



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 730**

51 Int. Cl.:

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| C07K 14/16 (2006.01) | C12N 9/12 (2006.01) |
| C12N 9/16 (2006.01) | A61K 38/16 (2006.01) |
| A61K 38/45 (2006.01) | A61K 38/46 (2006.01) |
| C12N 15/48 (2006.01) | C12N 15/54 (2006.01) |
| C12N 15/55 (2006.01) | G01N 33/68 (2006.01) |
| A61P 31/12 (2006.01) | A61P 33/00 (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02774847 .4**

96 Fecha de presentación : **26.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1530584**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2005**

54 Título: **Péptidos sintéticos o naturales que unen la proteína fosfatasa 2A, procedimiento de identificación y usos.**

30 Prioridad: **27.07.2001 FR 01 10139**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.01.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.01.2010

73 Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)

72 Inventor/es: **Garcia, Alphonse;**
Cayla, Xavier;
Rebollo, Angelita y
Langsley, Gordon

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 331 730 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos sintéticos o naturales que unen la proteína fosfatasa 2A, procedimiento de identificación y usos.

5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos, sintéticos o naturales, útiles en particular en el tratamiento de las infecciones víricas o parasitarias o en el tratamiento de tumores, siendo dicho péptidos de un tamaño inferior a 30 aminoácidos, preferentemente inferior a 20 aminoácidos, en particular de 15 a 20 aminoácidos, y caracterizados porque ligan, *in vitro*, de manera específica, una holoenzima proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades. La invención se refiere asimismo a un procedimiento de identificación de dichos péptidos, y a sus usos.

10 Debido al papel de los péptidos de la invención en la modulación de la actividad de la proteína fosfatasa 2A celular, es importante recordar como introducción los conocimientos actuales sobre las proteína fosfatasas 2A, su función fisiológica y sus interacciones con ciertas proteínas celulares, víricas o parasitarias.

15 La fisiología de la célula se controla en parte por la modulación del estado de fosforilación de las proteínas. El estado de fosforilación de las proteínas celulares depende de la acción antagonista de las proteína quinasas que las fosforilan y de las proteína fosfatasas que las desfosforilan.

20 Las proteína fosfatasas se dividen en dos grupos principales: las tirosina fosfatasas y las serina/treonina fosfatasas. Las serina/treonina fosfatasas se clasifican en dos categorías según la especificidad de su sustrato y su sensibilidad a ciertos inhibidores, las fosfatasas de tipo 1 (PP1) y las fosfatasas de tipo 2 (PP2). Las fosfatasas de tipo 2 se dividen asimismo en diferentes clases, incluyendo la fosfatasa 2A (PP2A), la fosfatasa 2B o calcineurina, cuya actividad está regulada por el calcio, y la fosfatasa 2C (PP2C) cuya actividad está regulada por el magnesio.

25 Se sabe ahora que las fosfatasas de tipo 2A están muy conservadas durante la evolución y están potencialmente implicadas en la regulación de numerosos procesos biológicos. Las enzimas PP2A han estado claramente implicadas en la regulación de la transcripción, el control del ciclo celular o de la transformación vírica. Además, las PP2A son la diana de diferentes proteínas víricas o parasitarias, lo que sugiere un papel de las PP2A en las interacciones hospedantes-patógenos.

30 Las PP2A son unos complejos oligoméricos (holoenzimas) que comprende cada una, una sub-unidad catalítica (C) y una o dos sub-unidades reguladoras, (A) y (B). La estructura de la sub-unidad (A) consiste en 15 repeticiones imperfectas de una secuencia de aminoácidos conservada de 38 a 40 aminoácidos, de las cuales algunas interactúan con las sub-unidades (B) y (C). Las sub-unidades (A) y (C), conservadas durante la evolución, constituyen la estructura básica de la enzima y son expresadas constitutivamente. Por el contrario, las sub-unidades (B) constituyen una familia de proteínas reguladoras no unidas por una estructura común y expresadas diferencialmente (Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. Annu Rev Biochem 1989; 58: 453-508). Así, las proteína fosfatasas 2a existen *in vivo* en dos clases de forma diferentes: una forma dimérica (AC) y una forma trimérica (ABC). Las sub-unidades (B) regulan la actividad fosfatásica y la especificidad frente al sustrato. La existencia de formas múltiples de PP2A está correlacionada con unas funciones distintas y variadas de las PP2A *in vivo*.

35 Recientemente, diferentes proteínas sintetizadas mediante unos patógenos, y en particular unas proteínas víricas y parasitarias, han sido implicadas en la modulación de ciertas actividades específica de las proteína fosfatasas 2A.

40 Diferentes estrategias que implican PP2A han sido adoptadas por los virus para facilitar su replicación y su supervivencia en la célula hospedante. Por ejemplo, el virus de la *parainfluenza* incorpora en su partícula vírica la proteína PKC ζ , proteína de origen celular bajo el control de PP2A. Esto le permite perturbar la fosforilación de las proteínas de su hospedante y facilitar su propia replicación (De BP, Gupta S., Barnejee AK. Cellular protein kinase C ζ regulates human parainfluenza virus type 3 replication. Proc. Natl. Acad Sci USA 1995; 92:5204-8).

45 Varios virus con ADN que tiene un poder transformante, tales como los *papovae* o los adenovirus, así como ciertos virus, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), codifican para unas proteínas que interactúan directamente con ciertas PP2A del hospedante. Todos estos virus comprenden unas proteínas que aunque son estructuralmente diferentes, interactúan con ciertas holoenzimas y modifican su actividad fosfatásica.

50 Se ha demostrado en particular que la proteína E4orf4 de los adenovirus se une a una PP2A heterotrimérica, y más precisamente a una sub-unidad reguladora (B), lo que conlleva una disminución de la transcripción de JunB en la célula infectada. Este efecto podría desempeñar un papel importante durante la infección vírica regulando la respuesta apoptótica de las células infectadas. De manera interesante, se ha demostrado asimismo que la interacción de E4orf4 con PP2A induce la apoptosis de las células transformadas de una manera p53-independiente (Shtrichman R. *et al.* Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells. J. Virol. 1998; 72: 2975-82).

55 Los virus que generan unos tumores de la familia de los *Papovae*, que incluyen SV40 y el virus del polioma, inducen la transformación celular. Se ha demostrado que PP2A interactúa con el antígeno "T minúscula" de SV40 o del polioma así como con la proteína transformante "T media" del polioma. Estas interacciones de proteínas víricas con PP2A han sido claramente implicadas en la transformación vírica. Por último, la regulación transcripcional, un proceso realizado normalmente en la célula por los diferentes factores que se fijan específicamente sobre unas secuen-

5 cias reguladoras promotoras, representa probablemente el mecanismo más importante implicado en el control de la expresión vírica por PP2A. Así, se ha demostrado que PP2A es un regulador negativo de numerosos factores de transcripción implicados en particular en los procesos de crecimiento y de proliferación celular, incluyendo AP1/SRE, NF-KB, Sp1 y CREB (Waszinski, B. E., Wheat W. H., Jaspers S., Peruski L. F., JR Lickteig R. L., Johnson G. L., y Klemm D. J. Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB Transcriptional stimulation. Mol Cell Biol. 1993 13, 2822-34). La regulación vírica de estos factores de transcripción permitiría modular la transcripción vírica.

10 La proteína vírica de VIH-1, *Vpr*, interactúa *in vitro* con PP2A y estimula la actividad catalítica de PP2A (Tung L, *et al*, Direct activation of protein phosphatase 2A0 by HIV-1 encoded protein complex Ncp7:vpr. FEBS Lett 1997; 401: 197-201). *Vpr* puede inducir la detención en G2 de las células infectadas inhibiendo la activación del complejo p34cdc2-ciclina B. Por otro lado, *Vpr* interactúa con el factor de transcripción Sp1 y es un trans-activador débil de la transcripción de VIH-1 Sp1-dependiente. Así, la proteína *Vpr* de VIH-1, que está incorporada en el virión, estaría implicada *in vivo* en la iniciación de la transcripción vírica, una etapa evidentemente esencial para regular la expresión del factor de transcripción Tat (un regulador principal de la transcripción codificado por el virus VIH-1).

15 Al contrario del papel bien establecido de las proteína quinasas en las infecciones parasitarias, es sólo durante estos últimos tres años cuando las serina/treonina fosfatasa han empezado a ser reconocidas como unos reguladores potenciales importantes en el campo de la parasitología.

20 Inicialmente, dos serina-treonina fosfatasa, Ppβ y PFP han sido identificadas en *Plasmodium falciparum*. La presencia de actividad fosfatásica de tipo 1 y de tipo 2A en el parásito se ha demostrado mediante unos estudios enzimológicos. Últimamente, se han purificado unas enzimas parasitarias PP2A y PP2B.

25 Las serina/treonina fosfatasa han sido recientemente estudiadas en *Theileria parva*, otro protozooario cercano de *P. falciparum* que parasita los bovinos. Las células hospedantes, monocitos y leucocitos, que son infectadas por el parásito son transformadas, lo que se traduce por una leucemia en el animal. Los parásitos purificados de células infectadas por *Theileria* expresan una proteína quinasa CK2α. Ahora bien, la sub-unidad CK2α interactuaría con PP2A para modular positivamente su actividad (Hériché H., *et al.*, Regulation of Protein Phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2α. Science 1997; 276: 952-5). Asimismo, la modulación de la PP2A a través de la expresión de la sub-unidad CK2α podría ser la causa del bloqueo de dos vías de señalización en la célula parasitada, la de las MAP-quinasas (Chaussepied M., *et al.* Theileria transformation of bovine leukocytes: a parasite model for the study of lymphoproliferation. Res Immunol. 1996; 147: 127-38) y la de la proteína quinasa B (Akt) (M. Baumgartner, M. Chaussepied, MF Moreau, A. Garcia, G. Langsley. Constitutive P13-K activity is essential for proliferation, but not survival, of *Theileria parva* - transformed B Cells. Cellular Microbiol. (2000) 2, 329-339).

30 La ausencia de motivos comunes al conjunto de las proteínas que interactúan con PP2A impide la identificación bio-informática de los motivos peptídicos directamente implicados en la unión de estas proteínas con PP2A.

35 Ahora bien, debido a la función principal de las proteína fosfatasa 2A en las interacciones virus-hospedantes o parásitos-hospedantes tal como se ha resumido anteriormente, se entiende el interés de identificar los sitios de unión de las proteínas víricas o parasitarias con las holoenzimas PP2A o una de sus sub-unidades, con el fin de identificar nuevas dianas terapéuticas para estos patógenos, víricos o parasitarios.

40 En particular, la identificación de los péptidos que interactúan con PP2A permitiría producir nuevos medicamentos susceptibles de bloquear mediante inhibición competitiva los mecanismos celulares inducidos por las proteínas víricas o parasitarias a través de su interacción con PP2A y en particular los mecanismos de infección, de proliferación de los patógenos y de transformación de las células. Algunos de estos péptidos han sido descritos en el documento WO-A-9801563 (R. Marallus *et al.*).

45 La invención se interesa en unos medios de identificar unos péptidos de tamaño reducido, que unen una holoenzima PP2A o una de sus sub-unidades. Al contrario de las proteínas nativas o dominios polipeptídicos de tamaño importante, unos péptidos de tamaño reducido tienen la ventaja de ser fácilmente sintetizados, por vía química o en sistemas celulares, con un rendimiento importante y un coste reducido. Los péptidos de la invención son además más estables y más fácilmente transferidos en el citoplasma o en el núcleo de las células con la ayuda de vectores apropiados, con vistas a un uso terapéutico.

