



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 327 694**

⑫ Número de solicitud: 200503237

⑬ Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01) **C12N 15/12** (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01) **A61P 37/06** (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **29.12.2005**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2009**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
02.11.2009

⑱ Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Fundación Centro Nacional de Investigaciones
Cardiovasculares**

⑲ Inventor/es: **Redondo Moya, Juan Miguel;
Rodríguez Márquez, Antonio y
Martínez Martínez, Sara**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Péptidos inhibidores selectivos de la actividad biológica de la calcineurina.**

㉒ Resumen:

Péptidos inhibidores selectivos de la actividad biológica de la calcineurina.

La presente invención se encuadra en el sector de la biotecnología aplicada al área de la salud humana y más concretamente se basa en la sorprendente utilidad de los péptidos, LxVPc1, c3 y c4 como eficientes inhibidores selectivos de la ruta de señalización Calcineurina (CN)-NFAT y de la actividad fosfatasa de la CN. Dichos compuestos son útiles inmunosupresores y sirven de base para la elaboración de composiciones terapéuticas para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades humanas que cursen con activación de linfocitos T, tales como, pero sin limitarnos a, enfermedades autoinmunes, inflamación y alergia o situaciones de rechazo a trasplantes. Igualmente, estos péptidos y el material genético y biológico relacionado pueden constituir útiles herramientas para el desarrollo de ensayos para encontrar compuestos que tengan actividad antagonista selectiva de la CN.

ES 2 327 694 A1

DESCRIPCIÓN

Péptidos inhibidores selectivos de la actividad biológica de la calcineurina.

5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector de la biotecnología aplicada al área de la salud humana y más concretamente se basa en la sorprendente utilidad de los péptidos, LxVPc1, c3 y c4 como eficientes inhibidores selectivos de la ruta de señalización Calcineurina (CN)-NFAT y de la actividad fosfatasa de la CN. Dichos compuestos son útiles inmunosupresores y sirven de base para la elaboración de composiciones terapéuticas para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades humanas que cursen con activación de linfocitos T, tales como, pero sin limitarnos a, enfermedades autoinmunes, inflamación y alergia o situaciones de rechazo a trasplantes. Igualmente, estos péptidos y el material genético y biológico relacionado pueden constituir útiles herramientas para el desarrollo de ensayos para encontrar compuestos que tengan actividad antagonista selectiva de la CN.

15 Antecedentes de la invención

La ruta Calcio/Calcineurina/NFAT desempeña un papel destacado en una gran cantidad de procesos biológicos importantes, incluyendo el desarrollo y funcionamiento de los sistemas inmune y nervioso, formación de la vasculatura, morfogénesis de las válvulas cardíacas y crecimiento y desarrollo muscular (1-5). Las señales de calcio activan a la fosfatasa calcineurina (CN), que desfosforila a los factores de transcripción NFATc1, NFATc2, NFATc3 y NFATc4 (nomenclatura HUGO). Esto induce su translocación desde el citoplasma al núcleo y aumenta su capacidad de unión al ADN, provocando la expresión génica dependiente de NFAT (6). La unión de CN a los NFATs es por lo tanto un paso esencial en la activación de esta familia de factores de transcripción.

La calcineurina, también conocida como la proteína fosfatasa 2B, es un heterodímero que consta de una subunidad catalítica (CnA) fuertemente unida a una subunidad reguladora (CnB). La CnA se compone de un dominio catalítico y otro regulador que contiene la secuencia de unión con la CnB, un dominio de unión de calmodulina (CaM) y un segmento autoinhibidor (7). La actividad fosfatasa de CnA se regula por un complejo formado por Ca^{2+} , CnB y CaM; ambas proteínas reguladoras son esenciales para esta actividad (7,8). La CN puede unirse tanto a NFAT fosforilado como desfosforilado (9,10); y aunque la CN inactiva puede unirse a los NFAT, la unión es más fuerte con la CN activada (11). En los NFAT, esta interacción ha sido localizada dentro del dominio regulador N-terminal, que está conservado en los cuatro miembros (12-14). Mediante análisis mutacional se analizaron los motivos conservados dentro del dominio regulador de NFATc2, definiéndose la secuencia SPRIET como el sitio de anclaje de calcineurina (15). En estudios posteriores se identificaron los residuos conservados en las secuencias correspondientes de los demás miembros de NFAT, definiéndose el motivo PxiXIT (ver Fig. 1A), que parece ser funcional en todos los miembros de NFAT regulados por CN (11,16-18).

