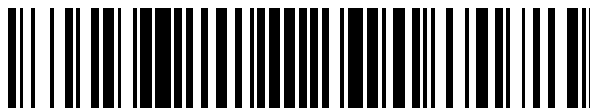


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 301**

21 Número de solicitud: 202330798

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/08 (2009.01)
A61P 9/06 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.09.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.11.2023

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**DELPÓN MOSQUERA, Eva;
CABALLERO COLLADO, Ricardo;
CRESPO GARCÍA, Teresa;
CÁMARA CHECA, Anabel;
RAPÚN JIMÉNEZ, Josu y
TAMARGO MENÉNDEZ, Juan**

54 Título: **Péptido para el tratamiento de enfermedades cardíacas**

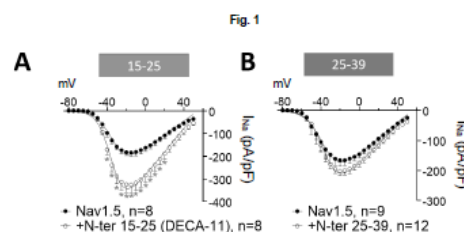
57 Resumen:

Péptido para el tratamiento de enfermedades cardíacas.

La presente invención se refiere a un péptido de 11 aminoácidos para su uso como medicamento en enfermedades cardíacas, especialmente, arritmias ventriculares en pacientes con hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca (IC) y/o síndromes hereditarios por pérdida de función en los canales Nav1.5 o Kir2.1. El péptido de 11 aminoácidos incluye una señal de localización nuclear, activa la transcripción de KCNJ2, previene la disminución de la densidad de la I_{Na} e I_{K1} producida por IC y aumenta significativamente la densidad de la I_{Na} e I_{K1} en casos de IC.

La invención incluye las moléculas de ADNc que codifican el péptido de 11 aminoácidos, los vectores y/o las células que las contienen.

También se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen el péptido, las moléculas de ADNc, los vectores y/o las células que los contienen para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardíacas.



DESCRIPCIÓN**Péptido para el tratamiento de enfermedades cardíacas****5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se encuadra en el sector de la biotecnología con aplicación en el sector farmacéutico. Más concretamente, se refiere a un péptido con propiedades moduladoras de las corrientes iónicas en los cardiomiocitos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome muy prevalente caracterizado por una alta morbilidad y mortalidad (alrededor del 50% en los 5 primeros años). Las arritmias ventriculares son alteraciones del ritmo cardíaco que pueden desencadenar fibrilación ventricular y muerte súbita (MSC). La MSC de origen arritmico es responsable de hasta el 50% de las muertes en pacientes con IC. En los pacientes con IC y arritmias ventriculares potencialmente mortales, la implantación de un desfibrilador o resincronizador ha demostrado disminuir la incidencia de la MSC por arritmias ventriculares y fibrilación ventricular. Sin embargo, son dispositivos muy costosos, que causan importantes efectos adversos (riesgo de infecciones, descargas inapropiadas, aumento de la mortalidad con el número de choques, etc.) que limitan la calidad de vida de los pacientes.

En los pacientes con IC se produce una modificación de las propiedades eléctricas de los cardiomiocitos que consiste en la disminución de las corrientes tanto de Na como de K con rectificación interna (I_{Na} e I_{K1}) como consecuencia del descenso en el número de canales Nav1.5 y Kir2.1, que son los que generan dichas corrientes, respectivamente. Estos cambios producidos por la IC se denominan “remodelado eléctrico”. El remodelado eléctrico favorece la aparición de arritmias ventriculares potencialmente mortales.

Los fármacos antiarrítmicos (FFAA) actualmente aprobados y disponibles en la terapéutica producen efectos proarrítmicos y éstos son tanto más marcados cuanto mayor es el riesgo arritmico del paciente. Así, en los pacientes con IC, el remodelado

eléctrico, anatómico e histológico promueve la aparición de arritmias, disminuye el efecto de los FFAA y aumenta la sensibilidad a sus acciones proarrítmicas.

Los FFAA del grupo I (hidroquinidina, procainamida, disopiramida, lidocaína, propafenona, y flecainida) inhiben la I_{Na} bloqueando los canales Nav1.5 y, como consecuencia de ello, pueden dar lugar a efectos proarrítmicos peligrosos. De hecho, están contraindicados en los pacientes con IC porque disminuyen mucho la excitabilidad cardíaca en pacientes que ya la tienen comprometida como consecuencia del remodelado eléctrico. Por ello, aumentan la mortalidad en pacientes con IC y arritmias.

Los FFAA del grupo II (antagonistas de los receptores β -adrenérgicos o betabloqueantes) antagonizan los efectos proarrítmicos de la activación del sistema nervioso simpático y, exceptuando en aquellos pacientes en los que están contraindicados (p. ej. asmáticos), se utilizan para el tratamiento de la IC. A pesar de que se consideran parte del tratamiento óptimo de la IC según las guías terapéuticas, la mortalidad de los pacientes con IC (>50% en los 5 primeros años tras diagnóstico) por causa arrítmica (>50% de la mortalidad total) sigue siendo muy alta.

Los FFAA del grupo III (amiodarona, dronedarona, sotalol) prolongan la repolarización ventricular. La dronedarona está contraindicada en pacientes con IC y el sotalol no se utiliza (a no ser que el paciente porte un desfibrilador) porque prolonga excesivamente la repolarización (el intervalo QT del electrocardiograma) induciendo la aparición de arritmias ventriculares en pacientes que, como consecuencia del remodelado eléctrico, ya tienen el QT muy prolongado. Sólo la amiodarona está indicada, pero produce numerosas y graves reacciones adversas que obligan a su retirada en el plazo máximo de 2 años y aumentan la mortalidad por causas no cardíacas.

Los FFAA del grupo IV (verapamilo y diltiazem) bloquean los canales de calcio y están contraindicados en los pacientes con IC porque deprimen la contractilidad.

Los FFAA de los grupos I, III y IV actúan inhibiendo las corrientes iónicas cardíacas por bloquear los canales que las generan. En diversas patologías cardíacas sería necesario poder aumentar la I_{Na} y/o la I_{K1} de los cardiomiocitos humanos. Esta necesidad es especialmente perentoria en los pacientes con IC, pero no se limita a

ellos. La disminución de la I_{Na} deprime la excitabilidad del miocardio haciendo que la conducción del impulso eléctrico cardíaco sea más lenta, lo que favorece la aparición de arritmias. La disminución de la I_{K1} , además de disminuir la excitabilidad, prolonga la repolarización cardíaca, lo que prolonga el intervalo QT del electrocardiograma, siendo

5 un factor adicional que promueve también la aparición de arritmias.

Sin embargo, en el momento actual, no se dispone de herramientas farmacológicas específicas capaces de aumentar ni la I_{K1} ni la I_{Na} . Desde el punto de vista del tratamiento farmacológico de las arritmias ventriculares potencialmente mortales, los

10 pacientes con IC son huérfanos terapéuticos.

Se ha descrito cómo dos compuestos utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (dapagliflozina y empagliflozina) disminuyen la morbi- mortalidad de los pacientes con IC y se sospecha que, además, pueden tener efecto antiarrítmico (Braunwald E.

15 *Gliflozins in the Management of Cardiovascular Disease. N Engl J Med.* 2022;386:2024-2034). Por otra parte, se ha demostrado que la incubación de cardiomiocitos sanos humanos con esos compuestos, aumenta la corriente de Na^+ y K^+ (Dago, M. *et al. Empagliflozin and Dapagliflozin Increase Na^+ and Inward Rectifier K^+ Current Densities in Human Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem*

20 *Cells (hiPSC-CMs) Cells* 2022;11:3707). Los autores proponen, que el aumento de la I_{Na} y la I_{K1} podría contribuir al efecto cardioprotector.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

25 Péptido para el tratamiento de enfermedades cardíacas.

Dada la necesidad de buscar una nueva vía terapéutica para tratar enfermedades cardíacas como las arritmias ventriculares en pacientes con IC, entre otras, se decidió profundizar en el estudio del canal de sodio cardíaco Nav1.5, codificado por el gen

30 *SCN5A*. El análisis de la proteína nos ha permitido identificar una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo N-terminal de Nav1.5 (número de referencia de la secuencia de la proteína en NCBI: NP_000326.2). Dicha señal está localizada entre los aminoácidos 13 y 37 de Nav1.5 (SEQ ID NO: 1) y está incluida en un péptido de 132 aminoácidos, descrito por Matamoros, M. *et al. (Nav1.5 N-terminal domain binding*

35 *to α 1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5*

channels. *Cardiovasc Res*. 2016;110:279–290). Este péptido de 132 aminoácidos contiene además un sitio de unión a la $\alpha 1$ -sintrofina y ejerce un efecto tipo chaperona aumentando la densidad de los canales Nav1.5, Kir2.1 y Kir2.2 en la membrana citoplasmática.