50 La invención se deriva de la demostración de que es posible identificar unos péptidos, de un tamaño inferior a 30 aminoácidos, y en particular unos péptidos de un tamaño inferior a 20 aminoácidos que interactúan con una holoenzima PP2A o una de sus sub-unidades.

55 En particular, los inventores han mostrado que el uso de la técnica de los "SPOT synthesis" descrita por Frank y Overwing (Methods in Molecular Biology, 1996, vol. 66: 149-169, Epitope Mapping Protocols editado por: G.E. Morris Humana Press Inc., Totowa NJ) permite identificar los sitios de unión de las proteínas que interactúan con una holoenzima PP2A o una de sus sub-unidades.

60 Los inventores han identificado por ejemplo unos péptidos de un tamaño inferior a 20 aminoácidos, que interactúan *in vitro* con la holoenzima PP2A purificada o una de sus sub-unidades, siendo dichos péptidos derivados de la

ES 2 331 730 T3

proteína *Vpr* de VIH-1 o de la proteína CK2 α del parásito *T. parva*. Unos antagonistas derivados de estos péptidos y seleccionados porque inhiben la interacción de las proteínas víricas o parasitarias con una holoenzima particular de PP2A podrían así constituir nuevos agentes antitumorales, antivíricos o antiparasitarios.

5 La invención se refiere a un procedimiento de identificación de un péptido cuya secuencia procede de una proteína vírica, parasitaria o celular, uniendo dicho péptido específicamente una holoenzima proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- 10 a) depositar en forma de puntos, sobre un soporte, unos péptidos cuya secuencia procede de una proteína vírica, parasitaria o celular, correspondiendo cada punto al depósito de un péptido de secuencia definida,
- b) poner en contacto el soporte sólido con una disolución que contiene una holoenzima proteína fosfatasa 2A o una de sus sub-unidades en unas condiciones que permiten que los péptidos presentes en el soporte unan la holoenzima o una de sus sub-unidades, y
- 15 c) identificar sobre el soporte sólido el péptido sobre el cual se fija la proteína fosfatasa 2A o una de sus sub-unidades.

20 Según la etapa a), diferentes péptidos son depositados sobre un soporte sólido en unas posiciones definidas (“spot”), correspondiendo cada posición a una secuencia peptídica específica y formando así el conjunto una red de péptidos (“array”) de dos dimensiones. Diferentes procedimientos de preparación de dichas redes han sido descritos recientemente (véase, Figeys y Pinto, 2001 *Electrophoresis* 22: 208-216; Walter *et al.*, 2000 *Curr Opin Microbiol* 3: 298-302). El conjunto de estos procedimientos comprende en general la fijación covalente de péptidos sobre un soporte, en particular con la ayuda de enlaces (Linkers) químicos. A título de ejemplo, el experto en la materia podrá referirse en particular a la técnica de “SPOT synthesis” que consiste en sintetizar directamente sobre una membrana de celulosa, unos péptidos que comprenden hasta 20 residuos (Frank y Overwing, *Methods in Molecular Biology*, 1996, vol. 66: 149-169, *Epitope Mapping Protocols* edited by: G.E. Morris Humana Press Inc., Totowa NJ).

30 De manera general, se puede usar cualquier procedimiento por cuanto que éste permita la obtención de una red de péptidos depositados sobre un soporte sólido, que se puede utilizar para detectar unas interacciones específicas entre los péptidos depositados y unos compuestos particulares.

35 De manera muy preferida, el conjunto de las secuencias de péptidos depositados recubre la secuencia completa de la proteína vírica, parasitaria o celular, de la cual proceden estas secuencias. Así, el procedimiento permite ensayar en una sola etapa la secuencia completa de una proteína determinada, siendo ésta “seccionada” en un número finito de péptidos, de secuencias generalmente que se solapan.

40 En un modo de realización preferido, los péptidos depositados en forma de punto son de un tamaño inferior a 20 aminoácidos, y mejor, de un tamaño inferior a 15 aminoácidos.

En otro modo de realización particular, los péptidos se depositan sobre una membrana de celulosa.

45 La red así obtenida se pone en contacto en la etapa b), con una holoenzima proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades.

50 Mediante la expresión “holoenzima proteína fosfatasa de tipo 2A” se debe entender cualquier complejo dimérico (AC) o heterotrimérico (ABC), purificado de un extracto celular o reconstituido después de la purificación de las dos sub-unidades (A) y (C) de una proteína fosfatasa de tipo (2A) y, llegado el caso, de una sub-unidad (B). Las proteínas fosfatasas de tipo (2A) proceden preferentemente de mamíferos.

55 Los soportes se incuban, por ejemplo, en una disolución tampón que comprende las proteínas fosfatasas purificadas o una de sus sub-unidades purificadas. Una disolución tampón que se puede utilizar es el TBS (TRIS BORATO) que contiene 5% de Régilait desnatada y 3% de BSA.

60 El péptido sobre el cual se fija la holoenzima proteína fosfatasa de tipo 2A se identifica generalmente por el marcado directo o indirecto de la proteína fosfatasa y la identificación de los puntos a nivel de los cuales se ha fijado la proteína marcada. La fijación de la PP2A o una de sus sub-unidades a nivel de uno de los puntos de péptidos puede así ser revelada en particular con la ayuda de antisueros, según las técnicas usadas habitualmente para la transferencia Western o el ensayo ELISA en fase sólida, después de la incubación del soporte que contiene la red de péptidos con un anticuerpo dirigido contra las sub-unidades (A) o (B) o (C) o una mezcla de anticuerpos dirigida contra las sub-unidades (A), (B) o (C) de PP2A.

65 La aplicación del procedimiento de la invención definida anteriormente conduce a la identificación de péptidos, en particular útiles en el tratamiento de ciertas infecciones víricas o parasitarias, de un tamaño inferior a 30 aminoácidos, incluso inferior a 20 aminoácidos, siendo dicho péptidos capaces de unir *in vitro* una holoenzima proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades.

ES 2 331 730 T3

Entonces, usando sus conocimientos generales en el campo de la síntesis peptídica, el experto en la materia puede producir unos péptidos derivados de los fragmentos de péptidos identificados mediante el procedimiento de la invención que presenta las propiedades ventajosas descritas anteriormente.

5 Por consiguiente, la solicitud describe un péptido, natural o sintético, de un tamaño inferior a 30 aminoácidos, preferentemente inferior a 20 aminoácidos, caracterizado porque une *in vitro*, de manera específica, una holoenzima proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades, (A), (B) o (C). Por unión específica, se debe entender que el péptido es capaz de inhibir de manera competitiva la unión de una proteína de origen vírico o parasitario con PP2A.

10 En un modo de realización preferido, dicho péptido se caracteriza porque se trata de un fragmento de una proteína vírica, parasitaria o celular, uniendo *in vitro* dicha proteína una proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades, o de una secuencia que se distingue del fragmento de proteína precedente por la sustitución o delección de aminoácidos, conservando sin embargo dicha secuencia distinta las propiedades de unión a una proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades. Preferentemente, el número de aminoácidos sustituidos o suprimidos en la secuencia distinta con relación a la secuencia inicial no excede 20%, y mejor 10% del número de aminoácidos que constituyen la secuencia inicial. De manera preferida, sólo los aminoácidos cuya delección no afecta a las propiedades de unión *in vitro* del péptido a la PP2A están sustituidos o suprimidos.

20 En particular, una secuencia distinta es una secuencia peptídica que aumenta la afinidad de unión a la proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades con relación a la secuencia de la que se deriva. Otra secuencia distinta tal como se ha definido anteriormente es una secuencia peptídica homóloga a una secuencia peptídica identificada inicialmente. Mediante la expresión "secuencia peptídica homóloga", se entiende en la presente solicitud una secuencia derivada de una proteína de otra especie que la secuencia peptídica identificada inicialmente, y cuya secuencia primaria se puede alinear con la secuencia peptídica identificada inicialmente con la ayuda de un programa de alineación óptima usado habitualmente, tal como el programa BESTFIT (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, GCG). En particular, una secuencia A se considerará como homóloga a una secuencia B si dichas secuencias A y B presentan por lo menos 50% de identidad, preferentemente 75% de identidad, después de la alineación de las secuencias con la ayuda de un programa de alineación óptima tal como el programa BESTFIT. De manera más preferida, dos secuencias se consideran asimismo homólogas si las secuencias son casi idénticas con la excepción de algunos residuos que pueden representar de 10 a 20% de variabilidad sobre la secuencia total. Por otro lado, los aminoácidos de igual función química (tales como, por ejemplo, Arg y Lys) se consideran como equivalentes. Los péptidos a analizar para su unión con una PP2A o una de sus sub-unidades, se seleccionan generalmente de entre unos fragmentos de proteínas víricas, parasitarias o celulares, proteínas que han demostrado interactuar *in vivo* o *in vitro* con una proteína fosfatasa de tipo 2A.

Dichas proteínas víricas, parasitarias o celulares se seleccionan en particular de entre una de las proteínas siguientes: antígeno t de SV40 o de polioma, antígeno medio t de polioma, sub-unidad de PP2A de tipo B (B, B', B''), CK2 α , CaMIV, p70S6-quinasa, Pak1/Pak3, Tap42/alfa 4, PTPA, Set/11/12-PP2A, E4orf4, *tau*, *Vpr* o CD28, CCXR2 (receptor de quimioquina).

45 Un péptido preferido es un fragmento de la proteína CD28. La invención tiene por objeto los péptidos constituidos por las secuencias PRRPGPTRKHY (SEC ID n°: 33) y (PRRPGPTRK)₂ (SEC ID n°: 34) que corresponden respectivamente a los péptidos denominados FD2 y FD3 cuya capacidad de penetración intracelular y sus efectos sobre la viabilidad de las células se describen a continuación en la parte experimental.

La solicitud describe asimismo unas secuencias peptídicas que se diferencian de un fragmento de la proteína CD28 por la sustitución o delección de aminoácidos, conservando sin embargo dichas secuencias distintas las propiedades de unión a la proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades.

50 Un péptido particularmente preferido es un fragmento de la proteína *Vpr* del virus VIH, en particular un fragmento de la proteína *Vpr* del virus VIH-1 o VIH-2, o una secuencia que se diferencia del fragmento de proteína anterior por la sustitución o delección de aminoácidos, conservando sin embargo dicha secuencia distinta las propiedades de unión a la proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades. La invención no comprende el péptido, fragmento de la proteína *Vpr* que tiene la siguiente secuencia: LFIHFRIGCQHSRIGITRRRRRVRDGSSRP* dada a conocer en la base de datos EMBL, número de acceso P89821. En contrapartida, el uso de dicho péptido en el marco de las aplicaciones descritas anteriormente forma parte de la presente invención.

60 La invención tiene asimismo por objeto un péptido derivado de una proteína que interactúa con la proteína fosfatasa de tipo 2A, derivado de la protamina, el péptido de secuencia RRRRRRRSRGRRRRTY (SEC ID n°: 41, denominado FD8).

65 La solicitud describe asimismo, a título de ejemplo de péptidos derivados de una proteína que interactúa con la proteína fosfatasa de tipo 2A, derivados de la protamina, una secuencia que se diferencia de SEC ID n° 41 por la sustitución o delección de aminoácidos, conservando sin embargo dicha secuencia distinta las propiedades de unión a la proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades.