NFAT se describió por primera vez como un factor esencial para la expresión del gen de la IL-2 (19), y posteriormente se ha implicado en la regulación de muchos otros genes necesarios para una respuesta inmune eficaz (20-23). El descubrimiento de que CN es la diana intracelular de las drogas inmunosupresoras, como Ciclosporina A (CsA) y FK506 (24), resaltó aún más la importancia de NFAT en el sistema inmune así como de la ruta Ca^{2+} /CN/NFAT (25-27). El empleo de estas drogas, CsA y FK506, es el método más frecuente para bloquear la ruta de señalización CN-NFAT, ya que inhiben la actividad enzimática de CN (24). Sin embargo, esta estrategia también inhibe otras rutas no relacionadas con NFAT dependientes de CN, lo que se asocia con los efectos secundarios severos que desencadena su uso clínico (28). Se ha visto mediante estudios usando péptidos inhibidores que el bloqueo específico de las interacciones proteína-proteína es terapéuticamente prometedor para el tratamiento de enfermedades donde esté implicada la ruta CN-NFAT. El péptido VIVIT, cuya secuencia está basada en el motivo PxiXIT y que posee una elevada afinidad por CN, es capaz de inhibir selectivamente la ruta de señalización dependiente de NFAT sin afectar al resto de vías activadas por CN (29). Sin embargo, en los últimos años se han descrito numerosas proteínas que se unen a CN que presentan, la mayoría de ellas, un motivo similar al PxiXIT dentro de la zona de interacción con CN (41). El péptido VIVIT podría por lo tanto bloquear tanto la interacción CN-NFAT como la de CN con otras proteínas. Por el contrario, el motivo LxVP - que participa en la interacción de NFAT con la CN activada - se ha descrito solamente en NFAT. Por lo tanto, el efecto bloqueante tanto *in vitro* como *in vivo* que aquí se describe muestra que el empleo de péptidos derivados de estos motivos posee un efecto inhibidor selectivo potencial en la ruta CN-NFAT, cubriendo pues, la necesidad de encontrar moléculas altamente selectivas capaces de inhibir la ruta CN-NFAT.

60 Descripción de la invención

- Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a nuevos péptidos y a derivados de los mismos útiles como antagonistas (inhibidores) selectivos de la ruta de señalización CN-NFAT y más concretamente como inmunosupresores (además, se ha observado que son inhibidores de la actividad fosfatasa de la CN). La invención también se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden dichos péptidos, a ensayos para encontrar compuestos que tengan actividad, preferentemente, antagonista selectiva de la acción biológica de CN sobre NFAT y el uso de dichos péptidos para la profilaxis y tratamiento de enfermedades humanas que cursen con activación de linfocitos T, tales como, pero sin limitación, en-

fermedades autoinmunes, inflamación y alergia o situaciones de rechazo a trasplantes. De la misma forma, se refiere a herramientas genéticas y métodos de producción de dichos péptidos.

Descripción de las Figuras

Fig. 1A.- Representación esquemática del dominio regulador NH₂-terminal y de las secuencias de interacción con CN de los diferentes NFATs. Las regiones conservadas entre los diferentes miembros de NFAT se muestran como sigue: SP-1, SP-2 y SP-3 son motivos repetitivos de serina-prolina susceptibles de fosforilación; SRR-1 y SRR-2 son regiones ricas en serina; y NLS es la secuencia de localización nuclear. Las dos regiones implicadas en la unión a CN, denominadas motivos P₁XIT y LxVP se muestran en negro, y por debajo se muestran las secuencias correspondientes a estos motivos en cada uno de los cuatro miembros de NFAT humano; los aminoácidos conservados entre los diferentes miembros se muestran en negrita. Los residuos indicados se sustituyeron por alaninas para producir el correspondiente péptido LxVPc1 mutante. Las abreviaturas empleadas para los diferentes motivos P₁XIT y LxVP se muestran a la derecha. Fig. 1B.- Secuencias de aminoácidos de los péptidos usados como control positivo (VIVIT) o negativo (SCRAMBLED) de competición para los experimentos de unión *in vitro*.