5

Con el objetivo de modular la expresión de *SCN5A* y del gen que codifica Kir2.1 (*KCNJ2*), se ha diseñado un péptido que mantiene la NLS pero que es de menor tamaño para facilitar su acceso al núcleo de la célula. En concreto, es un péptido de 11 aminoácidos localizado entre las posiciones 15 y 25 (SEQ ID NO: 2), ambas
10 incluidas, de Nav1.5. Esta secuencia aminoacídica es $RX_1X_2RESLAX_3X_4X_5$, siendo $X_1 = F, Y$ o W ; $X_2 = T, S, C$ o M ; $X_3 = A, G, V, L$ o I ; $X_4 = I, G, A, V$ o L y $X_5 = E$ o D y, preferentemente, es SEQ ID NO: 3 (denominado internamente, y también en esta memoria, DECA-11).

15 Al analizar el efecto de SEQ ID NO: 2, y más concretamente de SEQ ID NO: 3, sobre el promotor de *SCN5A* y la consecuente transcripción del gen, no se ha podido observar ningún efecto significativo. Sin embargo, el péptido de 11 aminoácidos es capaz de activar la transcripción de *KCNJ2* ejerciendo un efecto protranscripcional sobre el promotor mínimo del gen *KCNJ2* humano. Este resultado sorprendente nos
20 animó a analizar los efectos del péptido SEQ ID NO: 2, y más concretamente de SEQ ID NO: 3, sobre la I_{Na} y la I_{K1} en un modelo de IC en ratón obteniendo resultados positivos.

Otro aspecto de la invención se refiere a SEQ ID NO: 2, preferentemente SEQ ID NO:
25 3, para su uso como medicamento, más concretamente para su uso como medicamento en enfermedades cardíacas, entre ellas: las arritmias ventriculares asociadas a la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca y a los síndromes hereditarios secundarios a mutaciones en los genes *SCN5A* o *KCNJ2* que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5 o Kir2.1, como por ejemplo, el Síndrome
30 de Brugada, el Síndrome de disminución progresiva de la conducción (*Progressive cardiac conduction defect*) o el Síndrome de Andersen-Tawil, entre otras.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una molécula de ADN que codifica el péptido de 11 aminoácidos, es decir, a las moléculas de ADNc que codifican los
35 péptidos de las variantes de la secuencia SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 5-19), y

preferentemente a la molécula de ADNc que codifica DECA-11 (SEQ ID NO: 5).

Otro aspecto de la invención se refiere a SEQ ID NO: 5-19, preferentemente SEQ ID NO: 5, para su uso como medicamento, más concretamente para su uso como
5 medicamento en enfermedades cardíacas, entre ellas: las arritmias ventriculares asociadas a la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca y a los síndromes hereditarios secundarios a mutaciones en los genes *SCN5A* o *KCNJ2* que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5 o Kir2.1, como por ejemplo, el Síndrome de Brugada, el Síndrome de disminución progresiva de la conducción (*Progressive cardiac conduction defect*) o el Síndrome de Andersen-Tawil, entre otras.
10

La invención también se refiere a vectores que incluyen cualquiera de estas moléculas de ADNc (SEQ ID NO: 5-19) y a células eucariotas o procariotas que los contienen esos vectores, o cualquiera de las secuencias de ADNc (SEQ ID NO: 5-19), o
15 cualquiera de las secuencias peptídicas de SEQ ID NO: 2, preferentemente SEQ ID NO: 3.

Un aspecto más de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido de secuencia SEQ ID NO: 2, preferentemente SEQ ID NO: 3, y
20 un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Asimismo, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las moléculas de ADNc definidas por SEQ ID NO: 5-19 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
25

Otro aspecto de la invención hace referencia a composiciones farmacéuticas que incluyen vectores como los descritos más arriba, es decir, que comprenden cualquiera de estas moléculas de ADNc (SEQ ID NO: 5-19) y un excipiente farmacéuticamente aceptable. También hace referencia composiciones farmacéuticas que incluyen
30 células eucariotas o procariotas que los contienen estos vectores, o cualquiera de las secuencias de ADNc (SEQ ID NO: 5-19), o cualquiera de las secuencias peptídicas de SEQ ID NO: 2, preferentemente SEQ ID NO: 3, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a cualquiera de las composiciones

- farmacéuticas descritas en esta memoria descriptiva para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardíacas, entre ellas: las arritmias ventriculares asociadas a la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca y a los síndromes hereditarios secundarios a mutaciones en los genes *SCN5A* o *KCNJ2* que producen
- 5 la pérdida de función de los canales Nav1.5 o Kir2.1, como por ejemplo, el Síndrome de Brugada, el Síndrome de disminución progresiva de la conducción (*Progressive cardiac conduction defect*) o el Síndrome de Andersen-Tawil, entre otras.

Tabla de secuencias

10

SEQ ID NO: 1	FRRFTRESLAAIEKRMAEKQARGST
SEQ ID NO: 2	RXXRESLAXXX que se corresponde con RX ₁ X ₂ RESLAX ₃ X ₄ X ₅ en esta memoria descriptiva
SEQ ID NO: 3	RFTRESLAAIE
SEQ ID NO: 4	EKRMAEKQARGSTTL
SEQ ID NO: 5	AGGTTCACACGGGAGTCCCTGGCAGCCATCGAG
SEQ ID NO: 6	AGGTATACACGGGAGTCCCTGGCAGCCATCGAG
SEQ ID NO: 7	AGGTGGACACGGGAGTCCCTGGCAGCCATCGAG
SEQ ID NO: 8	AGGTTCTCTCGGGAGTCCCTGGCAGCCATCGAG
SEQ ID NO: 9	AGGTTCTGTCTGGGAGTCCCTGGCAGCCATCGAG
SEQ ID NO: 10	AGGTTTCATGCGGGAGTCCCTGGCAGCCATCGAG
SEQ ID NO: 11	AGGTTACACACGGGAGTCCCTGGCAGGTATCGAG
SEQ ID NO: 12	AGGTTACACACGGGAGTCCCTGGCAGTTATCGAG
SEQ ID NO: 13	AGGTTACACACGGGAGTCCCTGGCATTATCGAG
SEQ ID NO: 14	AGGTTACACACGGGAGTCCCTGGCAATTATCGAG
SEQ ID NO: 15	AGGTTACACACGGGAGTCCCTGGCAGCCGGTGAG
SEQ ID NO: 16	AGGTTACACACGGGAGTCCCTGGCAGCCGCTGAG
SEQ ID NO: 17	AGGTTACACACGGGAGTCCCTGGCAGCCGTTGAG
SEQ ID NO: 18	AGGTTACACACGGGAGTCCCTGGCAGCCTTAGAG
SEQ ID NO: 19	AGGTTACACACGGGAGTCCCTGGCAGCCATCGAT
SEQ ID NO: 20	GAGAAGCGCATGGCAGAGAAGCAAGCCCGCGGCTCAACCAC CTTG
SEQ ID NO: 21	ADNc que codifica los canales Nav1.5 humanos (ver listado de secuencias)

SEQ ID NO: 22	ADNc que codifica los canales Kir2.1 humanos (ver listado de secuencias)
---------------	--

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una
5 mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de figuras en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Densidad de la corriente generada por los canales Nav1.5 humanos en
10 función del potencial de membrana del pulso test en presencia o ausencia de dos péptidos de diferente tamaño que forman parte del extremo N-terminal del canal Nav1.5. En cada panel se nombra el péptido estudiado describiendo la posición del primer y último aminoácido de la secuencia del canal Nav1.5 humano.

Figura 2. Densidad de la corriente generada por los canales Kir2.1 humanos en
15 función del potencial de membrana del pulso test en presencia o ausencia del péptido 15-25 que es DECA-11 (SEQ ID NO: 3).

Figura 3. Relaciones densidad de la I_{Na} (Fig. 3A) e I_{K1} (Fig. 3B) en función del potencial
20 de membrana del pulso aplicado registradas en cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas.

Figura 4. Trazos de I_{Na} sostenida o "late" (I_{NaL}) registrados en cardiomiocitos humanos
25 derivados de células madre pluripotentes inducidas en presencia (Fig. 4B) o ausencia (control) de DECA-11 (Fig. 4A). Se consideró I_{NaL} la corriente sostenida sensible a tetrodotoxina TTX (10 μ M) y se cuantificó como porcentaje del pico de corriente (Fig. 4C).