ES 2 331 730 T3

De manera aún más preferida, un péptido según la invención se caracteriza porque se selecciona de entre una de las siguientes secuencias:

- a) VEALIRILQQLLFIHFRI (SEC ID n°: 1), o
- b) RHSRIGIIQRRTRNG (SEC ID n°: 2).

La solicitud describe asimismo un péptido caracterizado porque está incluido en una de las siguientes secuencias:

- a) VEALIRILQQLLFIHFRI (SEC ID n°:1),
- b) RHSRIGIIQRRTRNG (SEC ID n°: 2), o,
- c) una secuencia que se diferencia de SEC ID n°: 1 o SEC ID n°: 2 por la sustitución o delección de aminoácidos, conservando sin embargo dicha secuencia distinta las propiedades de unión para la proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades.

Un péptido particularmente preferido según la invención es un fragmento del péptido SEC ID n°: 2, consistiendo dicho fragmento en, o comprendiendo, el péptido de secuencia RHSRIG (SEC ID n°: 36) denominado FD9 cuya capacidad de penetración intracelular y el efecto sobre la viabilidad de las células se describirán a continuación en la parte experimental.

La solicitud describe asimismo un compuesto de estructura polipeptídica que contiene un péptido según la invención tal como se ha definido anteriormente, siendo dicho compuesto de un peso molecular comprendido entre 10 y 150 Kdaltons y teniendo la capacidad de unir la proteína fosfatasa 2A.

La invención se refiere asimismo a un polipéptido caracterizado porque está constituido por la repetición de un péptido según la invención.

Unos ejemplos de dichos polipéptidos son en particular unos polímeros del péptido RHSRIG y especialmente, el dímero (RHSRIG)₂ (SEC ID n°: 37) o también el trímero (RHSRIG)₃ (SEC ID n°: 37), respectivamente denominados FD10 y FD11, cuya capacidad de penetración intracelular y el efecto sobre la viabilidad de las células se describirán a continuación en la parte experimental.

Entre los péptidos de secuencias que se diferencian de SEC ID n°: 1 o SEC ID n°: 2 por la sustitución o delección de aminoácidos, se citarán más particularmente los péptidos cuya secuencia está incluida en una de las secuencias de la proteína Vpr de las diferentes variantes del tipo VIH-1, VIH-2 y de SIV, y que corresponden a las secuencias homólogas en estas variantes de SEC ID n°: 1 o SEC ID n°: 2.

Se pueden citar en particular las secuencias de la invención VEALIRILQQLL (SEC ID n°: 6), ALIRILQQLLFI (SEC ID n°: 7), IRILQQLLFIHF (SEC ID n°: 8), ILQQLLFIHFR (SEC ID n°: 9), RHSRIGIIQRRR (SEC ID n°: 10), SRIGIIQRRTR (SEC ID n°: 11) y IGIIQRRTRNG (SEC ID n°: 12) que corresponden a los dodecapéptidos identificados como que unen la sub-unidad A de PP2A.

Una secuencia según la invención que se diferencia de SEC ID n°: 2 por la delección o sustitución de aminoácidos es en particular la secuencia RHSRIGVTRQRRARNG (SEC ID n°: 40), denominada asimismo FD13 en la parte experimental presentada a continuación.

Un péptido preferido según la invención es un péptido seleccionado de entre una de las secuencias SEC ID n°: 1 o SEC ID n°: 2 y caracterizado porque su administración induce la apoptosis de las células tumorales.

Un procedimiento de selección de péptidos susceptibles de inducir la apoptosis de las células tumorales se puede realizar por ejemplo por medio del ensayo de viabilidad MTT descrito en la parte experimental.

La solicitud describe asimismo un péptido caracterizado porque se deriva de un fragmento de la proteína CK2 α . En particular, el péptido, natural o sintético, se caracteriza porque se deriva de un fragmento de la proteína CK2 α del parásito *Theileria parva*.

De manera aún más preferida, un péptido según la invención se caracteriza porque se selecciona de entre una de las siguientes secuencias:

- a) RKIGRGKFSEVFEG (SEC ID n°:3),
- b) TVTKDCVIKILKPVKKKKIKREIKILQNL (SEC ID n°: 4), y
- c) KILRLIDWGLAEFYHP (SEC ID n°: 5).

ES 2 331 730 T3

La solicitud describe asimismo un péptido caracterizado porque está incluido en una de las secuencias siguientes:

- a) RKIGRGKFSEVFEG (SEC ID n°:3),
- 5 b) TVTKDKCVIKILKPVK KKKIKREIKILQNL (SEC ID n°: 4),
- c) KILRLIDWGLAEFYHP (SEC ID N°: 5),
- 10 d) una secuencia homóloga de SEC ID n°:3, SEC ID n°:4 o SEC ID n°:5 derivada de *P. falciparum* o *leishmania*, o,
- e) una secuencia que se diferencia de las secuencias mencionadas anteriormente por la sustitución o delección de aminoácidos, conservando sin embargo dicha secuencia distinta las propiedades de unión a la proteína fosfatasa 2A o una de sus sub-unidades, y en particular la secuencia TVTKDKCVIKILKPVK KKKIKREI
15 KILQNL (SEC ID n°: 43).

Entre los péptidos que se diferencian de las secuencias SEC ID n°: 3, n°: 4 o n°: 5, se pueden citar en particular las secuencias del sitio 1 (RKIGRGKFSEVFEG) (SEC ID n°: 3), y en particular el péptido de secuencia RKIGRGKF
20 SEVF y el péptido de secuencia IGRGKFSEVFEG o la secuencia del sitio 2 (TVTKDKCVIKILKPVK KKKIKREI
KILQNL) (SEC ID n°: 4) en particular los péptidos siguientes:

- | | |
|---|--------------------------------|
| TVTKDKCVIKIL | (SEC ID n°: 13), |
| 25 TKDKCVIKILKP | (SEC ID n°: 14), |
| DKCVIKILKPVK | (SEC ID n°: 15), |
| CVIKILKPVK K K | (SEC ID n°: 16), |
| 30 IKILKPVK K K K I | (SEC ID n°: 17), |
| ILKPVK K K K I K R | (SEC ID n°: 18), |
| 35 KPVK K K K I K R E I | (SEC ID n°: 19), |
| VK K K K I K R E I K I | (SEC ID n°: 20), |
| K K K I K R E I K I L Q | (SEC ID n°: 21), |
| 40 K I K R E I K I L Q N L | (SEC ID n°: 22), y por último, |
| las secuencias del sitio 3 KILRLIDWGLAEFTHP | (SEC ID n°: 5) |
| 45 es decir, el péptido de secuencia KILRLIDWGLAE | (SEC ID n°: 23), |
| el péptido de secuencia LRLIDWGLAEFY | (SEC ID n°: 24), o |
| el péptido de secuencia LIDWGLAEFYHP | (SEC ID n°: 25). |
| 50 | |

Un ejemplo de péptido según la invención que comprende una secuencia homóloga a *T. parva* del sitio 3 de la proteína CK2 α en *P. falciparum* es el péptido RQKRLI (SEC ID n°: 42). La invención se refiere asimismo a unos
55 polímeros del péptido RQKRLI y en particular el trímero (RQKRLI)₃ (SEC ID n°: 35) denominado FD7 en la parte experimental.

La solicitud describe asimismo un péptido derivado de la proteína CK2 α del parásito *Theileria parva*, caracterizado porque su administración reduce el desarrollo parasitario. La solicitud describe asimismo unos péptidos derivados de
60 la proteína tau. La secuencia tau presenta un motivo que corresponde al sitio de unión de la proteína E4orf4 de adenovirus. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, la proteína tau está regulada por la proteína fosfatasa 2A. Dichos péptidos serían por lo tanto útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Los péptidos identificados mediante el procedimiento de la invención son particularmente útiles en el tratamiento de ciertos tumores, de ciertas infecciones víricas o parasitarias. El experto en la materia puede seleccionar, con la ayuda
65 de ensayos de competición de unión, nuevos péptidos, derivados de las secuencias identificadas según el procedimiento de la invención, inhibiendo dichos péptidos de manera competitiva la unión de la proteína nativa de la cual se deriva con una holoenzima PP2A o una de sus sub-unidades.

ES 2 331 730 T3

Así, la solicitud describe asimismo un péptido natural o sintético, tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque inhibe e manera competitiva la interacción de la proteína nativa de la cual se deriva con una holoenzima PP2A o una de sus sub-unidades.

5 Los péptidos según la invención, para ser eficaces *in vivo* en el tratamiento de ciertos tumores o ciertas infecciones víricas o parasitarias, se pueden acoplar a un vector capaz de transferir dicho péptido en una célula eucariota. Sin embargo, es posible, tal como se señala a continuación, que los péptidos según la invención posean a su vez la capacidad de penetrar en las células y por consiguiente no necesitan la adición de un vector.

10 La invención se refiere naturalmente a los medios que permiten la síntesis de los péptidos de la invención. En particular, la invención se refiere a un polinucleótido caracterizado porque su secuencia consiste en la secuencia que codifica un péptido según la invención. Unos polinucleótidos preferidos son los polinucleótidos cuya secuencia se selecciona de entre una de las siguientes secuencias

15 SEC ID n°: 26 (5'GTGGAAGCCTTAATAAGAATTCTGCAACAACCTGCTGMATTCAMCAGAATT),

n°: 27 (5'CGACATAGCAGAATAGGCATTATTCAACAGAGGAGAACAAGAAATGGA),

n°: 28 (5'-AGGAAGATCGGAAGAGGGAAGTTCAGTGAAGTTTTGAGGGA),

20 n°: 29 (5'ACAGTAACGAAGGATAAATGCGTAATAAAAATCCTAAAGCCTGTAAAGAAGAAGAA
AATCAAGAGAGAGATTAAGATTCTACAGAACCTA), o

n°: 30 (5'AAAATACTAAGGCTAATTGACTGGGGATTAGCTGAGTTTTACCACCCA),

25 que codifican respectivamente los péptidos n°: 1 a 5.

La solicitud describe asimismo unos polinucleótidos de secuencias complementarias a una de las secuencias SEC ID n°: 26 a 30, y las secuencias que hibridan dichos polinucleótidos en unas condiciones astringentes.

30 Por "condiciones astringentes" se entienden las condiciones que permiten la hibridación específica de dos secuencias de ADN de simple hebra a aproximadamente 65°C por ejemplo en una disolución de 6 x SSC, 0,5% SDS, 5X de disolución de Denhardt y 100 µg de ADN carrier no específico o cualquier otra disolución de fuerza iónica equivalente y después de un lavado a 65°C, por ejemplo en una disolución de como máximo 0,2 x SSC y 0,1% de SDS, o cualquier
35 otra disolución de fuerza iónica equivalente. Los parámetros que definen las condiciones de astringencia dependen de la temperatura a la que el 50% de las hebras apareadas se separan (T_m). Para las secuencias que comprenden más de 30 bases, T_m se define por la relación: T_m = 81,5 + 0,41 (%G + C) + 16,6 Log (concentración en cationes) - 0,63 (% de formamida) - (600/número de bases). Para las secuencias de longitud inferior a 30 bases, T_m se define por la relación:
40 T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T). Las condiciones de astringencia se definen asimismo según los protocolos descritos en Sambrook *et al.*, 2001 (Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3ª Ed., Cold Spring Harbor, laboratory press, Cold Spring Harbor, New York).