Fig. 2.- Comparación de la unión de CN a NFATc1 y NFATc2 *in vitro*. Fig. 2A.- La unión de NFATc1 y NFATc2 a CN es dependiente de la concentración de NFAT. Se ensayó una concentración fija de CN (20 nM) frente a concentraciones decrecientes de los dominios reguladores de NFATc2 o NFATc1 fusionados a GST (*Glutathione-S-Transferase*) en ensayos de *pull-down*. La CN unida se mostró mediante *western blot* usando un anticuerpo monoclonal frente a CnA. Debido a las altas cantidades de CN unida a NFATc1 se muestran dos exposiciones diferentes (panel superior e inferior respectivamente) para mostrar claramente la interacción NFATc1-CN. Se cuantificó la CN unida mediante densitometría, dato mostrado en el gráfico inferior como unidades de intensidad relativa de CN unida a cada concentración de NFAT. Fig 2B.- La unión de CN-NFAT es dependiente de la concentración de CN. Se ensayaron cantidades fijas de GST-NFATc2 (izquierda) ó GST-NFATc1 (derecha) con concentraciones decrecientes de CN (20, 10, 5 y 2,5 nM de CN). La CN se detectó usando un anticuerpo monoclonal frente a CnA: la CN unida se muestra en el panel superior; y en el inferior se muestra la CN no unida (libre) en 1/3 de los sobrenadantes obtenidos tras la reacción de unión. La tinción de las membranas de *western blot* con *Ponceau Red* confirmó que se usaron las mismas cantidades de las proteínas de fusión de GST en las reacciones (panel intermedio).

Fig. 3.- Análisis de la interacción *in vitro* de CN con los péptidos P₁XIT y LxVP fusionados a GST. Las proteínas de fusión GST-péptido que contienen las secuencias P₁XIT ó LxVP de NFATc1 y NFATc2 se utilizaron en ensayos de *pull-down*. Las proteínas GST o GST fusionada al péptido LxVPc1 mutado (AxAA) se usaron como controles negativos. La CN unida se detectó mediante *western blot* y la cantidad usada de las proteínas de fusión de GST se analizó mediante tinción de proteínas totales en geles SDS-PAGE.

Fig. 4.- Efecto de los péptidos P₁XIT y LxVP derivados de NFATc1 y NFATc2 en la interacción *in vitro* de NFAT y CN. Se realizaron los ensayos de unión GST-NFAT-CN en presencia de los péptidos sintéticos indicados, y se detectó la CN unida mediante *western blot* usando un anticuerpo monoclonal frente a CnA. Fig. 4A.- CN unida a GST-NFATc2 en presencia de los péptidos competidores a 32 μ M o 200 μ M. El péptido mutLxVPc1 contiene el motivo LxVP de NFATc1 con los residuos Leucina, Valina y Prolina sustituidos por Alanina. Fig. 4B.- CN unida a GST-NFATc2 en presencia de altas concentraciones de péptidos competidores. Se usó como control negativo el péptido control SCRAMBLED (SC). El panel inferior muestra la CN no unida (libre) en 1/3 de los sobrenadantes obtenidos tras la reacción de unión. Fig. 4C.-, CN unida a GST-NFATc1 en presencia de los péptidos competidores a 32 μ M o 200 μ M.

Fig. 5.- Comparación de la capacidad de los péptidos VIVIT, LxVPc1 y P₁XITc2 para bloquear la unión de CN a NFATc2. La unión de GST-NFATc2 a CN se competía por concentraciones crecientes de los péptidos VIVIT, LxVPc1 o P₁XITc2. Los paneles superiores muestran la cantidad de CN unida a GST-NFATc2 mientras que los inferiores muestran la CN no unida (libre) en 1/3 de los sobrenadantes obtenidos tras la reacción de unión. La CN unida se cuantificó mediante análisis densitométrico con el software *Quantity One* (BIO-RAD), datos que se presentan en el gráfico mostrando las curvas de inhibición de cada péptido competidor para la unión de CN a GST-NFATc2. El 100% de CN unida se asimila a la cantidad de CN unida a GST-NFATc2 en ausencia de péptido competidor.

Fig. 6.- Competición de la interacción NFATc1-CN y NFATc2-CN por péptidos que mimetizan los motivos P₁XIT y LxVP de NFATc1, c2, c3 y c4. Fig. 6A.- Los péptidos correspondientes a los motivos LxVP de NFATc1, c2, c3 y c4 (32 μ M) se usaron para competir *in vitro* la unión de CN a GST-NFATc2 (izquierda) o GST-NFATc1 (derecha). Debido a la elevada cantidad de CN unida a NFATc1, se muestran dos exposiciones diferentes (paneles superiores y centrales) para mostrar claramente el efecto de los péptidos sobre la interacción de NFATc1 y CN. Los paneles inferiores muestran la CN no unida (libre) en 1/3 de los sobrenadantes obtenidos tras la reacción de unión. Fig. 6B.-, Unión *in vitro* de GST-NFAT-CN en presencia de 100 μ M de cada péptido P₁XIT. Se muestra la CN unida y la libre. Las secuencias de los péptidos se detallan en la Fig. 1.