Figura 5. Ensayos de luciferasa para analizar el efecto de DECA-11 (SEQ ID NO: 3)
30 sobre la transcripción de *SCN5A* (Fig. 5A) y *KCNJ2* (Fig. 5B). La luminiscencia relativa se expresa en unidades arbitrarias (AU).

Figura 6. Esquema del protocolo seguido para la generación del modelo murino con

ICfeR. El tiempo se expresa en semanas (S). Se indican las semanas en la cuales se realizaron los ecocardiogramas basales (ECO1) y finales (ECO2) antes del traslado a nuestro laboratorio. Los animales a los que se les practicó la cirugía sin la ligadura de la aorta se denominan Sham y a los que se les ligó la aorta, TAC.

5

Figura 7. Capacitancia (pF) de los cardiomiocitos disociados de ratones Sham y TAC tratados con Aav-dt-T (control) o Aav-DECA-11 (Aav-SEQ ID NO: 5).

Figura 8. Relaciones densidad de la I_{Na} -voltaje obtenidas en cardiomiocitos disociados de ratones Sham tratados o no con DECA-11 (A) y ratones TAC tratados o no con DECA-11 (B); resumen de resultados (C). En el panel C, C significa Control y D11, DECA-11.

Figura 9. Relaciones densidad de la I_{K1} -voltaje obtenidas en cardiomiocitos disociados de ratones Sham tratados o no con DECA-11 (A) y ratones TAC tratados o no con DECA-11 (B); resumen de resultados (C). En el panel C, C significa Control y D11 DECA-11

20

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Diseño de péptidos

Entre otras herramientas, en el análisis de Nav1.5 (NCBI: NP_000326.2), se utilizó un algoritmo de predicción de sitios de localización nuclear (Nguyen Ba AN, *et al. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. BMC Bioinformatics*. 2009;10:202) con el que se identificó una NLS (SEQ ID NO: 1) entre los aminoácidos 13 y 37, ambos incluidos, de Nav1.5. Si bien el tamaño de la NLS no es excesivo, se diseñaron péptidos de menor tamaño buscando identificar un fragmento mínimo capaz de acceder al núcleo de las células y de aumentar la I_{Na} y la I_{K1} . Entre ellos se seleccionaron un péptido de 11 aminoácidos (SEQ ID NO: 3) y otro de 15 aminoácidos (SEQ ID NO: 4), que se generaron en el laboratorio. El péptido de 11 aminoácidos se seleccionó con vistas a dejar en el extremo N terminal un residuo Arginina (R) para en caso necesario facilitar la ciclación

del péptido para aumentar su estabilidad biológica.

Ejemplo 2. Análisis de densidad de corriente generada

Además de su capacidad para entrar en el núcleo de las células, buscábamos péptidos
 5 capaces de aumentar la densidad de corriente generada por los canales Nav1.5 y Kir2.1 humanos, por lo que analizamos ambos aspectos.

Ejemplo 2.1. Densidad de corriente generada por los canales Nav1.5 humanos

Para analizar el efecto de los péptidos diseñados en el ejemplo 1 sobre la I_{Na} y la I_{K1} ,
 10 el ADNc que codifica SEQ ID NO: 3 o bien SEQ ID NO: 4, descritos en SEQ ID NO: 5 y 20, respectivamente, se clonaron en un vector pcDNA3.1⁽⁺⁾® (Invitrogen) para la transfección de células de ovario de hámster chino (CHO) que eran a su vez transfectadas con el ADNc que codifica los canales Nav1.5 humanos (SEQ ID NO: 21). Las células CHO fueron además cotransfectadas con el vector EBO-pcD leu 2 (0.5 µg),
 15 que codifica la expresión del antígeno de superficie CD8. La posterior adición de anticuerpo anti-CD8, unido a microesferas Dynabeads M450®, permitió identificar las células que habían sido transfectadas. Transcurridas 48 h, una alícuota de la suspensión de células transfectadas se colocaba en la cámara montada sobre la platina de un microscopio invertido (TMS, Nikon) y se perfundía a la velocidad de 1
 20 ml/min con solución externa (en mM): NaCl 50, CsCl 80, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1.5, HEPES 5 y glucosa 5 (pH 7.35 con CsOH). Las micropipetas se obtuvieron a partir de capilares de borosilicato (mod. GD-1, Narishige) utilizando un estirador horizontal programable (Sutter mod. P-2000) y puliéndose su boca mediante calor en una microforja (mod. MF-83, Narishige). Las micropipetas (resistencia de punta de <1.5
 25 MΩ) se llenaron con una solución interna que contenía (mM): NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10 y EGTA 10 (pH 7.35 con CsOH). Las micropipetas se acercaron utilizando un micromanipulador Narishige MO-103 a la membrana de la célula y tras aplicar una pequeña succión, la porción de membrana incluida en la luz de la pipeta se invaginaba, formándose un sello de alta resistencia [del orden de GΩ, configuración de “célula unida” (*cell attached*)]. Tras la formación del sello, la membrana del parche se rompía mediante una pequeña succión adicional, lo que permitía el registro de la corriente mediante la configuración de “célula entera” de la técnica del “parche de membrana” (*whole-cell patch-clamp*). Las corrientes se registraron a 20-22°C mediante un amplificador Axopatch 200B, se filtraban a la mitad de la frecuencia de
 35 muestreo y se almacenaban en un ordenador para su posterior análisis. La adquisición

de los datos, el análisis de los mismos y los protocolos de pulsos fueron controlados mediante el programa pCLAMP. Los artefactos de corriente capacitiva generados tras la aplicación de pulsos desde 0 mV a +10 mV se registraron a 50 kHz (filtrados a 10 kHz) para calcular la capacitancia de la célula, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada. La frecuencia de muestreo fue de 50 kHz y los datos, filtrados a una frecuencia de 25 kHz, se almacenaban en discos duros para su posterior análisis utilizando la aplicación CLAMPFIT del programa pCLAMP. La I_{Na} se registró aplicando pulsos de 50 ms desde un potencial de fijación de -120 mV a potenciales entre -80 y +50 mV en incrementos de 5 mV. La amplitud del pico de la I_{Na} se normalizó a la capacitancia de cada célula calculando así la densidad de la I_{Na} (pA/pF). Las curvas densidad de la I_{Na} –voltaje se obtuvieron al representar la densidad de la I_{Na} en función del potencial de membrana del pulso aplicado.

En la Figura 1, se representan las curvas densidad de la I_{Na} –voltaje en células que expresaban los canales Nav1.5 (símbolos negros) y en células que expresaban los canales Nav1.5 junto con el ADNc que codifica el fragmento que contiene los aminoácidos 15-25 descritos en SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 5) o el que codifica los aminoácidos 25-39, descritos en SEQ ID NO: 4, (SEQ ID NO: 20) (símbolos blancos). Como se puede observar, el fragmento que contiene los aminoácidos 15-25 (SEQ ID NO: 3) era capaz de aumentar significativamente la densidad de la I_{Na} a diversos potenciales de membrana. Por el contrario, el fragmento que contiene los aminoácidos 25-39 (SEQ ID NO: 4) no lo hacía. Cada punto representa la media \pm EEM de “n” experimentos obtenidos de al menos 3 placas de células CHO diferentes. ANOVA de una vía seguida de Tukey test. * $P < 0.05$ vs. células transfectadas solo con canales Nav1.5.

Ejemplo 2.2. Densidad de corriente generada por los canales Kir2.1 humanos.

Vistos los resultados del ejemplo 2.1, en este ejemplo se analizó únicamente el péptido descrito en SEQ ID NO: 3 utilizando su ADNc (SEQ ID NO: 5).

30

Para ello, se transfectaron células CHO con el ADNc que codifica los canales cardiacos humanos (Kir2.1) que generan la I_{K1} (Origene, USA) (SEQ ID NO: 22) cotransfectando las células, o no, con el ADNc descrito en SEQ ID NO: 5. En estos experimentos la solución externa que bañaba a las células y la interna que rellenaba las micropipetas tenían la siguiente composición (mM): NaCl 136, KCl 4, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1, HEPES

35

10 y glucosa 10 (pH=7.4 con NaOH) y K-aspartato 80, KCl 50, KH_2PO_4 10, MgATP 3, HEPES 10, EGTA 5 (pH=7.25 con KOH), respectivamente. La frecuencia de muestreo fue de 4 kHz y los datos, filtrados a una frecuencia de 2 kHz, se almacenaban en discos duros para su posterior análisis utilizando la aplicación CLAMPFIT del programa pCLAMP.