Puede ser ventajoso sintetizar un polipéptido que comprende la repetición de los motivos peptídicos identificados mediante el procedimiento de la invención. Por consiguiente, la invención se refiere a un polinucleótido caracterizado porque consiste en un múltiplo del polinucleótido que codifica para un péptido según la invención. La invención se refiere asimismo a un polipéptido caracterizado porque está constituido por la repetición de un péptido según la invención.

50 La invención se refiere asimismo a un vector de expresión celular, caracterizado porque comprende un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente y unas secuencias reguladoras que permiten la expresión de un péptido según la invención en una célula hospedante.

55 La invención se refiere asimismo al procedimiento de preparación de un péptido tal como se define según la invención, que comprende la transformación de un hospedante celular con la ayuda de un vector de expresión celular tal como se ha definido anteriormente, seguida del cultivo del hospedante celular así transformado, y la recuperación del péptido en el medio de cultivo.

60 La invención se refiere asimismo a un anticuerpo policlonal purificado o a un anticuerpo monoclonal, caracterizado porque dicho anticuerpo es capaz de unir de manera específica un péptido según la invención.

La solicitud describe asimismo un antisuero o inmunosuero, caracterizado porque dicho antisuero o inmunosuero es capaz de unir de manera específica un péptido según la invención.

65 Unos anticuerpos específicamente dirigidos contra los péptidos identificados mediante el procedimiento de la invención se obtienen, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal después de la inyección de un péptido según la invención, y de la recuperación de los anticuerpos producidos. Un anticuerpo monoclonal se puede obtener según

las técnicas conocidas por el experto en la materia tal como el procedimiento de los hibridomas descrito por Kohler y Milstein (1975).

Los anticuerpos obtenidos, específicamente dirigidos contra unas dianas de la proteína fosfatasa 2A tienen su aplicación en particular en la inmunoterapia. Pueden servir, por ejemplo, de antagonistas de proteínas víricas o parasitarias dirigidas contra la proteína fosfatasa 2A con el fin de bloquear el desarrollo vírico o parasitario.

Asimismo, los polinucleótidos que codifican los péptidos de la invención se pueden transferir directamente al núcleo de células dianas, llegado el caso, con la ayuda de vectores apropiados, con el fin de permitir la expresión *in vivo* de los péptidos correspondientes, siendo dichos péptidos susceptibles de bloquear mediante inhibición competitiva una interacción específica entre la proteína fosfatasa 2A y la proteína vírica o parasitaria de las que se derivan.

Así, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno de los elementos seleccionados de entre un polinucleótido según la invención o un anticuerpo según la invención.

La invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende uno de los péptidos de la invención en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención tiene además como objetivo un uso de un péptido de la invención definido anteriormente, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una infección vírica o parasitaria.

La invención tiene preferentemente como objetivo el uso de un péptido de la invención cuya secuencia se deriva de un fragmento de la proteína *Vpr*, tal como se ha definido anteriormente, en la preparación de un medicamento apropiado para inhibir la infección con el VIH.

Los péptidos de la invención se pueden seleccionar ventajosamente de manera que estimulan la inducción de la apoptosis relacionada con la activación de la proteína fosfatasa 2A celular. Así, la invención se refiere asimismo al uso de un péptido según la invención, tal como se ha definido anteriormente, en la preparación de un medicamento apropiado para inducir la apoptosis de células dianas, y en particular de células tumorales.

Otro aspecto preferido de la invención se refiere al uso de un péptido de la invención cuya secuencia se deriva de un fragmento de la proteína *CK2 α* , en la preparación de un medicamento apropiado para inhibir la infección parasitaria. Más particularmente, la invención tiene como objetivo el uso de un péptido de la invención en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento del paludismo.

La infección vírica o parasitaria se traduce por una expresión específica de las proteínas que comprenden las secuencias de péptidos de la invención. Las secuencias que codifican los péptidos de la invención se pueden usar por lo tanto como sonda para detectar, de manera específica, a partir de ARN extraído de una muestra biológica de un paciente, una infección vírica o parasitaria específica.

Asimismo, se puede usar un anticuerpo según la invención para reconocer específicamente las secuencias peptídicas contenidas en las proteínas víricas o parasitarias expresadas durante la invención.

Así, la invención se refiere por lo tanto al uso de un polinucleótido según la invención o de un anticuerpo según la invención en el diagnóstico *in vitro* de patologías parasitarias o víricas.

La solicitud describe asimismo la selección y el uso de un péptido que une la proteína fosfatasa 2A, y capaz de penetrar en el interior de las células.

Un ejemplo de dicho péptido se ilustra mediante el péptido FD6 (SEC ID nº: 20) derivado de la proteína *CK2 α* de *T. parva*. En efecto, se ha mostrado en la presente invención que la presencia de este péptido en la célula no afecta a la viabilidad de células de mamíferos cultivadas o mantenidas en supervivencia.

La parte experimental siguiente ilustra una aplicación del procedimiento de identificación de los péptidos de la invención a la identificación de péptidos procedentes de la proteína *Vpr* del VIH-1 y de la proteína *CK2 α* del parásito *Theileria parva*. La solicitud describe asimismo la selección y el uso de un péptido que une la proteína fosfatasa 2A y eventualmente capaz de penetrar en el interior de la célula, permitiendo dicho péptido señalar y poner en contacto con la proteína fosfatasa 2A intracelular una molécula capaz de regular la actividad de la proteína fosfatasa 2A.

Descripción de las figuras

Figura 1: Cribado de una membrana que contiene unos péptidos que recubren la secuencia *Vpr* de VIH-1 con la sub-unidad estructural A de PP2A (A) y la holoenzima PP2A1 (B).

ES 2 331 730 T3

El recubrimiento de la secuencia de los cuatro péptidos 54-57 define la secuencia del sitio 2 VEALIRILQQLL FIIHFRI (SEC ID nº: 1)

5 Péptido 54: VEALIRILQQLL
Péptido 55: ALIRILQQLFI
Péptido 56: IRILQQLFIIHF
10 Péptido 57: ILQQLFIIHFRI

El recubrimiento de la secuencia de los tres péptidos 64 a 66 define la secuencia del sitio 1 RHSRIGIIQRRTRNG (SEC ID nº: 2)

15 Péptido 64: RHSRIGIIQRRR
Péptido 65: SRIGIIQRRTR
20 Péptido 66: IGIIQRRTRNG

Figura 2: Cribado de una membrana que contiene unos péptidos que recubren la secuencia de CK2 α de *Theileria* con (A) la sub-unidad estructural A de PP2A y (B) la holoenzima PP2A1.

25 El recubrimiento de la secuencia de los dos péptidos define la secuencia del sitio 1 RKIGRGKFSEVFEG (SEC ID nº: 3)

30 Péptido 66: RKIGRGKFSEVF
Péptido 67: IGRGKFSEVFEG

35 El recubrimiento de la secuencia de los diez péptidos 74-83 define la secuencia del sitio 2 TVTKDKCVIKILKPVK KKKIKREIKILQNL (SEC ID nº: 4)

Péptido 74: TVTKDKCVIKIL
Péptido 75: TKDKCVIKILKP
40 Péptido 76: DKCVIKILKPVK
Péptido 77: CVIKILKPVKKK
45 Péptido 78: IKILKPVKKKKI
Péptido 79: ILKPVKKKKIKR
Péptido 80: KPVKKKKIKREI
50 Péptido 81: VKKKKIKREIKI
Péptido 82: KKKIKREIKILQ
55 Péptido 83: KIKREIKILQNL

El recubrimiento de la secuencia de los tres péptidos define la secuencia del sitio 3 KILRLIDWGLAEFTHP (SEC ID nº: 5)

60 Péptido 129: KILRLIDWGLAE
Péptido 130: LRLIDWGLAEFY
65 Péptido 131: LIDWGLAEFYHP

ES 2 331 730 T3

Figura 3: La figura 3 es un histograma que representa los valores de penetración intracelulares obtenidos con la ayuda del ensayo de penetración celular para los péptidos citados en la tabla 3.

Figura 4: La figura 4 ilustra los efectos de diferentes péptidos sobre la viabilidad de las células HeLa evaluada con la ayuda del ensayo de viabilidad MTT.

La viabilidad de las células HeLa (expresada en porcentaje con relación a la población inicial) se ha ensayado en presencia de concentraciones crecientes, respectivamente de péptidos FD8 (4A), FD13/FD14 (4B) y FD11/FD12 (4C).

10 Parte experimental

A. Materiales y procedimientos

15 A.1 Las proteínas PP2A purificadas

La proteína trimérica PP2A1 se ha purificado hasta homogeneidad a partir de cerebro de cerdo. Se ha expresado una sub-unidad estructural recombinante de PP2A en *E. coli* y purificada según el protocolo descrito por Cohen *et al.* (Cohen P., Alemany S, Hemmings BA, Resink TJ, Stralfors P., Tung HY. Protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* 1988 159, 390-408), o el descrito por Bosch *et al.*, (Bosch M, Cayla X, Van Hoof C, Hemmings BA, Ozon R., Merlevede W, Goris J. The PR55 and PR65 subunits of protein phosphatase 2A from *Xenopus laevis*. Molecular cloning and developmental regulation of expression. *Eur J. Biochem.* 1995 230,1037-45).

25 A.2 Procedimiento de identificación de los sitios de unión de Vpr de VIH y CK2 α de *Theileria parva* (*T. parva*) con PP2A

Unos péptidos de unión derivados de las proteínas CK2 α (codificada por el protozoario *T. parva*) o Vpr (codificada por el virus VIH-1) con PP2A han sido identificados usando la técnica de los "peptides spot" descrita anteriormente (Frank y Overwing. (1996). *Meth. Mol. Biol.* 66,149-169).

El procedimiento consistió en sintetizar *in situ* sobre una membrana de celulosa, en unas posiciones definidas, unos dodecapéptidos, cuyo conjunto de secuencias recubre la totalidad de la secuencia de la proteína de interés (Vpr o CK2 α). Los péptidos de dos puntos consecutivos sobre la membrana, se solapan con un desfase de dos aminoácidos.

35 Sesenta y ocho (68) dodecapéptidos que recubren toda la secuencia de la proteína Vpr de VIH-1 y doscientos y cinco (205) dodecapéptidos que recubren la secuencia de la proteína CK2 α de *Theileria* han sido sintetizados y unidos de manera covalente a unas membranas de celulosa.

40 Cada membrana así preparada se satura en primer lugar durante 1 hora a temperatura ambiente con TBS que contiene 5% de Regilait y 3% de BSA, y después se incuba durante una noche en el mismo tampón en presencia de 4 μ g/ml de proteína purificada (sub-unidad A de PP2A u holoenzima PP2A1).

45 La interacción específica de cada proteína purificada (respectivamente la sub-unidad estructural A o la holoenzima trimérica PP2A1) con una secuencia peptídica se revela, como una transferencia Western, después de la incubación de la membrana con un anticuerpo dirigido contra la proteína estructural A (Figuras 1A y 2A) y con una mezcla de anticuerpos que reconocen las proteínas A, B y C de PP2A (figuras 1B y 2B).

50 Las membranas se lavan 5 veces durante 15 minutos con un tampón clásico TBST (TBS + TWEEN), usado para la incubación, y después se incuban nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo (acoplado a la peroxidasa). Por último, las membranas se lavan 5 veces durante 15 minutos con el tampón TBST y se revelan.