Fig. 7- Competición cruzada de la interacción GST-P₁XITc2-CN ó GST-LxVPc1-CN por los péptidos P₁XITc2 y LxVPc1. Se usaron las proteínas de fusión de GST conteniendo los péptidos P₁XITc2 o LxVPc1 en ensayos de *pull-down* de CN en presencia de los péptidos competidores libres como se indica. Se usó el péptido SCRAMBLED (SC: 200 μ M) como control negativo de competición, y también se analizó el efecto del péptido VIVIT (12 μ M). Para una mejor detección de la escasa CN unida a GST-P₁XITc2, se empleó el doble de GST-P₁XITc2 que de GST-LxVPc1.

Fig. 8.- Bloqueo *in vivo* de la regulación de NFATc2 por el péptido LxVPc1. Se co-transfectaron las células HeLa (NFAT negativas) con las construcciones HA-NFATc2 *wild type* y las proteínas de fusión de GFP con los péptidos PxlIT o LxVP derivados de NFATc2 o NFATc1. Se empleó como control el péptido mutado LxVPc1 (mutLxVPc1) fusionado a GFP. Fig. 8A.- Las células HeLa transfectadas se estimularon o no con PMA (20 ng/ml) más ionóforo de calcio (Io) (1 μ M) (PMA+Io) durante 1 h. Los extractos celulares totales se analizaron mediante *western blot* usando un anticuerpo frente a HA para detectar NFATc2 (panel superior) ó un suero anti-GFP para controlar la expresión de las proteínas de fusión a GFP (panel inferior). La movilidad electroforética de las bandas superiores (fosforilado) e inferiores (desfosforilado) corresponde al estado de fosforilación de NFATc2. Los extractos de las células que expresaban solo la proteína parental GFP se muestran con los carriles ϕ . Los asteriscos señalan bandas inespecíficas. Fig. 8B.- Localización subcelular de NFATc2 en las células HeLa transfectadas tratadas con Io durante 30 minutos. Las imágenes de la inmunofluorescencia muestran campos representativos de células que expresaban la correspondiente proteína de fusión de GFP-péptido (izquierda) y la tinción de NFATc2 (derecha). Se indica el porcentaje de células que mostraban una distribución citosólica de NFATc2 (se contaron al menos 130 células por transfección).

15 - Descripción detallada de la invención

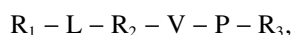
La presente invención se basa en que los inventores han encontrado la sorprendente utilidad de los péptidos, LxVPc1, LxVPc3 y LxVPc4 como eficientes inhibidores selectivos de la ruta de señalización CN-NFAT y más concretamente como útiles compuestos inmunosupresores base para la elaboración de composiciones terapéuticas para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades humanas que cursen con activación de linfocitos T, tales como, pero sin limitarnos a, enfermedades autoinmunes, inflamación y alergia o situaciones de rechazo a trasplantes. Igualmente, estos péptidos y el material genético y biológico relacionado pueden constituir útiles herramientas para el desarrollo de ensayos para encontrar compuestos que tengan actividad antagonista selectiva de la Calcineurina (en adelante CN).

En la presente invención se ha comparado la interacción de NFATc1 y NFATc2 con la CN activa. En los análisis semicuantitativos se muestra claramente que la interacción de CN con NFATc1 es más fuerte que con NFATc2. Por otro lado los experimentos de competición utilizando péptidos basados en los sitios LxVP de los diferentes NFATs sugieren que NFATc3 y NFATc4 tendrían una capacidad de interacción con CN similar a la de NFATc1. Por lo tanto, mientras que el motivo PxlIT es el principal sitio de anclaje de CN en NFATc2, la presencia de sitios LxVP funcionales en NFATc1, NFATc3 y NFATc4 contribuye a una interacción NFAT-CN más fuerte.