5 La corriente ($I_{\text{Kir}2.1}$) se registró aplicando pulsos de 250 ms desde -120 hasta +20 mV partiendo de un potencial de fijación de -60 mV. La densidad de la misma se obtuvo al normalizar la amplitud de la $I_{\text{Kir}2.1}$ al final del pulso por la capacitancia de cada célula (pA/pF). En la Figura 2 se muestra la densidad de $I_{\text{Kir}2.1}$ en función del potencial de membrana (mV) del pulso aplicado en células transfectadas con el ADNc que codifica

10 los canales Kir2.1 y cotransfectadas o no con el ADNc que codifica el péptido SEQ ID NO: 3. Como en el ejemplo 2.1, cada punto representa la media \pm EEM de “n” experimentos obtenidos de al menos 3 placas de células CHO diferentes. ANOVA de una vía seguida de Tukey test. * $P < 0.05$ vs. células transfectadas solo con canales Kir2.1. De nuevo SEQ ID NO: 3 fue capaz de aumentar significativamente la densidad

15 de la $I_{\text{Kir}2.1}$.

Ejemplo 2.3. Densidad de corriente generada en cardiomiocitos humanos

Infectamos cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC-CM) con el virus adenoasociado serotipo 9 Ad-td-Tomato (control) o

20 con un virus adenoasociado serotipo 9 que contenía el ADNc del péptido 15-25 (SEQ ID NO: 5) y el de td-Tomato (Aav-DECA-11; Aav-SEQ ID NO: 5). Se utilizaron hiPSC-CM comerciales (iCell Cardiomyocytes®) que fueron descongeladas y mantenidas en cultivo durante 10 días siguiendo los protocolos descritos por el fabricante (Cellular Dynamics, EEUU). La infección con el Ad-td-Tomato (proteína roja fluorescente) o Ad-

25 DECA-11 se realizó 48 h antes de proceder con los registros de las corrientes mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula entera (*whole-cell*). La solución externa que bañaba a los cardiomiocitos y la interna que rellenaba las micropipetas tenían la siguiente composición cuando se registraba la I_{Na} (mM): NaCl 20, MgCl_2 1.5, CaCl_2 1, CsCl 115, HEPES 5, glucosa 10 y nifedipino (1 μM) (pH= 7.35 con CsOH) y

30 NaF 10, CsF 110, EGTA 10, CsCl 20 y HEPES 10 (pH=7.35 con CsOH), respectivamente. Para registrar la $I_{\text{K}1}$, la composición de la solución externa era (mM): NaCl 148, MgCl_2 1, CaCl_2 1.8, KCl 5.4, NaH_2PO_4 0.4, HEPES 15, glucosa 11 y nifedipino (5 μM) (pH= 7.35 con NaOH) y la de la interna (mM): KCl 148, MgCl_2 1, EGTA 5, Creatina 2, Mg-ATP 5, fosfocreatina 5, HEPES 5 (pH=7.2 con KOH). En la

35 Figura 3, se comprueba que la infección con el virus que codifica DECA-11 es capaz

de aumentar significativamente la densidad de la I_{Na} y la I_{K1} registradas en cardiomiocitos humanos derivados de iPSC. En esta figura, cada punto representa la media \pm EEM de “n” experimentos/ cardiomiocitos obtenidos de al menos 3 placas de cultivo diferentes. * $P<0.05$ frente a cardiomiocitos infectados con Ad-td-Tomato.

5 ANOVA de una vía seguida de Tukey test.

En pacientes con IC aumenta el componente sostenido de la I_{Na} denominado I_{NaL} . Este aumento produce un incremento de las concentraciones intracelulares de Na^+ lo que, a su vez, altera el manejo del Ca^{2+} intracelular y prolonga la duración de los potenciales de acción provocando efectos proarrítmicos. Por ello, quisimos ver si DECA-11 modificaba la I_{NaL} . Para ello, en cardiomiocitos humanos derivados de iPSC se aplicaron pulsos de 500 ms de duración desde -120 hasta -45 mV y se registró la I_{Na} y la I_{NaL} utilizando las soluciones “externa” e “interna” que se acaban de describir. La I_{NaL} se describe como el componente de la corriente sostenida que es sensible a tetrodotoxina (TTX) (10 μ M) y para cuantificarla se midió como porcentaje del pico de corriente (%). En la Figura 4 se muestra que DECA-11 no aumenta la I_{NaL} .

10

15

Todos los datos presentados hasta el momento demuestran que SEQ ID NO: 3 es capaz de aumentar la densidad de la I_{Na} y la I_{K1} en sistemas de expresión heterólogos y en cardiomiocitos humanos sin modificar la de la I_{NaL} .

20

Ejemplo 3. Efecto protranscripcional de DECA-11

Para estudiar el efecto protranscripcional, se sembraron células HEK-293 en placas de 96 pocillos y se transfectaron con 300 ng de vectores pLightSwitch-Prom luciferase que codificaban el promotor mínimo humano (\approx 1000 pares de bases) de los genes *SCN5A* o *KCNJ2* (Active Motif) y se cotransfectaban o no con el vector que contenía el ADNc del péptido 15-25 (SEQ ID NO: 5). 48 h tras la transfección, se realizaron los ensayos de luciferasa utilizando el reactivo *LightSwitch Luciferase Assay*, también de Active Motif, y un luminómetro Berthold. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y cada punto representa la media de cada triplicado técnico. Se comprobó que el péptido descrito en SEQ ID NO: 3 no ejerce un efecto significativo sobre el promotor mínimo del gen *SCN5A* humano (Figura 5), sin embargo, sí ejerce un efecto protranscripcional sobre el promotor mínimo del gen *KCNJ2* humano, lo que implica que aumenta la expresión de los canales Kir2.1.

25

30

35

Ejemplo 4. Ensayos en modelo murino de IC

- Se utilizó un modelo murino de IC con fracción de eyección reducida (ICfeR) para analizar el efecto de SEQ ID NO: 3 sobre la disminución de la I_{Na} y la I_{K1} producida por el remodelado eléctrico asociado a la IC. Se trata de ratones a los que se les provoca una coartación aórtica transversa mediante ligadura (*Transverse aortic constriction*, TAC); la sobrecarga de presión provoca la aparición de hipertrofia cardíaca e IC. Los ratones fueron generados en el Centro de Investigación Médica de la Universidad de Navarra (CIMA), bajo la dirección de la Dra. Aránzazu González Miqueo.
- Se utilizaron ratones de 8 semanas de edad a los que se administraron 3.5×10^{10} partículas de virus adenoasociados tipo 9 que codificaban o bien el reportero fluorescente td-Tomato (Aav-dt-T) sólo, o bien, el reportero y el péptido DECA-11. A las 12 semanas de edad se realizó un control ecocardiográfico (basal) y en la semana 13 se les practicó una cirugía en la que se les ligaba la aorta (animales TAC) o no (animales Sham). En la parte superior de la Figura 6 se muestra cada uno de los procedimientos a los que fueron sometidos los animales en función de su edad (en semanas); en la parte inferior se muestran los cuatro grupos de animales sometidos a cirugía con ligadura (TAC) o no (Sham).
- En la semana 19 de vida se les practicó un nuevo control ecocardiográfico (ECO) que demostraba que los animales TAC presentaban ICfeR, tal y como se esperaba. Esa misma semana se enviaron al animalario de la UCM. A continuación, los ratones fueron heparinizados y anestesiados y luego sacrificados por dislocación cervical, a razón de uno por día, practicándose una toracotomía para extraer el corazón que fue montado a través de la aorta en una cánula conectada a un aparato de Langerdorff para la disociación enzimática de los miocitos cardíacos. Tras la extracción del corazón, éste se canulaba a través de la aorta y se colocaba en un aparato de Langerdorff. En primer lugar, se perfundían los corazones con una solución de Tyrode modificada (composición en mM: NaCl 136, KCl 4, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1.8, HEPES 10, glucosa 10, Ac. pirúvico 3 y tiamina 0.1, pH=7.4 con NaOH) burbujeada con oxígeno y a 37° C durante 3-5 minutos. Posteriormente, se perfundían otros 8 minutos con la misma solución que no contenía CaCl₂. Transcurridos 1 o 2 minutos, el corazón deja de latir. A continuación, se perfundían con la solución de Tyrode sin CaCl₂ suplementada con 120 u/mL de collagenasa tipo II de Worthington y 0.5 u/mL de proteasa XIV de Sigma. Por último, los corazones eran perfundidos con una solución denominada KB de la

siguiente composición (mM): KCl 25, KH_2PO_4 10, MgCl_2 2, EGTA-K 0.5, HEPES-K 5, ac. glutámico 100, ac. aspártico 10, taurina 20, creatina 5 y glucosa 10 (pH=7.2 con KOH). Transcurrido todo este proceso, se descolgaba el corazón de la cánula y se agitaba en alíquotas de solución KB donde se iban disgregando los miocitos que se almacenaban en la nevera durante al menos una hora antes de comenzar los registros electrofisiológicos.