A.3 Ensayo de penetración celular

55 1- Células

Se analizó la línea HeLa que se deriva de un carcinoma cervical humano.

60 2- Dosificaciones cuantitativas de los péptidos internalizados

Tampón de lisis:

0,1M de tampón Tris a pH 8 que contiene 0,5% de NP40.

65 *Tampón OPD:*

25,7 ml de fosfato de sodio dibásico 0,2M + 24,3 ml de ácido cítrico 0,1M + 50 ml de agua destilada; pH ajustado a 5,0.

ES 2 331 730 T3

Complejos péptidos biotinilados-avidina:

Se incuban 4 moles de péptidos con 1 mol de avidina-peroxidasa. Se deja durante 20 minutos a temperatura ambiente.

- Análisis de la penetración intracelular de los diversos péptidos en la célula HeLa

Las células HeLa (10^4 por 100 l) se inoculan en unas placas de 96 pocillos (de fondo plano) con medio completo DMEM en presencia de 2,5% de penicilina/ampicilina y de 10% de suero de ternera fetal. Después de una noche de incubación a 37°C en una estufa a CO₂ (5%), se añaden diferentes diluciones de complejos (péptidos biotinilados-avidina peroxidasa). Después de 4 horas de incubación, se aspira el sobrenadante, y las células se lavan 3 veces con PBS, se tripsinan y se recogen para el recuento en 1 ml de PBS.

Después del recuento, las células se recogen en 300 µl de tampón de lisis.

- Medición de la actividad peroxidasa

En una placa ELISA de 96 pocillos se incuban 50 µl de tampón OPD con 50 µl de tampón de lisis o 50 µl de lisado celular (en general se efectúan diferentes diluciones sucesivas (a la 1/2)). Para revelar, se añaden (en la oscuridad) 50 µl de la disolución de OPD. La reacción (aproximadamente 10 min.) se detiene con 100 µl de HCl 1N.

- Análisis del resultado

La actividad peroxidasa se determina por lectura a 490 nm con el lector ELISA (filtro de referencia a 620 nm) y la cantidad de peroxidasa en los lisados se calcula según la curva de referencia y después se aplica al mismo número de células (10^3 o 10^4):

$$\text{Moléculas de péptidos} = (6 * 10^{23} / \text{PM del péptido}) * \text{ng de PO} * 10^{-9}.$$

A.4 Ensayo de viabilidad celular

Las células HeLa (10^4 por 100 µl) se inoculan en unas placas de 96 pocillos (de fondo plano) con medio completo DMEM que contiene 2,5% de penicilina/ampicilina y 10% de suero de ternera fetal. Después de una noche de incubación a 37°C en una estufa de CO₂, las células se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de péptidos. Después de 72 h de incubación, el medio que contiene los péptidos se aspira y se añade el MTT a 0,5 mg/ml (diluido en DMEM solo) a razón de 100 µl por pocillo. La incubación se realiza a oscuras a 37°C durante 30 minutos y después el MTT es aspirado y se añaden 50 µl de DMSO en todos los pocillos. Se necesita esperar una decena de minutos para la lisis completa de las células y remover bien el lisado para homogeneizar la disolución del producto de reacción en el pocillo. Las placas se leen después a 570 nm con un filtro de referencia a 690 nm.

B. Resultados y discusión

B.1 Identificación de secuencias peptídicas que contienen unos sitios de unión de proteínas codificadas por dos agentes patógenos (VIH-1 y *T. parva*) con unos PP2A (PP2A1 y sub-unidad A)

Los resultados obtenidos después de la incubación de las membranas que contienen los péptidos que recubren las secuencias de Vpr de VIH-1 y CK2α de *T. parva* con la holoenzima PP2A trimérica purificada han permitido determinar cinco secuencias de péptidos de Vpr y de CK2α capaces de unir específicamente PP2A, y se presentan en la tabla siguiente:

TABLA 1

Secuencias peptídicas que contienen unos sitios de unión de VIH-1 y CK2α con las PP2A

| | | Sub-unidad A | PP2A1 |
|----------------------|---------|--------------------------------|------------------|
| VIH-1 Vpr | Sitio 1 | RHSRIGIIQQRTRNG | RHSRIGIIQQRTRNG |
| | Sitio 2 | VEALIRILQQLLFIHFRI | |
| <i>T. parva</i> CK2α | Sitio 1 | RKIGRGKFSEVFEG | |
| | Sitio 2 | TVTCKDKCVIKILKPVKKKIKREIKILQNL | |
| | Sitio 3 | KILRLIDWGLAEFYHP | KILRLIDWGLAEFYHP |

Más precisamente, se han identificado dos secuencias peptídicas que contienen un sitio de unión de Vpr de VIH-1 con la proteína PP2A1 (Fig. 1B “sitio 1”) y con la sub-unidad A (Fig. 1A “sitio 1” y “sitio 2”). Se han identificado asimismo tres secuencias peptídicas que contienen un sitio de unión de CK2 α de *T. parva* con la proteína PP2A1 (Fig. 2B “sitio 3”) y con la sub-unidad estructural A (Fig. 2A “sitio 1”, “sitio 2” y “sitio 3”).

5

B.2 Interés del uso de los péptidos de Vpr de VIH-1 que unen PP2A

La expresión, exógena o debida a la infección provírica, de Vpr de VIH-1 induce la apoptosis de las células HeLa, de las líneas linfoides T y de los linfocitos primarios (Stewart *et al.*, 1997 J Virol 71: 5579-9). El uso de mutantes Vpr ha permitido en un primer tiempo correlacionar este efecto con la parada de las células en fase G2 del ciclo celular. Más recientemente, se ha mostrado que Vpr puede inducir asimismo la apoptosis independientemente de la parada en G2 (Nishizawa *et al.* 2000 Virology 27: 16-26).

10

Se ha relatado que la activación de PP2A después de la interacción con la proteína adenovírica E4orf4 induce la apoptosis de las células transformadas (Shtrichman R *et al.*, 2000 Oncogene 19: 3757-3765). De manera análoga, la expresión de Vpr induce asimismo la apoptosis en las células transformadas (Stewart *et al.* 1999, PNAS 96: 12039-12043).

15

Por otro lado, el análisis de los mutantes de Vpr conocidos en el estado de la técnica indica que los péptidos identificados mediante el procedimiento de la invención y que unen específicamente la proteína PP2A contienen unas secuencias que se correlacionan con las requeridas para el efecto pro-apoptótico de Vpr.

20

Así, los fragmentos de las proteínas víricas, Vpr y E4orf4 que interactúan con PP2A e identificados mediante el procedimiento de la invención podrían ser útiles para inducir la apoptosis de las células tumorales.

25

Los péptidos identificados son asimismo naturalmente útiles en la inhibición de la infección por el VIH, incluso otros virus y retrovirus emparentados.

B.3 Interés del uso de las secuencias de CK2 α de *T. parva* que unen PP2A

30

El uso del ácido ocaidaico y del antígeno t minúscula de SV40 ha permitido demostrar que la PP2A controla la proliferación celular a través de una nueva cascada de fosforilaciones que implican la PI3-quinasa, la PKC ξ (identificada como una MAP-quinasa-quinasa-quinasa o MEKK), la proteína MEK y las dos MAP-quinasas ERK-1 y ERK-2 y los factores de transcripción NF-kB y Sp1 (Sontag, E., Sontag, J. M., Garcia. A. (1997). EMBO. J.,16, 5662-5671; Ayllón, V., Martínez-A., C., Garcia, A., Cayla, X. y Rebollo, A (2000). EMBO J. 19, 1-10, A. Garcia, S. Cereghini., E. Sontag (2000). J. Biol Chem. 275:9385-9389). Por otro lado, el papel de PP2A en la regulación de la cascada de las MAP-quinasas ha sido sugerido asimismo por los estudios del equipo de Chambaz (Hériché *et al.* (1997), Science, 276: 952-955) que han mostrado que la sobreexpresión de la sub-unidad CK2 α celular activa PP2A que desfosforila la proteína Mek.

35

Los estudios de Ole-Moi *et al.* (EMBO J. (1993) 12: 1621-1631) han mostrado que la transformación mediante *Theileria* induce una hiperfosforilación de las proteínas del hospedante. Este efecto se debe en parte a la activación constitutiva de la CK2 celular que sería a su vez dependiente de la acción de una sub-unidad de tipo CK2 α codificada por el parásito y segregada en el citosol de la célula transformada.

40

Tal como se indica a continuación, la comparación de las secuencias identificadas mediante el procedimiento de la invención que corresponde a los tres sitios de unión con PP2A permite identificar la presencia de un motivo de tipo: **K-I-G/L-R/K** que está parcialmente repetido en el sitio 2

45

Sitio 1: **KIGR**

Sitio 2: **KILKPVKKKIKIKREKILQNL**,

Sitio 3: **KILRLI** (duplicación parcial KIL/RLI).

50

Es interesante señalar que el sitio de unión del ATP de CK2 α recubre parcialmente el sitio 1 y el sitio 2, lo que sugiere una inhibición de la actividad quinasa después de una interacción de CK2 α con la sub-unidad A. Por otro lado, tal como se puede constatar en la tabla 2 siguiente, las tres secuencias que contienen los sitios de unión de CK2 α de *T. parva* con PP2A están conservadas entre varias especies que comprenden los parásitos *P. falciparum* y *Leishmania*.

55

60

65

ES 2 331 730 T3

TABLA 2

Comparación de diversas secuencias de CK2 α con los péptidos de *T. parva* que contienen los sitios de unión con PP2A

5 (las secuencias de *P. falciparum* se deducen de una EST, las demás proceden del Banco genómico "Swissprot").
Sólo se indican los residuos que difieren de la secuencia de *T. parva*

Sitio 1

10 *T. parva* /*Leishmania* R KIGRGKFSEV FEG

Pfalciparum/Bovine/Dictyo []

Sitio 2

15 *T. parva* TVTK D K C VIKI LKPVK K K K I K R E I K I L Q N L

Pfalciparum [] C [] [] [] A V

Bovine N N- E V []

Leishmania N N [] [] V V V []

Leishmania [] V [] [] Q V - L [] [] T

20 Dictyo

Sitio 3

25 *T. parva* K I L R L I D W G L A E F Y H P

Leishmania [] [] [] I

Pfalciparum R Q []

Bovine R []

30 Dictyo [] []

35 El análisis fino de las interacciones sugiere que las CK2 α de estas diferentes especies deberían interactuar con PP2A; por ejemplo el péptido 131 de CK2 α de *T. parva* descrito en la figura 2 y en el que los cuatro primeros aminoácidos del sitio 3 están delecionados, es capaz de unir PP2A.

40 Esto sugiere que las CK2 α de *Leishmania*, de *P. falciparum* que difieren para los 3 primeros aminoácidos deberían unir PP2A. Esto es consistente con el hecho de que el motivo KILRLI presenta una duplicación de K/R-II/L-I/L que, en un contexto básico, podría ser un sitio de unión para PP2A.

45 La presencia en el interior de la célula de estos péptidos, que corresponde a los sitios de unión *in vivo* de las proteínas con PP2A, podría por lo tanto contrariar el desarrollo de estos parásitos.

50 B.4 Efectos biológicos de los compuestos peptídicos según la invención sobre las células

55 Los diversos péptidos listados en la tabla 3 han sido sintetizados en forma biotinilada, purificados mediante HPLC (Neosystem) y su efecto sobre la penetración intracelular y viabilidad celular ha sido analizado en las células HeLa. El estudio del conjunto de los péptidos listados en la tabla 1 ha permitido determinar seis péptidos que tienen la posibilidad de penetrar en la célula HeLa (Fig. 3).

