula NSC34-G93A (es decir, célula NSC34 que sobreexpresa la SOD1-G93A mutante).

Experimento 6a: Péptido sintético NHK1 marcado con biotina

50 Se sintetizó el péptido NHK1 modificado por el marcado de su grupo amino N-terminal con una biotina. Después de la internalización del péptido biotinilado en la célula NSC34-G93A mediante el reactivo Chariot (Active Motif) de transfección, se visualizó la localización del péptido NHK1 biotinilado en el microscopio de fluorescencia después de

la interacción específica de biotina con estreptavidina marcada con la sonda fluorescente Alexa594 (Molecular Probes-Thermo Scientific). En este experimento, se utilizaron 6 μ L del reactivo citotóxico Chariot de transfección para permitir la captación en la célula del péptido sintético biotinilado (100-400 ng de péptido/pocillo). Chariot es un péptido de 2.843 da con capacidad para formar complejos covalentes con proteínas o péptidos: de esta forma protege al péptido que ha de ser captado de procesos degradativos durante el proceso de transfección. Una vez en la célula, el complejo Chariot-péptido se disocia y el péptido puede alcanzar su destino diana. La captación es independiente de la vía endosomal, por lo tanto la estructura del péptido no es modificada durante la internalización.

El experimento Chariot fue llevado a cabo según las instrucciones del fabricante.

Experimento 6b: Péptido sintético NHK1 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Se sintetizó el péptido NHK1 modificado por el marcado de su grupo amino N-terminal con la sonda fluorescente de isotiocianato de fluoresceína (FITC). Después de la internalización del péptido modificado en la célula NSC34-G93A impulsada por el reactivo Chariot (Active Motif) de transfección, se visualizó directamente la localización del péptido NHK1-FITC en el microscopio de fluorescencia.

En el experimento 6a, se obtuvo la localización celular del péptido NHK1 mediante inmunofluorescencia indirecta. En el experimento 6b, la visualización se obtuvo mediante inmunofluorescencia directa, dado que FITC es una molécula fluorescente.

Los experimentos 6a y 6b tuvieron como resultado patrones superpuestos de resultados: se obtuvieron imágenes mediante un microscopio de epifluorescencia (Leica DM6000) y mostraron que ambos péptidos NHK1 (marcados con biotina o con FITC) localizados con claridad en las mitocondrias (datos no mostrados en las Figuras).

Experimento 7: El péptido sintético NHK1 obstruye la formación del complejo VDAC1/SOD1-G93A *in vitro*

Se verificó la capacidad del péptido sintético NHK1 de obstruir la formación del complejo VDAC1/SOD1-G93A con mitocondrias purificadas de la célula NSC34. En tal experimento, se incubaron 2 μ g de SOD1-G93A (o SOD1WT como control) con mitocondrias intactas obtenidas partiendo de 10^7 células NSC34. Se observó que solo SOD1-G93A fue capaz de interactuar con la superficie mitocondrial, a diferencia de SOD1WT, que fue incapaz de interactuar con las mitocondrias (Figura 4). En la Figura 4, "S" indica la fracción sobrenadante, que contiene la SOD1 no unida a las mitocondrias, mientras que "M" indica la fracción mitocondrial, es decir, la presencia de SOD1-G93A unida a las mitocondrias.

En el mismo experimento, se redujo la SOD1-G93A unida a las mitocondrias aproximadamente un 90% en comparación con la muestra de control, después de la adición de 60 μ M de NHK1 (Figura 4).

Experimento 8: Acción del péptido sintético NHK1 *in cellulo*

Se ha establecido que la agregación de proteínas es una característica típica de enfermedades neurodegenerativas y, en particular, los agregados de SOD1 mutante son tóxicos y están asociados directamente con la enfermedad de ELA.