En la Figura 7 se muestra la capacitancia (pF) de los miocitos cardiacos disociados de los cuatro grupos de ratones (12 en total). La capacitancia es una medida indirecta y fiable del tamaño de las células. Como se puede observar, no había diferencias significativas en la capacitancia de los miocitos de los animales Sham, hubieran sido éstos infectados con Ad-td-Tomato (control) o con Aav-DECA-11. Por el contrario, la capacitancia de los cardiomiocitos de los animales sometidos al procedimiento TAC resultó significativamente mayor ($P<0.05$) que la de los animales Sham control y DECA-11. Este resultado concuerda con lo esperado, puesto que los animales TAC presentan hipertrofia cardiaca y, por tanto, el tamaño de sus cardiomiocitos es mayor que el de los de corazones normales.

La capacitancia de los miocitos de los animales TAC tratados con DECA-11 resultó ser significativamente menor que la de los animales TAC no tratados lo que indica que la administración de DECA-11 previene la aparición de hipertrofia de los cardiomiocitos asociada a la ICfeR.

Para registrar la I_{Na} en cardiomiocitos de ratón, la composición de la solución externa fue (mM): NaCl 4, MgCl_2 1, CaCl_2 1, CdCl_2 0.1, CsCl 133.5, HEPES 20 y glucosa 11 (pH=7.35 con CsOH) y la que rellenaba la micropipeta de registro (mM): NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10 y EGTA 10 (pH 7.35 con CsOH). El resto de protocolos y condiciones eran iguales a los utilizados para el registro de la I_{Na} en cardiomiocitos humanos derivados de iPSC (según el Ejemplo 2.3). Como se muestra en la Figura 9, en animales con ICfeR, y como consecuencia del remodelado eléctrico, la densidad de la I_{Na} registrada en cardiomiocitos de ratones TAC control fue significativamente menor a la de los ratones Sham control. El pretratamiento con DECA-11 aumentó la densidad de la I_{Na} de los cardiomiocitos de los animales Sham y, más importante, aumentó de forma significativa y marcada la densidad de la I_{Na} de los cardiomiocitos TAC. Este resultado demuestra que la administración de DECA-11 previene la

disminución de la densidad de la I_{Na} producida por la ICfeR en un modelo murino.

Como ya se ha indicado, en los cardiomiocitos de ratones de los cuatro grupos también se registró la I_{K1} . Para ello, la composición de la solución externa era (mM): NaCl 140, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, KCl 4, HEPES 10, 4-aminopiridina 2, nifedipino (1 μ M), atropina (0.1 μ M), glibenclamida (10 μ M) y glucosa 10, (pH= 7.35 con NaOH) y la de la interna (mM): K-aspartato 80, KCl 50, KH₂PO₄ 10, MgATP 3, HEPES 10, EGTA 5 (pH=7.25 con KOH). Como consecuencia del remodelado eléctrico asociado a la ICfeR producida por la constricción transversal de la aorta, la densidad de la I_{K1} fue significativamente menor en los cardiomiocitos de los animales TAC control que en la de los Sham control (Figuras 9A y 9B). Tanto en animales Sham como en animales TAC la administración de DECA-11 aumenta significativamente la I_{K1} . De hecho, la densidad de la I_{K1} en los animales TAC pretratados con DECA-11 no es diferente de la que se registra en animales Sham. Estos resultados demuestran que la administración de DECA-11 previene la disminución de la densidad de la I_{K1} producida por la ICfeR en un modelo murino.

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 5 2. Péptido según la reivindicación 1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso como medicamento.
- 10 4. Péptido según la reivindicación 3 para su uso como medicamento en enfermedades cardíacas.
- 15 5. Péptido según la reivindicación 4 donde las enfermedades cardíacas pertenecen al grupo formado por: arritmias ventriculares asociadas a la hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca y/o a los síndromes hereditarios secundarios a mutaciones en los genes *SCN5A* o *KCNJ2* que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5 o Kir2.1.
- 20 6. Péptido según la reivindicación 5 donde los síndromes hereditarios pertenecen al grupo formado por: el Síndrome de Brugada, el Síndrome de disminución progresiva de la conducción (*Progressive cardiac conduction defect*) y el Síndrome de Andersen-Tawil.
- 25 7. Molécula de ADNc que codifica un péptido definido en las reivindicaciones 1-2.
8. Molécula de ADNc según la reivindicación 7 que se selecciona de entre las secuencias descritas en SEQ ID NO: 5-19.
- 30 9. Molécula de ADNc que consiste en SEQ ID NO: 5.
10. Molécula de ADNc según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 para su uso como medicamento.
- 35 11. Molécula de ADNc según la reivindicación 10 para su uso como medicamento en

enfermedades cardíacas.

12. Molécula de ADNc según la reivindicación 11 donde las enfermedades cardíacas pertenecen al grupo formado por: arritmias ventriculares asociadas a la hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca y/o a los síndromes hereditarios secundarios a mutaciones en los genes *SCN5A* o *KCNJ2* que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5 o Kir2.1.
13. Molécula de ADNc según la reivindicación 12 donde los síndromes hereditarios pertenecen al grupo formado por: el Síndrome de Brugada, el Síndrome de disminución progresiva de la conducción (*Progressive cardiac conduction defect*) y el Síndrome de Andersen-Tawil.
14. Vector que incluye una molécula de ADNc definida en cualquiera de las reivindicaciones 7-9.
15. Célula eucariota o procariota que contiene cualquiera de los péptidos, moléculas de ADNc o vectores definidos en las reivindicaciones 1, 2, 7-9, 14.
16. Composición farmacéutica que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
17. Composición farmacéutica que comprende la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 7-9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
18. Composición farmacéutica que comprende el vector, y/o la célula de cualquiera de las reivindicaciones 14-15 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
19. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 16-18 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardíacas.
20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19 donde las enfermedades cardíacas pertenecen al grupo formado por: arritmias ventriculares asociadas a la hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca y/o a los síndromes hereditarios secundarios a mutaciones en los genes *SCN5A* o *KCNJ2* que producen la pérdida de

función de los canales Nav1.5 o Kir2.1.

21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20 donde los síndromes hereditarios pertenecen al grupo formado por: el Síndrome de Brugada, el Síndrome de disminución progresiva de la conducción (*Progressive cardiac conduction defect*) y el Síndrome de Andersen-Tawil.
- 5