- 60 - Fd6: un péptido 12AA derivado de un sitio de interacción de la sub-unidad A de PP2A con la proteína CK2 α de *T. parva*.
- 65 - Fd7: un péptido de 18AA que corresponde a tres repeticiones de un hexa motivo de 6AA; esta secuencia, derivada de la CK2 α de *P. Falciparum*, es homóloga a la secuencia de *T. parva* que une PP2A.
- Fd8: un péptido derivado de la protamina (un activador conocido de las PP2A).

ES 2 331 730 T3

- Fd11: un péptido de 18AA que corresponde a tres repeticiones de un hexa motivo de 6AA derivado de la secuencia de FD14.
- Fd14: FD14 que produce el sitio de unión que se ha caracterizado de VIH-1 Vpr con PP2A.
- Fd13: este péptido corresponde a una secuencia de VIH-1 Vpr que es homóloga a la secuencia del péptido FD14 que representa un sitio de unión con PP2A con otro VIH-1 Vpr.

Por otro lado, los estudios de viabilidad efectuados sobre el conjunto de los péptidos listados en la tabla 1 han permitido identificar tres péptidos que inhiben la viabilidad de las células HeLa.

- Fd8: afecta a la viabilidad de las células HeLa (Figura 4A)
- Fd14: afecta claramente a la viabilidad de las células HeLa (Figura 4B)
- Fd12: un péptido de 18AA cuya secuencia se deriva de la del péptido FD11 (La R está mutada en A). Este péptido que es homólogo a la proteína glucosamina transferasa de *Chlamydia muridarum* afecta a la viabilidad de la célula HeLa (figura 4C). Este efecto biológico podría deberse a una interacción con la membrana plásmica.

TABLA 3

Péptidos que imitan unos sitios de unión de proteínas dianas con unas PP2A

| Proteínas de origen | Código de los péptidos | Secuencias de los péptidos | Sec ID nº: |
|---|------------------------|-------------------------------------|----------------|
| CD28 | FD2 | -PRRPGPTRKHY | Sec ID nº: 132 |
| | FD3 | -(PRRPGPTRK)2 | Sec ID nº: 133 |
| CK2 α <i>T. parva</i> | FD6 | -VKKKKIKREIKI | Sec ID nº: 20 |
| CK2 α <i>P. Falciparum</i> (análoga a <i>T. parva</i>) | FD7 | -(RQKRLI)3 | Sec ID nº: 134 |
| Vpr (VIH-1) | FD9 | -RHSRIG | Sec ID nº: 135 |
| | FD10 | -(RHSRIG)2 | Sec ID nº: 136 |
| | FD11 | -(RHSRIG)3 | Sec ID nº: 137 |
| | FD12* | -(AHSRIG)3 (FD11 mutación R- -A) | Sec ID nº: 138 |
| | FD13 | RHSRIGVTRQRRARNG (análoga a FD14) | Sec ID nº: 139 |
| | FD14 | RHSRIGIIQQRTRNG | Sec ID nº: 2 |
| Protamina | FD8 | RRRRRRRSRGRRRRTY | Sec ID nº: 140 |

Discusión

Los péptidos procedentes de ciertas proteínas que interactúan con unas PP2A: ¿un nuevo enfoque antitumoral?.

El estudio de los presentes inventores ha permitido identificar dos péptidos penetrantes (F8/FD14) derivados de dos proteínas, Vpr y protamina, conocidas por interactuar con PP2A. Estos péptidos que tienen en común unas secuencias ricas en Argina o en lisina, podrían por lo tanto penetrar en la célula usando un mecanismo general de internalización. Dicho mecanismo, común para la internalización de los péptidos que tienen unas secuencias ricas en Argina, ha sido recientemente propuesto (Tomoki Suzuki, *et al.* (2002), Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-rich Peptides, *JBC* 277:2437-2443). De manera general, la presencia de secuencias ricas en Argina o en lisina caracteriza las proteínas que unen la PP2A, lo que sugiere que otros péptidos penetrantes podrían ser identificados en la familia de las PP2A.

Vpr, una proteína codificada por el virus VIH-1, está implicada en el mantenimiento de una carga vírica elevada y en el establecimiento de la patogénesis relacionada con el VIH. La expresión de Vpr, exógena o debida a la infección provírica de VIH-1, induce la apoptosis en unas células HeLa, en unas líneas linfoides T, en unos linfocitos primarios y en las células transformadas (Stewart *et al.* *J Virol* 1997; 71: 5579-9; Stewart *et al.* 1999, *PNAS*, 96, 12039-12043). Por otra parte, se ha relatado que la interacción de PP2A con otra proteína vírica, Adenovirus E4orf4 (Marcellus *et al.* *J Virol.* (2000) 74:7869-7877) puede inducir la apoptosis de las células tumorales. En total, estos resultados sugieren

ES 2 331 730 T3

la hipótesis de que la activación de ciertas PP2A sería un nuevo medio de inducir la apoptosis de los tumores. En este sentido, estos resultados presentados en la figura 4B sugieren que el péptido F14 derivado de VIH-1 Vpr podría representar un biopéptido anti-tumoral. La ausencia de efecto biológico del péptido FD13 (cuya secuencia difiere en cuatro AA con relación a FD14 - tabla 2) sugiere que la estructura de FD14 es crítica para regular la viabilidad de HeLa. Por consiguiente, la obtención de moléculas químicas que imitan la estructura del péptido FD14 podría por lo tanto permitir generar nuevas sustancias anti-tumorales.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 331 730 T3

REIVINDICACIONES

1. Péptido **caracterizado** porque se trata de la secuencia peptídica PRRPGPTRKHY (SEC ID nº: 33).

5 2. Péptido **caracterizado** porque se selecciona de entre una de las secuencias peptídicas siguientes:

| | | |
|----|-------------------|--------------------|
| | RRRRRRRSRGRRRRTY | (SEC ID nº: 41); |
| 10 | VEALIRILQQLFIHFRI | (SEC ID nº: 1); |
| | RHSRIGIIQRRTRNG | (SEC ID nº: 2); |
| | VEALIRILQQLL | (SEC ID nº: 6); |
| 15 | ALIRILQQLFI | (SEC ID nº: 7); |
| | IRILQQLFIHF | (SEC ID nº: 8); |
| 20 | ILQQLFIHFRI | (SEC ID nº: 9); |
| | RHSRIGVTRQRRARNG | (SEC ID nº: 40); |
| | RHSRIGIIQRR | (SEC ID nº: 10); |
| 25 | IIQRRTR | (SEC ID nº: 11); |
| | QRRTRNG | (SEC ID nº: 12); y |
| 30 | RHSRIG | (SEC ID nº: 36). |

3. Péptido **caracterizado** porque se selecciona de entre una de las siguientes secuencias:

| | | |
|----|-------------------------------|------------------|
| 35 | RKIGRGKFSEVFEG | (SEC ID nº: 3); |
| | TVTKDCVIKILKPVKKKIKREIKILQNL | (SEC ID nº: 4); |
| | KILRLIDWGLAEFYHP | (SEC ID nº: 5); |
| 40 | RKIGRGKFSEVF | (SEC ID nº: 31); |
| | IGRGKFSEVFEG | (SEC ID nº: 32); |
| 45 | TVTKDKCVIKIL | (SEC ID nº: 13); |
| | TKDKCVIKILKP | (SEC ID nº: 14); |
| | DKCVIKILKPVK | (SEC ID nº: 15); |
| 50 | CVIKILKPVKKK | (SEC ID nº: 16); |
| | IKILKPVKKKIKI | (SEC ID nº: 17); |
| 55 | ILKPVKKKIKR | (SEC ID nº: 18); |
| | KPVKKKIKREI | (SEC ID nº: 19); |
| | VKKKIKREIKI | (SEC ID nº: 20); |
| 60 | KKKIKREIKILQ | (SEC ID nº: 21); |
| | KIKREIKILQNL | (SEC ID nº: 22); |
| 65 | TVTKDKCVIKILKPVKKKIKREIKILQNL | (SEC ID nº: 43); |
| | KILRLIDWGLAE | (SEC ID nº: 23); |

ES 2 331 730 T3

LRLIDWGLAEFY (SEC ID nº: 24);

LIDWGLAEFYHP (SEC ID nº: 25); y

5 RQKRLI (SEC ID nº: 42).

4. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se acopla a un vector capaz de transferir dicho péptido en una célula eucariota.

10 5. Polipéptido **caracterizado** porque está constituido por la repetición de un péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3.

15 6. Polipéptido según la reivindicación 5, **caracterizado** porque se selecciona de entre una de las siguientes secuencias:

(RHSRIG)₂ (SEC ID nº: 37);

(RHSRIG)₃ (SEC ID nº: 38);

20 (AHSRIG)₃ (SEC ID nº: 39);

(PRRPGPTRK)₂ (SEC ID nº: 34); y

25 (RQKRLI)₃ (SEC ID nº: 35).

7. Polinucleótido **caracterizado** porque su secuencia consiste en la secuencia que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

30 8. Polinucleótido **caracterizado** porque su secuencia se selecciona de entre una de las siguientes secuencias SEC ID nº: 26, nº: 27, nº: 28, nº: 29 o nº: 30.

35 9. Polinucleótido **caracterizado** porque consiste en un múltiplo del polinucleótido según la reivindicación 7 u 8.

10. Vector de expresión celular, **caracterizado** porque comprende un polinucleótido según una de las reivindicaciones 7 a 9, y unas secuencias reguladoras que permiten la expresión de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en una célula hospedante.

40 11. Anticuerpo purificado policlonal o monoclonal, **caracterizado** porque es capaz de unir de manera específica cualquiera de los péptidos según una de las reivindicaciones 1 a 6.

12. Composición farmacéutica que comprende uno de los péptidos según una de las reivindicaciones 1 a 6, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 13. Composición farmacéutica que comprende uno de los elementos seleccionados de entre un polinucleótido según una de las reivindicaciones 7 a 9, un vector de expresión según la reivindicación 10 o un anticuerpo según la reivindicación 11.

50 14. Péptido, **caracterizado** porque se selecciona de entre una de las siguientes secuencias:

- (RHSRIG)₃ (SEC ID nº: 38);

- RHSRIGVTRQRRARNG (SEC ID nº: 40); y

55 - RRRRRRRSRGRRRRTY (SEC ID nº: 41).

15. Péptido **caracterizado** porque se trata de la secuencia VKKKKIKREIKI (SEC ID nº: 20).

60 16. Uso de un péptido o polipéptido definido según una de las reivindicaciones 1 a 6, 14 ó 15, o del péptido de secuencia LFIHFRIGCQHSRIGITRRRRVVDGSSRP (SEC ID nº: 44), en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una infección vírica o parasitaria.

65 17. Uso de un péptido o polipéptido definido según una de las reivindicaciones 2, 14 ó 15, o del péptido de secuencia LFIHFRIGCQHSRIGITRRRRVVDGSSRP (SEC ID nº: 44), en la preparación de un medicamento apropiado para inhibir la infección con el VIH.

ES 2 331 730 T3

18. Uso de un péptido definido según una de las reivindicaciones 2 a 6 ó 14 o del péptido de secuencia LFIHFRIGCQHSRIGITRRRRVVDGSSRP (SEC ID n°: 44), en la preparación de un medicamento apropiado para inducir la apoptosis de células dianas, y en particular de células tumorales.