Experimentos preliminares han demostrado que, en la célula NSC34, la SOD1-G93A mutada induce la formación de un agregado tóxico intracelular de proteínas. Al contrario, la forma fisiológica de SOD1 (SOD1WT) no induce tales agregados tóxicos. La Figura 5A muestra imágenes representativas, obtenidas en una microscopía confocal, de una célula NSC34 en la que se expresaron SOD1WT (lado izquierdo) o SOD1-G93A (lado derecho) fusionada con eGFP. Sorprendentemente, solo se asocia la expresión de SOD1-G93A con la presencia de agregados intracelulares, tóxicos para la vida celular.

Se analizó la acción del péptido NHK1 en una célula NSC34-G93A, tras la transfección mediante Lipofectamine 3000 (Invitrogen) con plásmidos pCMSmtRed-NHK1 o pCMSmtRed-NHK1-HA, definidos anteriormente. Con este procedimiento es posible tener mayores cantidades de péptido en la célula que con la transfección directa de péptido. Además, es posible seguir la reacción celular a la transfección durante más tiempo (incluso durante más días) que con la captación directa del péptido con Chariot. Los inventores han observado con el ensayo MTT [Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods (1983) 65:55-63.] que la vitalidad de la célula NSC34 tras una transfección con SOD1WT-eGFP no cambia en comparación con la misma célula no transfectada. Al contrario, después de 24 horas, la vitalidad de la célula NSC34 tras una transfección con SOD1-G93A-eGFP cae aproximadamente un 20% en comparación con la misma célula transfectada con SOD1WT-eGFP (Figura 5B). Los datos fueron normalizados contra una célula NSC34 transfectada únicamente con la eGFP. El análisis estadístico fue llevado a cabo con un ensayo unidireccional ANOVA. En la Figura 5B, el asterisco (*) significa que el valor tiene una significación $P < 0,001$ (0,00014005) con respecto a SOD1WT. El experimento fue realizado al menos tres veces con muestras triplicadas.

La acción del péptido NHK1 fue evaluada en una célula NSC34 que expresaba SOD1-G93A o SOD1WT.

En este experimento los inventores, ciertamente, transfectaron la célula NSC34 con concentraciones idénticas de pET-SOD1G93A (o pET-SOD1WT en el control) junto con pCMSmtRed-NHK1 (o pCMSmtRed-NHK1-HA); tras 24 horas los inventores realizaron el ensayo MTT de vitalidad.

- 5 El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico que tiene como objetivo cuantificar la actividad de las enzimas deshidrogenasa reduciendo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, amarillo, a formazano violeta-azul [Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* (1983) 65:55-63.]. La reacción se produce en mitocondrias en las que el succinato deshidrogenasa está activo en células vivas. La expresión del péptido NHK1 en NSC34-SOD1-G93A permite una recuperación de la vitalidad de aproximadamente un 50% (Figura 6).
- 10 Se sembraron células en placas de 24 pocillos a una densidad de 80.000 células/pocillo, fueron incubadas durante 24 horas y luego transfectadas transitoriamente con plásmido pEGFP-N1 que expresaba SOD1WT o SOD1-G93A o una simulación. El reactivo de transfección fue Lipofectamine 3000 (Life Technologies). En cada transfección se utilizó 1 µg de ADN plasmídico. Se leyó el ensayo MTT después de 24 horas de incubación. Se repitió el experimento por triplicado al menos cuatro veces.
- 15 Se repitió el mismo ensayo de vitalidad en presencia del péptido NHK1. Las NSC34 fueron cotransfectadas con plásmidos pEGFP-N1 + pCMS-mtDsRED-NHK1 o pEGFP-N1-SOD1WT + pCMSmtDsRED-NHK1 (ambos como controles) o pEGFP-N1-SOD1G93A + pCMS-mtDsRED-NHK1. En cada transfección se utilizó 1 µg de ADN plasmídico total. Se leyó el ensayo MTT después de 24 horas de incubación. Se repitió el experimento en seis muestras paralelas al menos tres veces. Se normalizaron los datos contra una célula NSC34 transfectada con
- 20 SOD1-G93A-eGFP, que se considera que es la condición en la que hay la máxima caída de vitalidad celular (100%). Por lo tanto, se concluye que, teniendo en cuenta la caída del 100% en la vitalidad de la célula NSC34 debido a la SOD1-G93A mutante, el péptido NHK1 es capaz de reducir la caída de vitalidad un 42% en las mismas condiciones, con una significancia estadística de $P < 0,01$ (0,003), según se indica en la Figura 6 con el asterisco (*). Al contrario, en experimentos de control, no se observó una pérdida significativa de vitalidad. En particular, y muy importante, la
- 25 cotransfección de eGFP con péptido NHK1 muestra que el péptido no es tóxico en absoluto para la célula (Figura 6).