Fig. 1

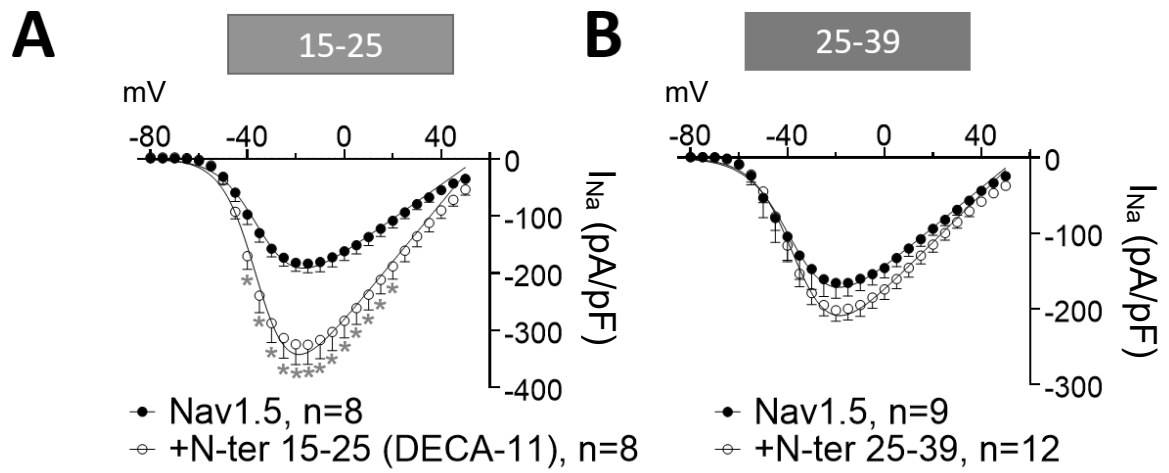


Fig. 2

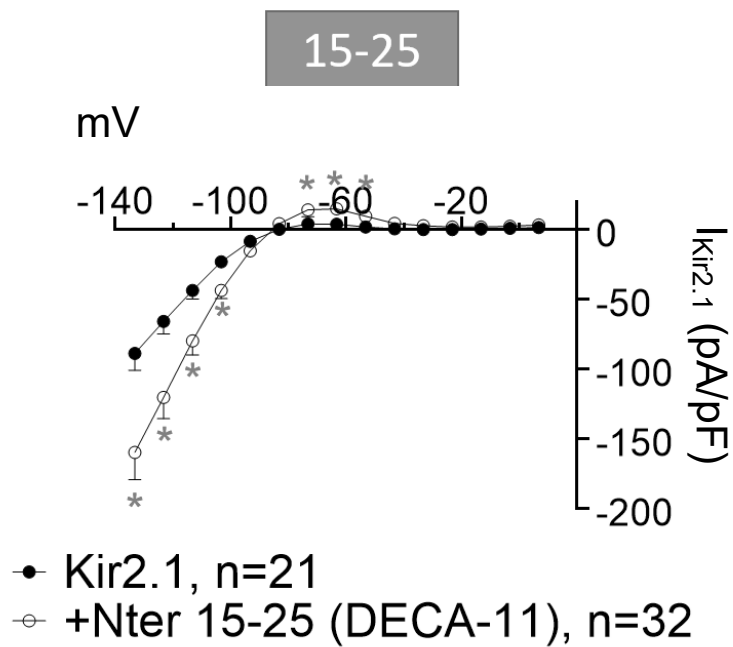


Fig 3

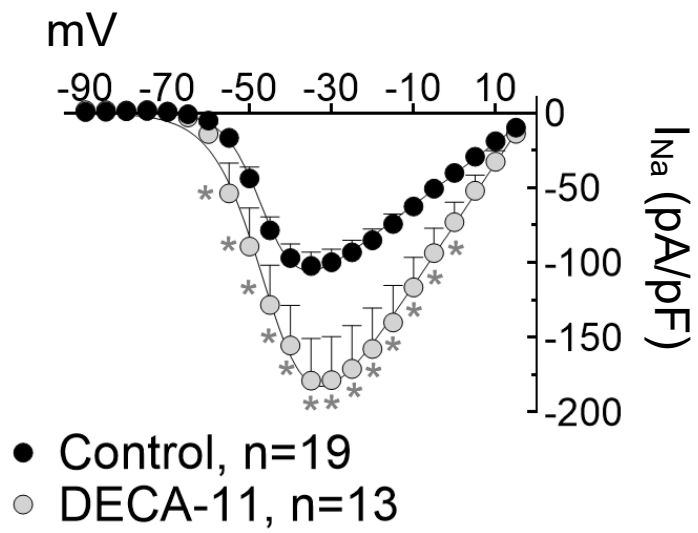
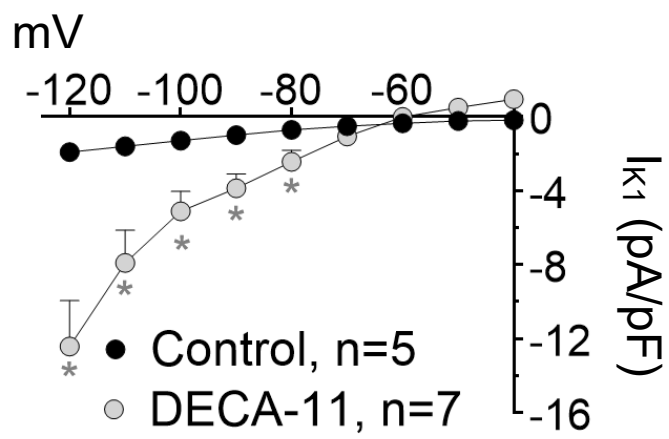
A**B**

Fig. 4

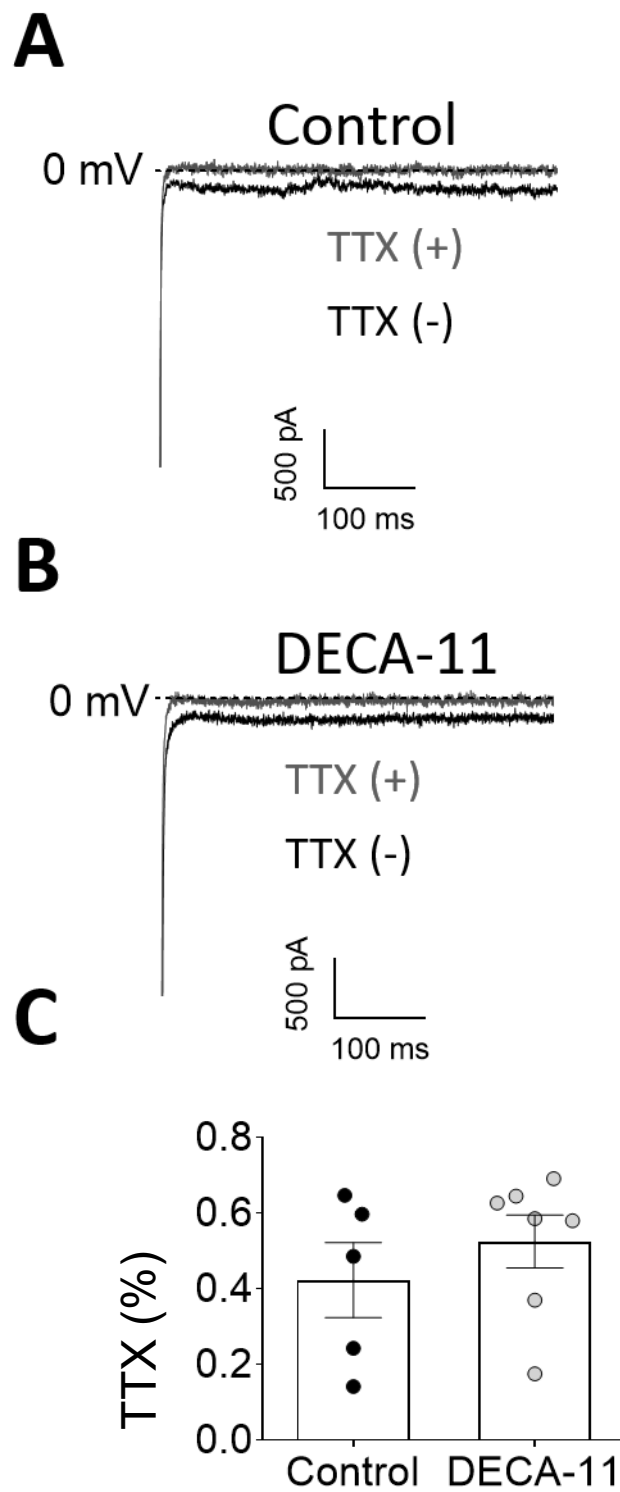
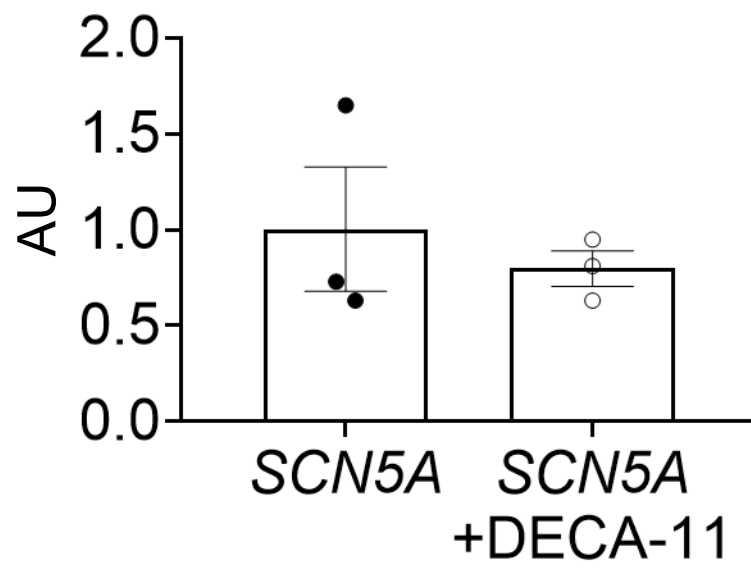