5 19. Uso de un péptido definido según la reivindicación 3, en la preparación de un medicamento apropiado para inhibir la infección parasitaria.

20. Uso de un péptido definido según la reivindicación 3, en la preparación de un medicamento útil en el tratamiento del paludismo.

10 21. Uso de un polinucleótido según una de las reivindicaciones 7 a 9 o de un anticuerpo según la reivindicación 11, en el diagnóstico *in vitro* de patologías parasitarias o víricas.

15 22. Procedimiento de identificación de un péptido cuya secuencia procede de una proteína vírica, parasitaria o celular, uniendo específicamente dicho péptido una holoenzima proteína fosfatasa de tipo 2A o una de sus sub-unidades, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

20 a) depositar en forma de puntos, sobre un soporte, unos péptidos cuya secuencia procede de una proteína vírica, parasitaria o celular, correspondiendo cada punto al depósito de un péptido de secuencia definida,

b) poner en contacto el soporte sólido con una disolución que contiene una holoenzima proteína fosfatasa 2A o una de sus sub-unidades en unas condiciones que permiten que los péptidos presentes en el soporte unan la holoenzima o una de sus sub-unidades, y

25 c) identificar sobre el soporte sólido el péptido sobre el cual se fija la proteína fosfatasa 2A o una de sus sub-unidades.

30 23. Procedimiento según la reivindicación 22, **caracterizado** porque los péptidos depositados en forma de puntos son de un tamaño inferior a 20 aminoácidos, preferentemente inferior a 15 aminoácidos.

24. Procedimiento según la reivindicación 22 ó 23, **caracterizado** porque los péptidos se depositan sobre una membrana de celulosa.

35 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, **caracterizado** porque el conjunto de los péptidos depositados recubre la secuencia completa de la proteína vírica, parasitaria o celular de la que proceden las secuencias.

40 26. Procedimiento de preparación de un péptido tal como definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 14 ó 15, que comprende la transformación de un hospedante celular con la ayuda de un vector de expresión celular tal como se define en la reivindicación 10, seguida del cultivo del hospedante celular así transformado, y la recuperación del péptido en el medio de cultivo.

45

50

55

60

65

Fig.1A

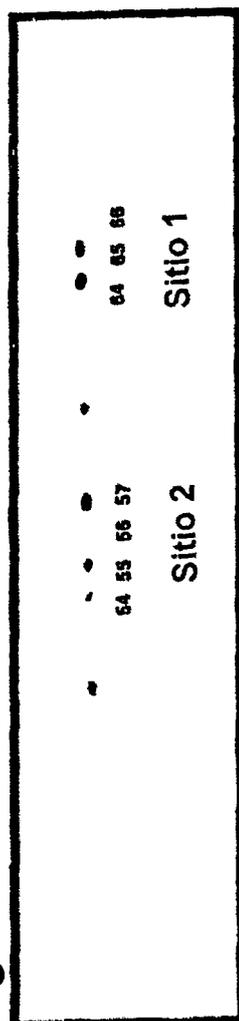


Fig.1B

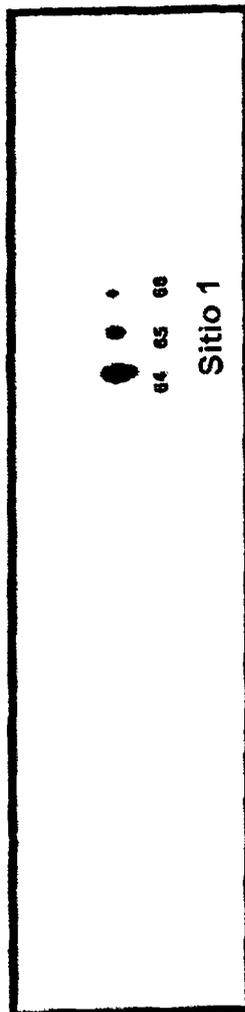


Fig.2A

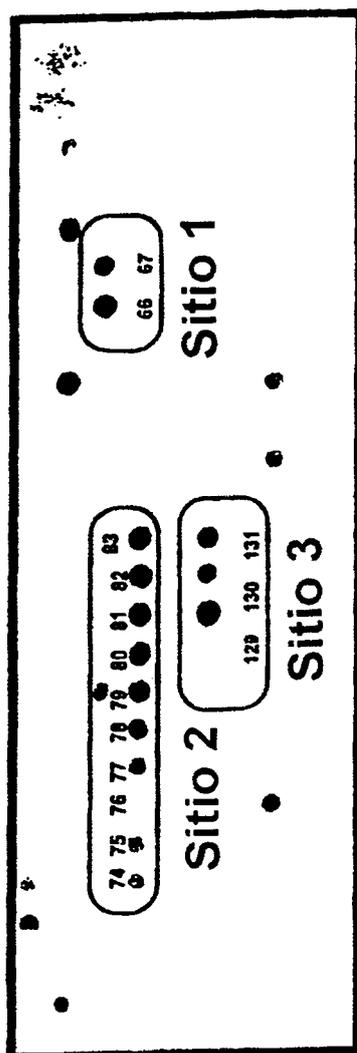
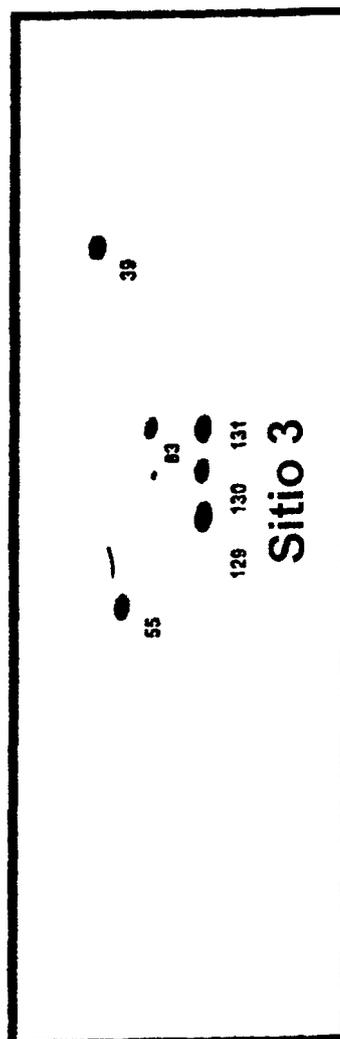