Adicionalmente hemos visto que el péptido LxVPc2 es un competidor muy débil de la unión de CN a NFAT, lo que sugiere que la interacción NFATc2-CN pudiera deberse principalmente al motivo PxlIT. El motivo LxVP de NFATc1 presenta unas características diferentes. Este péptido LxVP se une mucho más eficientemente a CN que los motivos PxlIT de NFATc1 y NFATc2 (Fig. 3). También es capaz de inhibir *in vitro* la interacción de CN con ambos NFATs y la translocación de NFATc2 en células activadas (Figs. 4-6 y Fig. 8). La gran capacidad de LxVPc1 para interferir en los complejos NFATc2-CN tanto *in vitro* como *in vivo* es uno de los resultados más sorprendentes de esta invención. Los péptidos LxVP basados en las secuencias de NFATc1, NFATc3 y NFATc4 también han demostrado ser unos competidores eficientes de la interacción *in vitro* de CN con NFATc1 ó NFATc2. Sería pues esperable que la expresión en células de los péptidos LxVPc3 y LxVPc4 acarrearase un efecto similar al observado con el péptido LxVPc1 sobre la activación de NFATc2.

Por otro lado en esta invención presentamos claras evidencias de que los residuos conservados en los motivos LxVP, Leucina, Valina y Prolina, son esenciales para la interacción de NFATc1 con CN. Sin embargo, el hecho de que el motivo LxVPc2 también presente conservados estos aminoácidos indica que otros residuos presentes en dicho motivo han de ser importantes en la interacción proteína-proteína. Más allá de los tres residuos conservados, sólo NFATc1, NFATc3 y NFATc4 poseen un aminoácido aromático adyacente al núcleo del motivo LxVP (Tirosina, Fenilalanina y Tirosina, respectivamente). Otra diferencia en las secuencias es la presencia en NFATc2 de un residuo de Prolina adyacente al extremo C-terminal del núcleo del motivo LxVP, lo que da lugar a dos residuos consecutivos de Prolina de los que carecen el resto de miembros de NFAT. Esto hace que las diferencias en las regiones que flanquean el núcleo del motivo puedan explicar el comportamiento diferencial que posee el LxVPc2 comparado con LxVPc1, LxVPc3 y LxVPc4.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención lo constituye una secuencia de aminoácidos, capaz de inhibir selectivamente la ruta de señalización CN-NFAT, que comprende la secuencia de aminoácidos (aá)



donde R_1 es un aá aromático del tipo Tirosina o Fenilalanina; R_2 es un aminoácido del tipo Alanina o Serina y R_3 no es el aminoácido Prolina (en adelante a esta secuencia de aminoácidos lo llamaremos núcleo básico de la invención). Dicha secuencia de aminoácidos constituye el núcleo básico de partida para la constitución de todos aquellos compuestos capaces de inhibir selectivamente la ruta de señalización CN-NFAT y más concretamente capaces de inhibir la acción biológica de la CN sobre, al menos, los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2.

Otro aspecto preferente de la presente invención lo constituye una secuencia de aminoácidos, capaz de inhibir selectivamente la ruta de señalización CN-NFAT y más concretamente capaz de inhibir la acción biológica de la CN

sobre los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2, que posee el núcleo básico de la invención y pertenece al siguiente grupo:

- a) secuencia de aa SEQ ID NO 18 (LxVPc1) o SEQ ID NO 21 (LxVPc3) o SEQ ID NO 22 (LxVPc4),
- b) secuencia de aa análoga a la secuencia de a)
- c) secuencia de aa que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a (a) o (b).

En el sentido utilizado en esta descripción, el termino “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de aa que pueda ser aislada o construida en base a las secuencia de aa mostradas en la presente invención, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de aa, conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más aminoácidos, la adición de uno o más aa, en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más aa, en cualquier extremo o en el interior de la secuencia siempre y cuando esto no modifique el núcleo básico de la invención y que constituya un péptido capaz de inhibir selectivamente la ruta de señalización CN-NFAT y más concretamente capaz de inhibir la acción biológica de la CN sobre los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2.

En general, una secuencia de aa análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aa comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aa en cuestión tengan un grado de identidad de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

Un aspecto particular de la invención lo constituye un péptido capaz de inhibir selectivamente la ruta de señalización CN-NFAT y más concretamente capaz de inhibir la acción biológica de la Calcineurina sobre los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2, y que comprenda la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 18 o una secuencia de aa análoga o sustancialmente análoga a la SEQ ID NO 18.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye un péptido capaz de inhibir selectivamente la ruta de señalización CN-NFAT y más concretamente capaz de inhibir la acción biológica de la CN sobre los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2, y que comprenda la secuencia de aa SEQ ID NO 21 o una secuencia de aa análoga o sustancialmente análoga a la SEQ ID NO 21.