Fig. 5

A



B

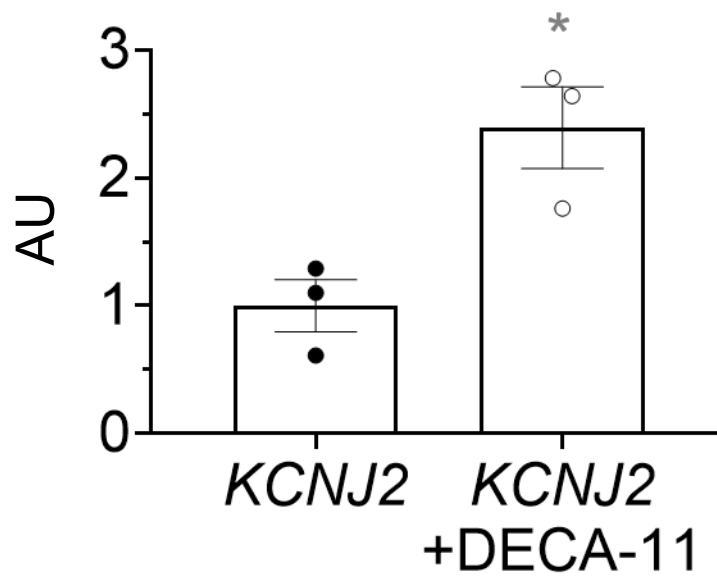


Fig. 6

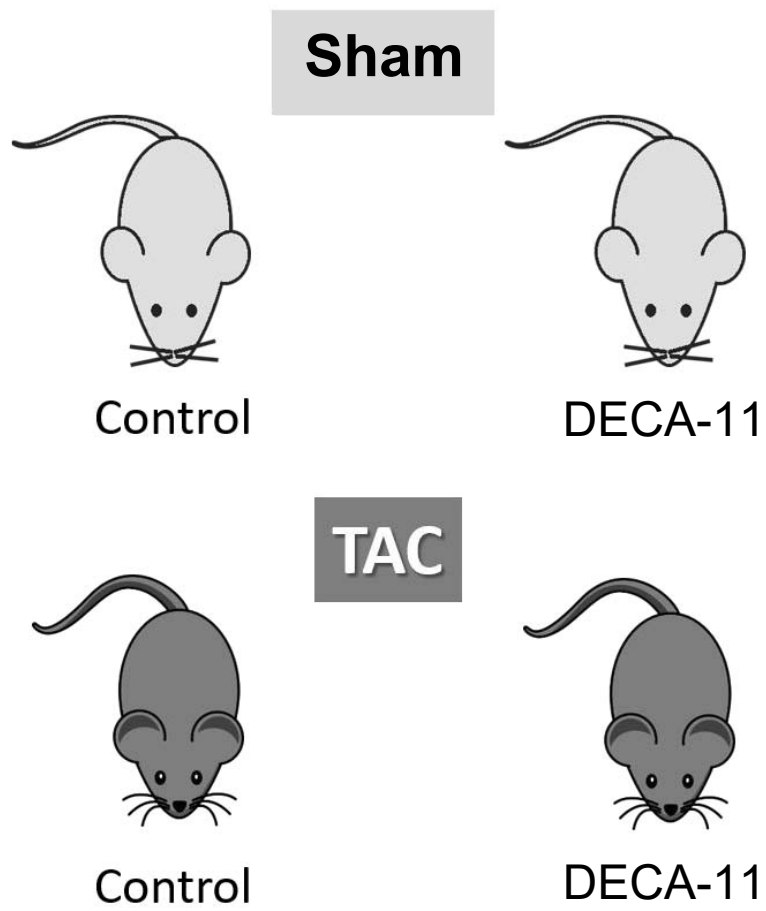
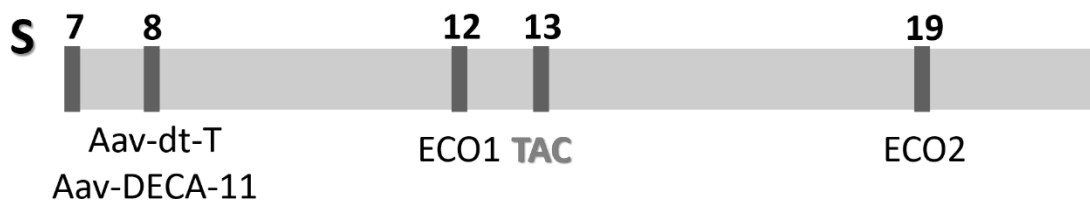