No se descubrió una recuperación significativa de la caída de la vitalidad celular cuando se cotransfecta la célula NSC34-SOD1-G93A con un péptido “codificado” como un control (“codificado” en la Figura 6). El péptido codificado tiene la secuencia: FAQLTIALAYY (ID de SEC nº 12) (18% de la identidad de la secuencia con el péptido NHK1 de la ID de SEC nº 1). Se llevó a cabo el análisis estadístico con un ensayo unidireccional ANOVA.

- 30 Los resultados de los experimentos descritos anteriormente permiten a los inventores destacar experimentalmente las ventajas de la presente invención, con respecto a lo que se conoce. Se ha observado que el péptido sintético objeto de la presente invención (péptido sintético NHK1) es capaz de separar SOD1-G93A unida a VDAC1 o a mitocondrias purificadas de la célula NSC34. Además, experimentos en una célula transgénica NSC34-SOD1-G93A demostraron que el péptido sintético ofrece ventajas adicionales a lo que se conoce en la técnica y en el estado de
- 35 la técnica: en primer lugar, es capaz de contrarrestar la mortalidad asociada con la expresión de SOD1-G93A mutada en motoneuronas; mejora adicionalmente la vitalidad celular actuando sobre la función mitocondrial (como es evidente mediante el ensayo MTT, que es, en último término, un ensayo de la actividad de las mitocondrias) [Sánchez NS y Königsberg M. Using Yeast to Easily Determine Mitochondrial Functionality with 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Assay. *Biochem Mol Biol Educ* (2006) 34(3):209-212.; Kaneko I., Yamada N., Sakuraba Y. y otros. Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of beta-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue. *J Neurochem* (1995) 65(6):2585-93.]. Una ventaja
- 40 adicional del péptido sintético según la presente invención (péptido sintético NHK1) es su tolerabilidad por la célula, y esto puede ser aprovechado en el tratamiento de enfermedades con mecanismos etiológicos similares como, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas como la ELA.
- 45 Por último, una ventaja adicional del péptido NHK1 y su tolerabilidad por la célula, es en el tratamiento contra el cáncer, dado que ejerce un efecto proapoptótico en células tumorales estables (es decir, células HeLa).

Listado de secuencias

- <110> Messina, Angela Anna
De Pinto, Vito Nicola
- 50 Magri, Andrea
Reina, Simona
Guarino, Francesca Maria
Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche
Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali
- 55 <120> COMPUESTO DE PÉPTIDO FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVO, PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN Y USO DEL MISMO

<130> 170156AC45

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético (NHK1)

<400> 1

10 Ile Ala Ala Gln Leu Leu Ala Tyr Tyr Phe Thr

 1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia codificante del péptido sintético (NHK1)

<400> 2

atgccgcgc agctcctggc ctattacttc acgtga 36

<210> 3

20 <211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido para la producción de un plásmido

25 <400> 3

ctagcatgat cgccgcgcag ctctggcct attacttcac gtgag 45

<210> 4

<211> 45

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido para la producción de un plásmido. La secuencia se indica en la dirección 3'-5'

<400> 4

gtactagcgg cgctgcgagg accggataat gaagtcact cagct 45

35 <210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> secuencia codificante de la etiqueta de HA

<400> 5

taccatacg atgtccaga ttacgct 27

<210> 6

<211> 9

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Etiqueta de HA

ES 2 808 328 T3

<400> 6

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 7

<211> 72

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido para la producción de un plásmido