Fig.2B



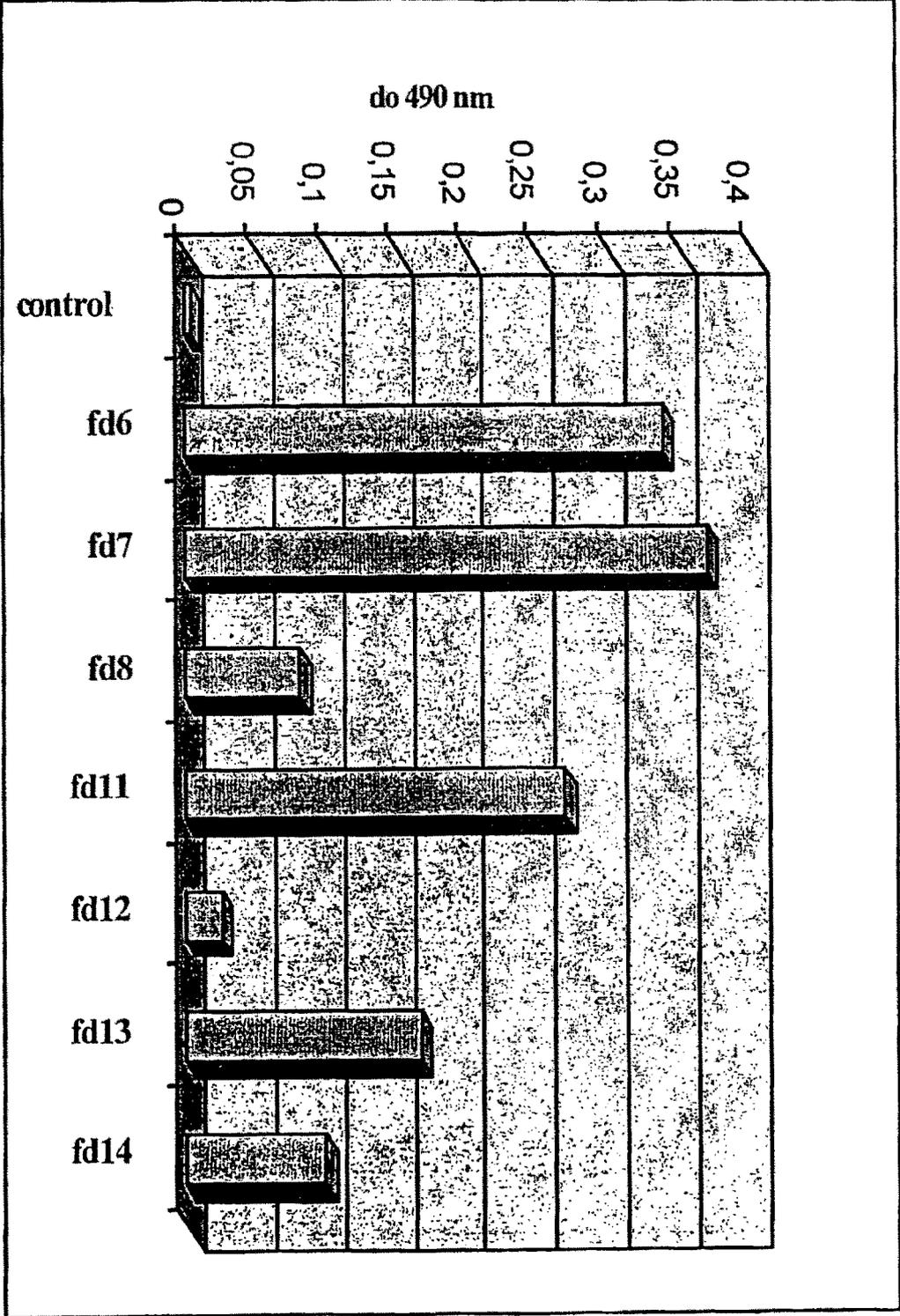


Fig. 3

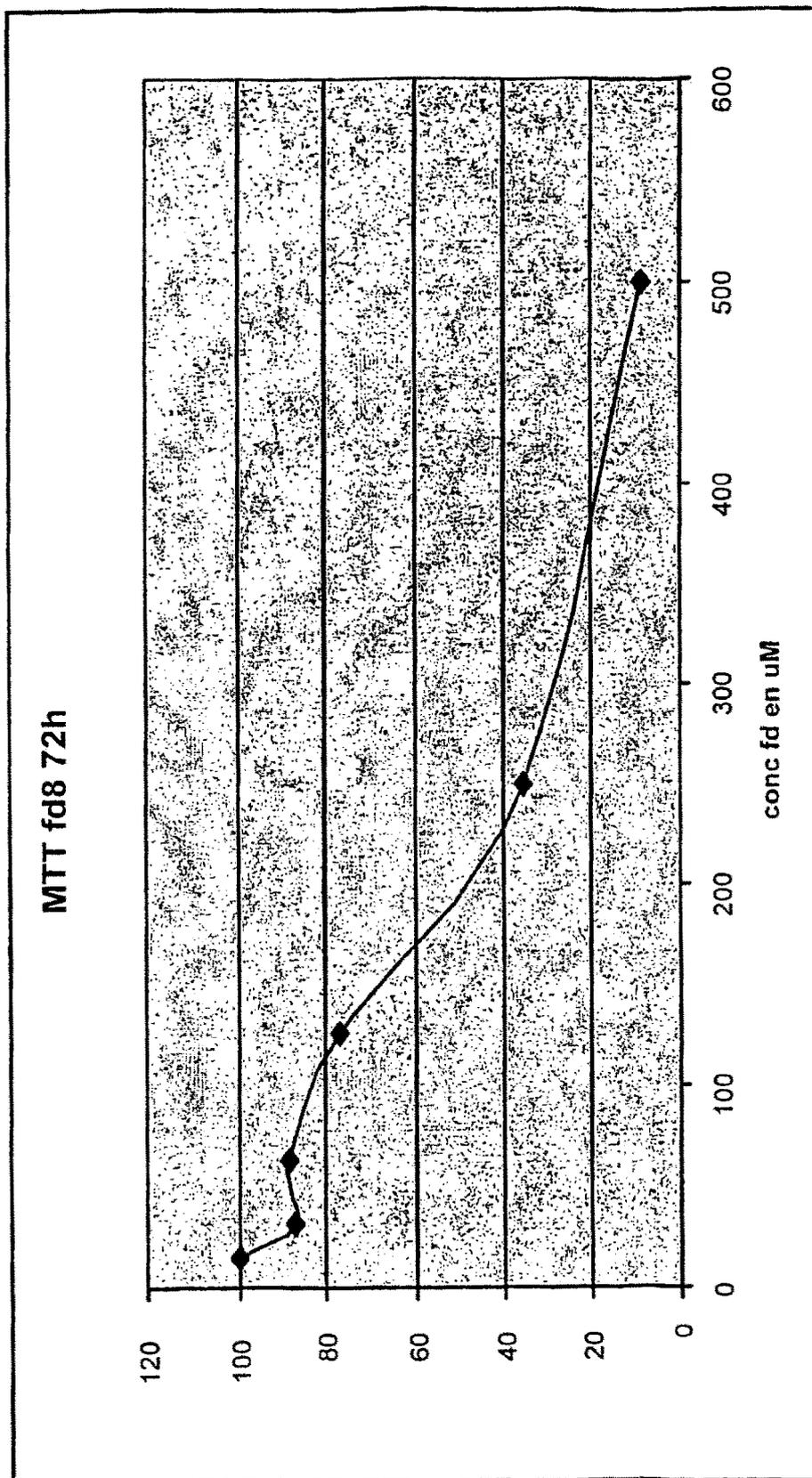


Fig. 4A

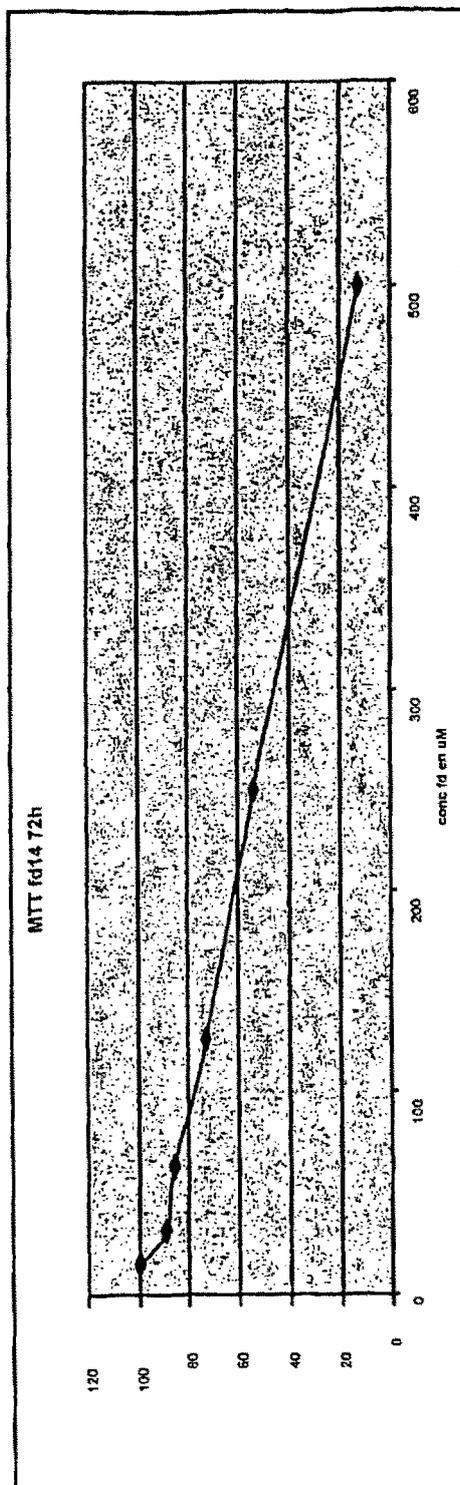
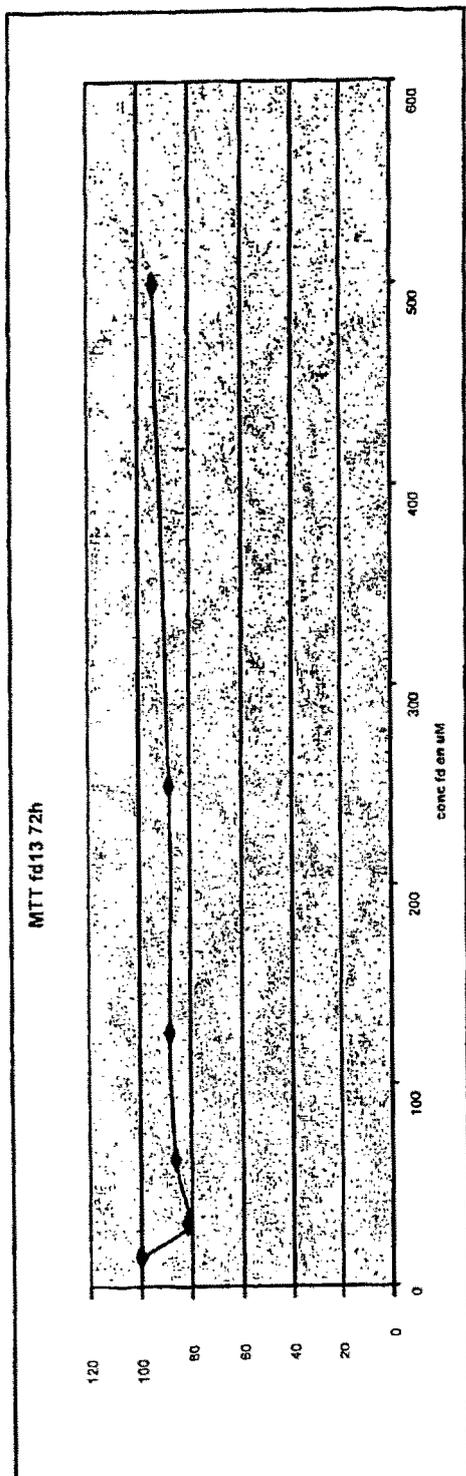


Fig. 4B

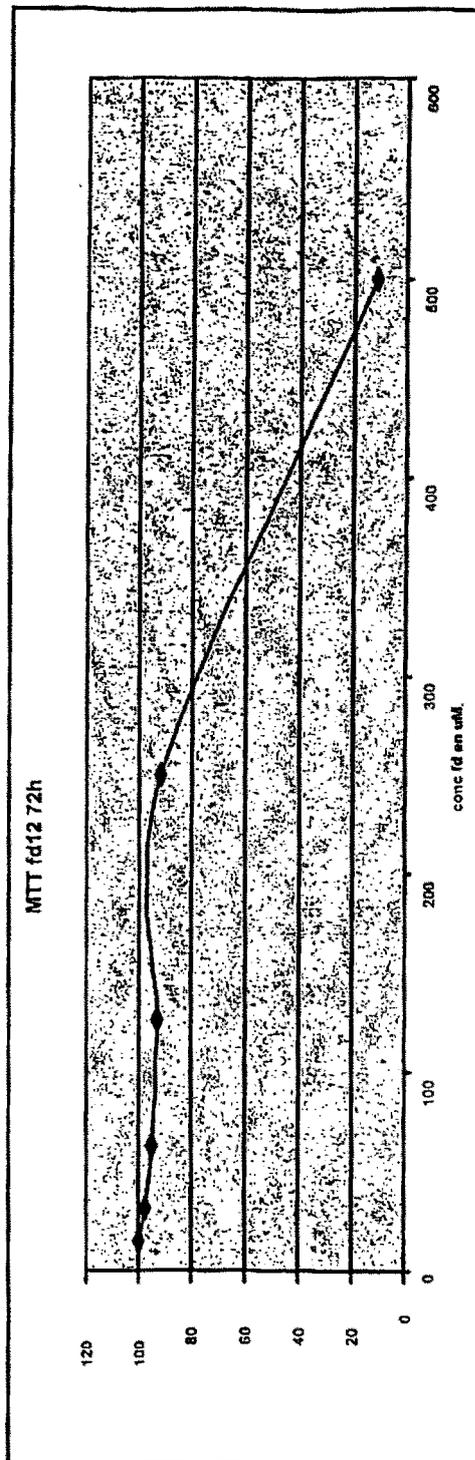
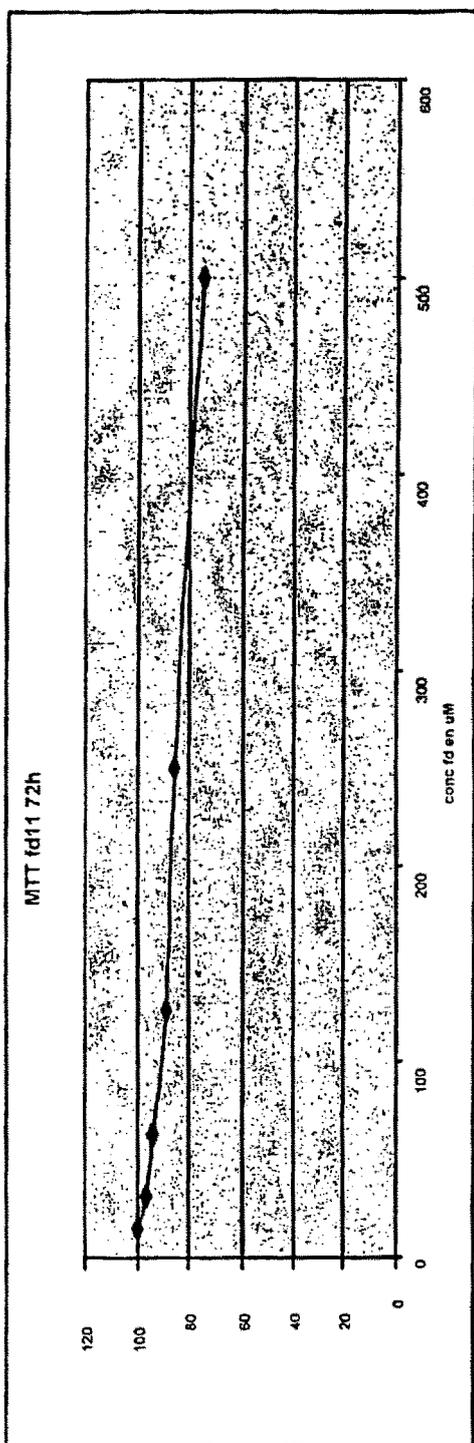


Fig. 4C