Fig. 7

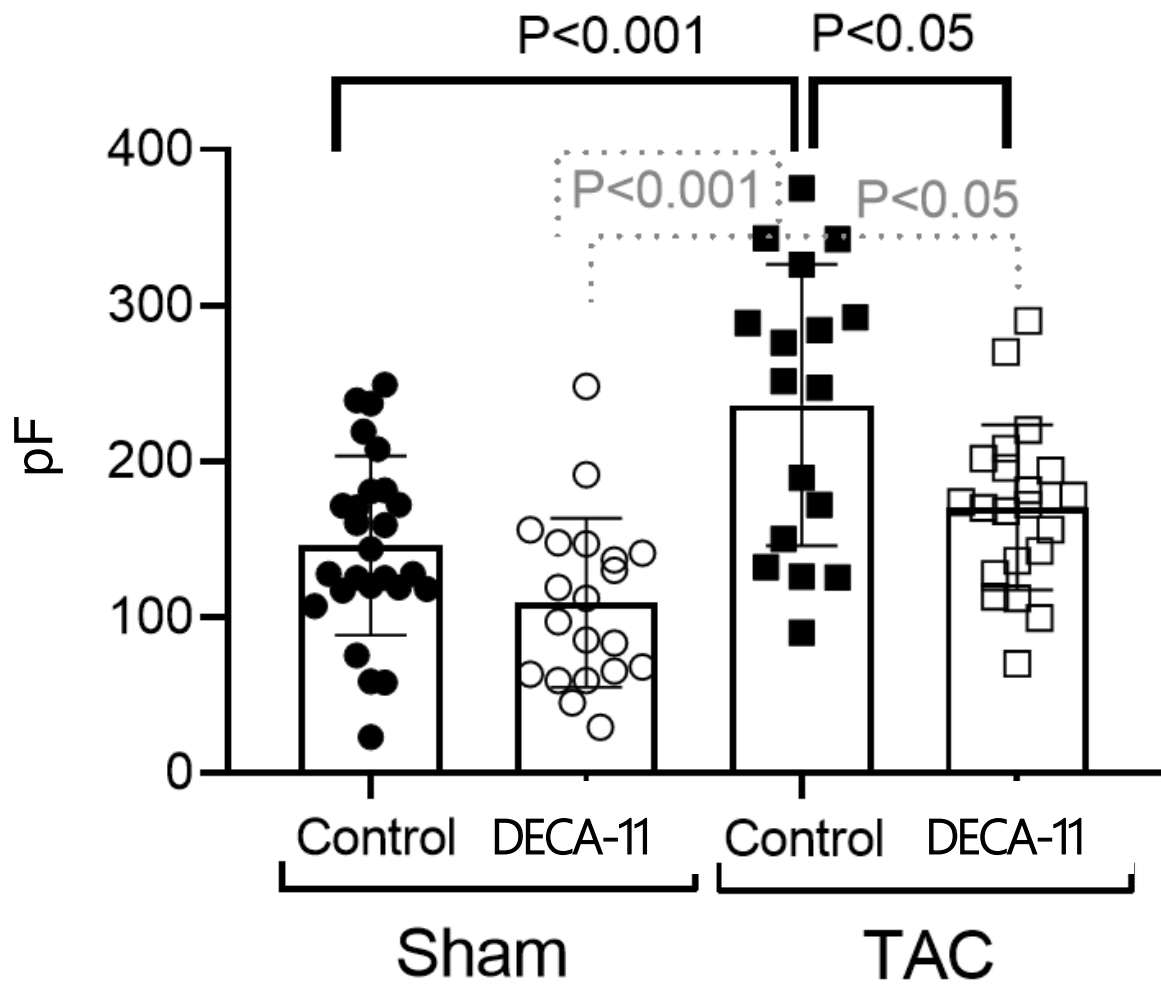


Fig. 8

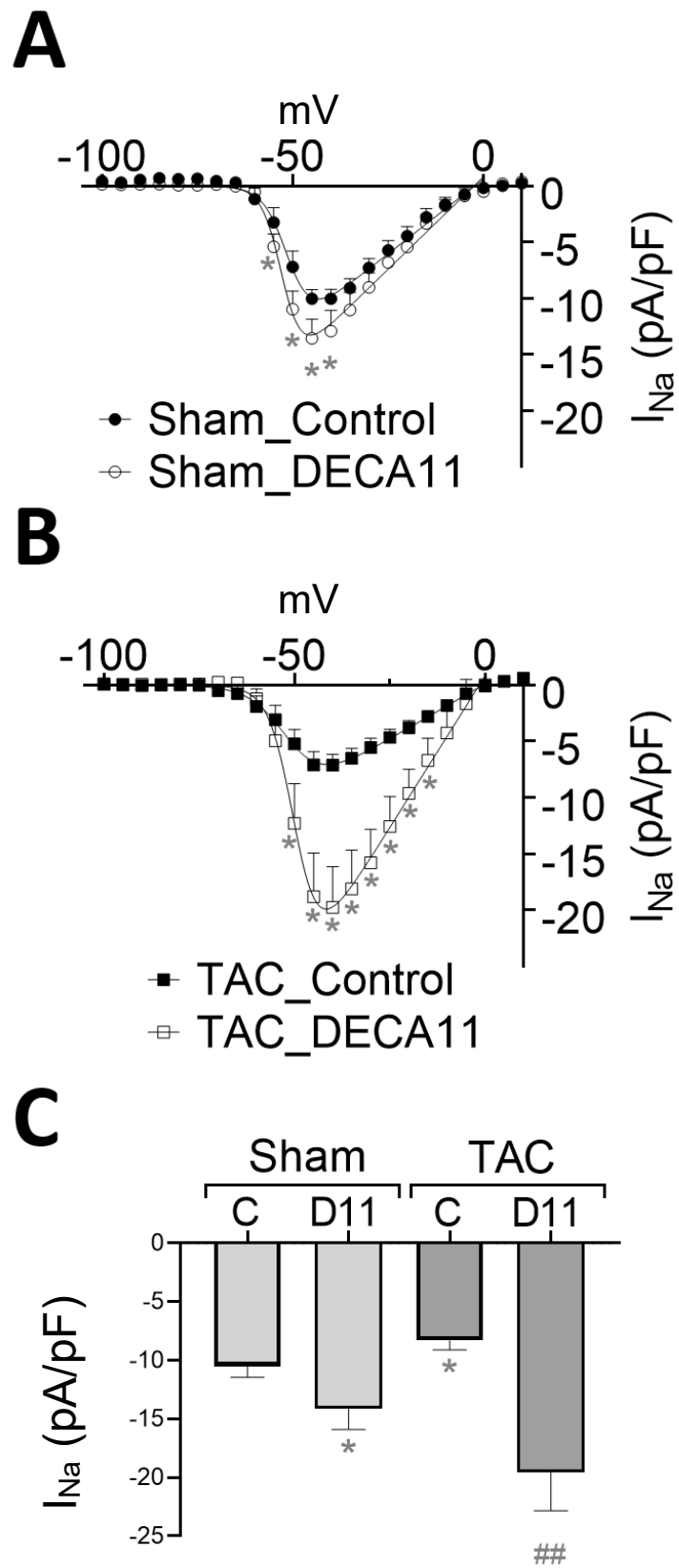
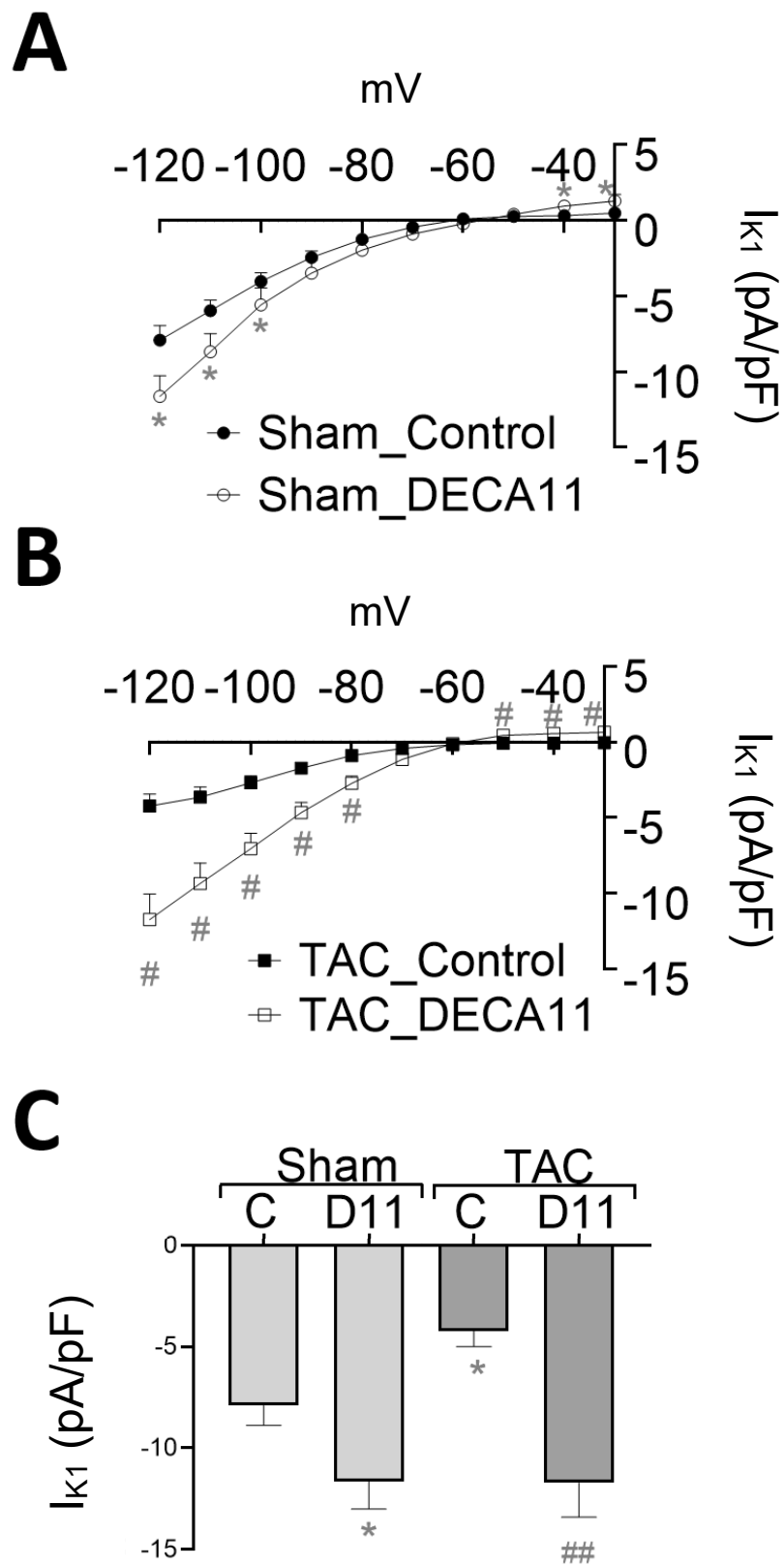


Fig. 9





- ②① N.º solicitud: 202330798
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2023
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X, D	MATAMOROS et al. Nav1.5 N-terminal domain binding to α 1-syntrophin Increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. Cardiovascular Research.19/01/2016, N° 110, Páginas 279-290 [en línea][recuperado el 18/10/2023]. , <DOI: doi:10.1093/cvr/cvw009 >. Abstract, figura 6, página 284, 2ª columna, último párrafo; página 285, 2ª columna, último párrafo y siguientes y figura 7.	2-21
A	PROTEIN [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] -. Accession No. NP_000326.2. sodium channel protein type 5 subunit alpha isoform b [Homo sapiens]. PRI 14-AUG-2023. Recuperado de Internet <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000326.2 >. <p> </p>	2-21
A	EP 3811451 A1 (UNIV PITTSBURGH COMMONWEALTH SYS HIGHER EDUCATION) 28/04/2021	2-21
A	EP 3690054 A2 (BETHPHAGEN INC) 05/08/2020	2-21
A	US 2020262877 A1 (MEHLIN CHRISTOPHER et al.) 20/08/2020	2-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
D: Documento citado por el solicitante en la solicitud

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 2-21

Fecha de realización del informe
27.10.2023

Examinador
A. Ugidos Valladares

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K7/06 (2006.01)

C07K14/47 (2006.01)

A61K38/08 (2019.01)

A61P9/06 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, NCBI, NPL y bases de texto TXT.