<400> 7

ctagcatgat cgccgcgag ctctctggcct attacttcac gtgataccca tacgatgttc 60

10 cagattacgc tg 72

<210> 8

<211> 72

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> oligonucleótido para la producción de un plásmido. La secuencia de indica en la dirección 3'-5'

<400> 8

gtactagcgg cgcgtcgagg accggataat gaagtgcact atgggtatgc tacaaggtct 60

aatgcgacag ct 72

<210> 9

20 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

25 <400> 9

Met Ile Ala Ala Gln Leu Leu Ala Tyr Tyr Phe Thr Glu Leu Lys Asp
1 5 10 15

Asp Gln Val Lys Lys
20

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 10

Met Ile Ala Ala Gln Leu Leu Ala Tyr Tyr Phe Thr Glu Leu Lys
1 5 10 15

35 <210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 808 328 T3

<220>

<223> fragmento de péptido

<400> 11

Ala Gln Leu Leu

1

5 <210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido "codificado" de control

<400> 12

Phe Ala Gln Leu Thr Ile Ala Leu Ala Tyr Tyr

1

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido sintético que consiste en la secuencia de aminoácidos IAAQLLAYYFT (ID de SEC nº 1).
2. Un péptido sintético según la reivindicación 1, caracterizado por estar acoplado a una sonda detectable.
3. Un procedimiento para la síntesis del péptido según la reivindicación 1, que comprende al menos una etapa de alargamiento de dicho péptido en la dirección desde el C-terminal hacia el N-terminal.
4. Un procedimiento para la síntesis del péptido según la reivindicación 1, que comprende al menos una etapa de insertar al menos un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho péptido, en al menos una célula.
5. Una composición farmacéutica que comprende el péptido según la reivindicación 1.
6. Un péptido según la reivindicación 1 para su uso como un medicamento.
7. Un péptido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
8. Un péptido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

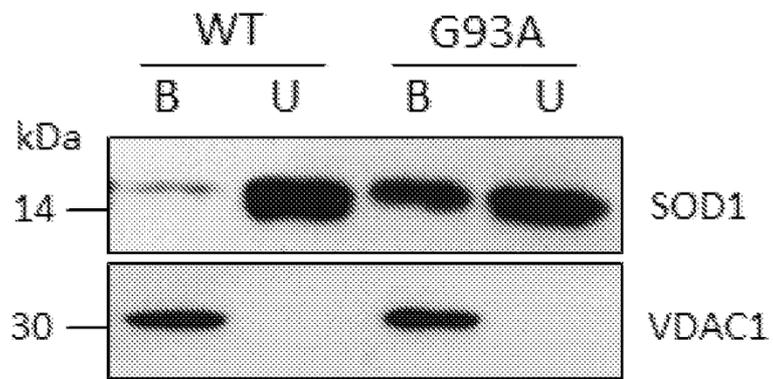


Figura 1

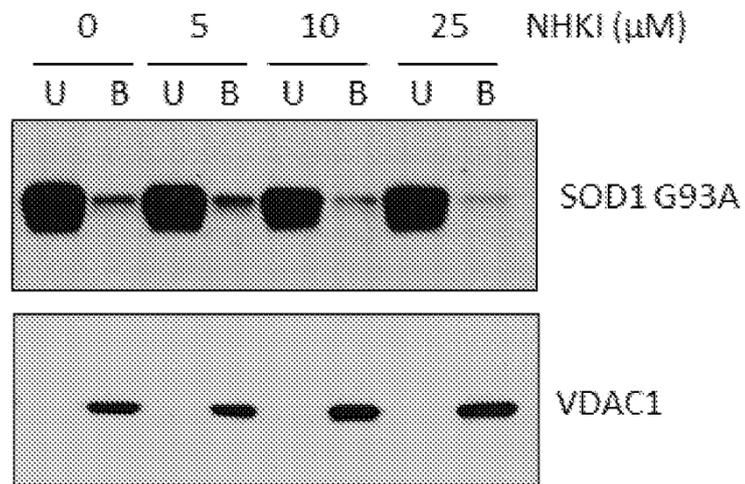


Figura 2

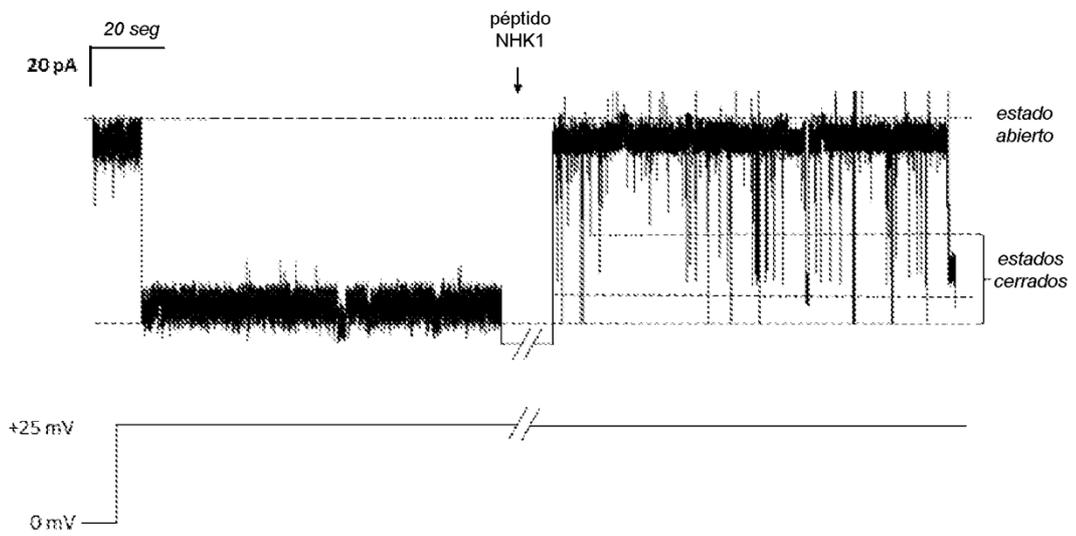


Figura 3

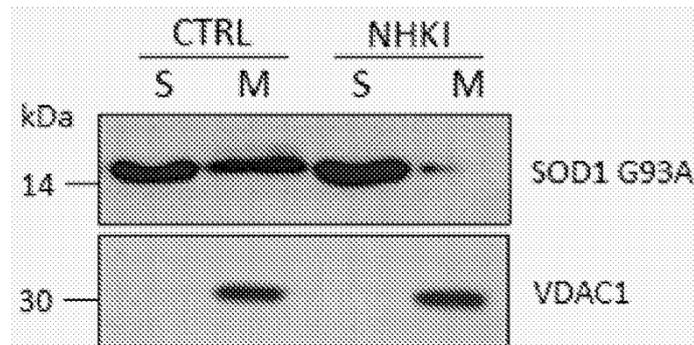
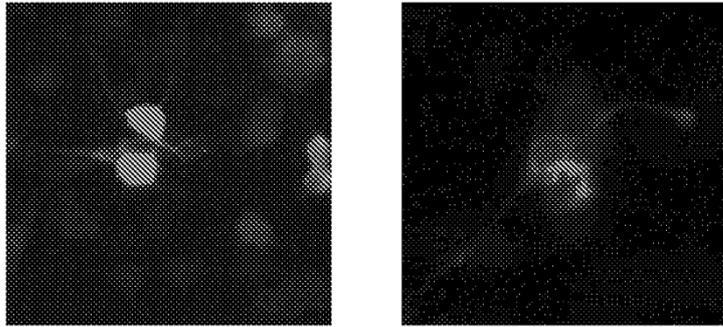


Figura 4

A



B

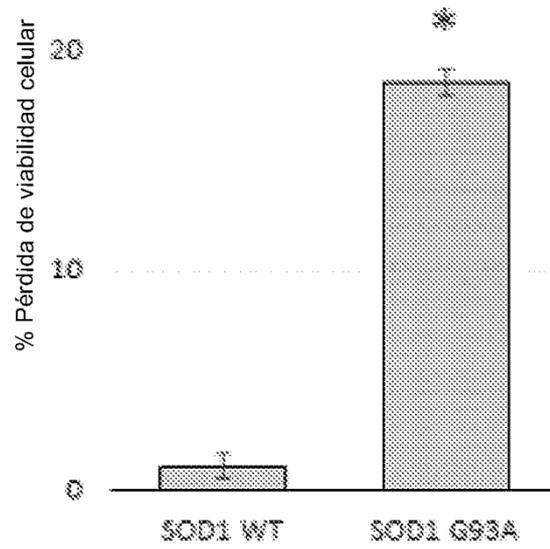


Figura 5

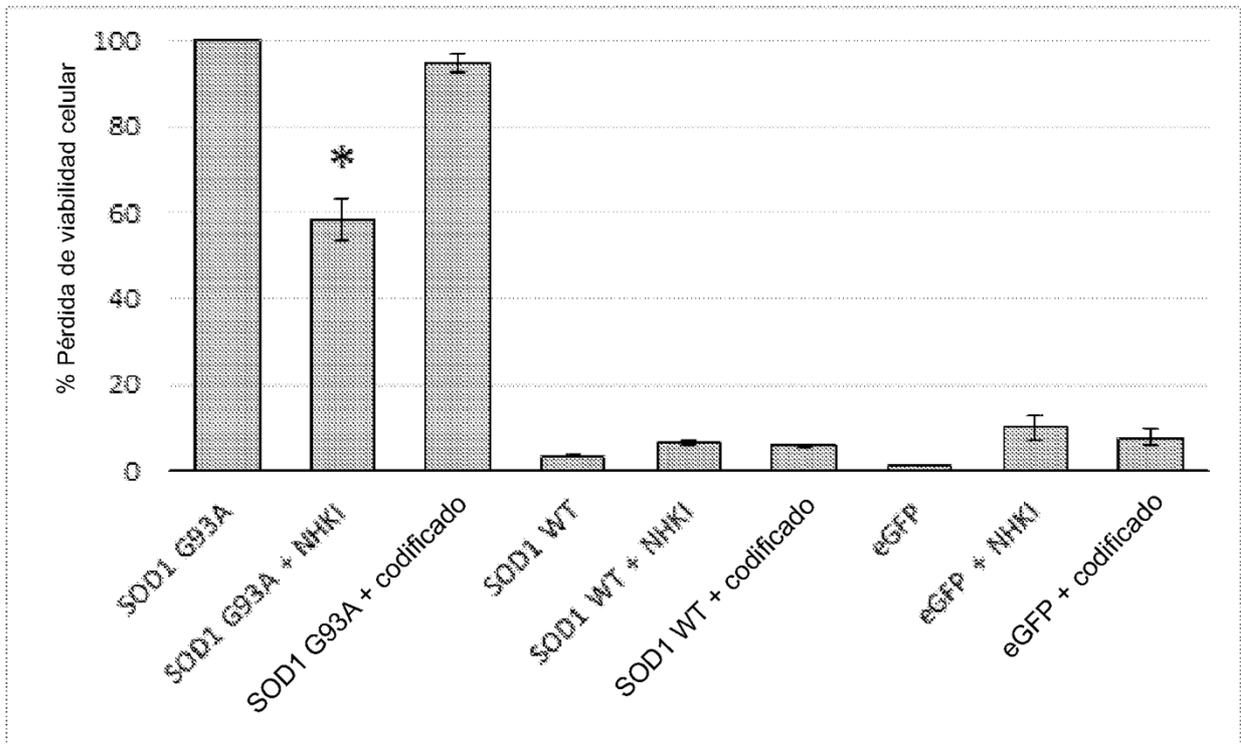


Figura 6