Un aspecto particular más de la invención lo constituye un péptido capaz de inhibir selectivamente la ruta de señalización CN-NFAT y más concretamente capaz de inhibir la acción biológica de la CN sobre los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2, y que comprenda la secuencia de aa SEQ ID NO 22 o una secuencia de aa análoga o sustancialmente análoga a la SEQ ID NO 22.

Cualquiera de las secuencias de aa de la presente invención puede ser obtenida mediante la expresión génica de las secuencias de nucleótidos que permiten la codificación de sus residuos, así como mediante su síntesis química. Algunas modificaciones pueden ser importantes para estabilizar el péptido en futuras formulaciones farmacéuticas en las que se incorpore para su administración a un individuo o para su utilidad como herramienta de investigación. De igual forma se sustituye uno ó más nucleótidos del codón correspondiente a cada residuo de interés.

Por consiguiente, las secuencias de aa de los péptidos de la invención y las secuencias de nucleótidos codificantes de las mismas comprenden una serie de secuencias que cualquier experto en materia puede obtener de forma rutinaria, sin excesiva experimentación, a partir de la información suministrada en la presente invención. Dichas sustituciones o modificaciones adecuadas para llevar a cabo los diversos aspectos de la presente invención se pueden determinar mediante experimentación de rutina para obtener péptidos con las propiedades estructurales y funcionales descritas por ejemplo comparando las interacciones proteína-proteína mediante ensayos de competición *in vitro* o *in vivo* utilizando CN con cualquiera de los NFATs c1-c4.

Se puede hacer cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a expresar y producir la construcción final del péptido deseado mediante mutaciones en el ADN y técnicas de ingeniería genética utilizando células huésped que comprendan dichas secuencias de nucleótidos.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos capaz de codificar la secuencia de aa de los péptidos LxVPc1 o LxVPc3 o LxVPc4 de la presente invención constituida por una secuencia de nucleótidos seleccionado de uno de los siguientes grupos:

- a) secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 5 y/o su secuencia complementaria SEQ ID NO 6,
- b) secuencia de nucleótidos y/o su secuencia complementaria que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 21,
- c) secuencia de nucleótidos y/o su secuencia complementaria que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 22,
- d) secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia (a), o (b) o (c),

e) secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de (a), (b), (c) y (d).

Un aspecto particular de la invención lo constituye una secuencia de nucleótidos capaz de codificar una secuencia de aminoácidos o péptidos que pueden inhibir selectivamente la ruta de señalización CN-NFAT, y más concretamente, inhibir la acción biológica de la CN sobre los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2, y que comprenda la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 5 y/o su secuencia complementaria SEQ ID NO 6.

La secuencia de nucleótidos descrito en la presente invención también puede estar unida o fusionada, en caso necesario y para permitir un mejor aislamiento o detección del péptido expresado, a una secuencia de ADN que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o detección de dicho péptido.

Por lo tanto, otro aspecto particular de la presente invención lo constituye una construcción genética que comprende además de una secuencia de nucleótidos seleccionada en entre la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 5 y/o su secuencia complementaria SEQ ID NO 6, o la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido LxVPc3, o la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido LxVPc4, cualquier otra secuencia de nucleótidos codificante de un péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o la detección del/de los péptido/s expresado/s.

La secuencia de nucleótidos y la construcción genética de la presente invención pueden obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas por cualquier experto en la materia (cfr. Sambrook *et al.* Molecular cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989 vol. 1-3). Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar integradas en un vector de expresión que permite la regulación de la misma en condiciones adecuadas.

Por lo tanto, otro aspecto más de la presente invención lo constituye un vector de expresión génica que comprende la secuencia de nucleótidos LxVPc1 y/o su secuencia complementaria o la secuencia de nucleótidos LxVPc3 y/o su secuencia complementaria o la secuencia de nucleótidos LxVPc4 y/o su secuencia complementaria o la construcción genética LxVPc1 o la construcción genética LxVPc3 o la construcción genética LxVPc4 de la presente invención y que permite la expresión de dicha construcción en el citoplasma de una célula de la invención.

En general, el vector de expresión LxVPc1 o el vector de expresión LxVPc3 o el vector LxVPc4 de la presente invención comprende, además de la secuencia de nucleótidos LxVPc1 y/o su secuencia complementaria o la secuencia de nucleótidos LxVPc3 y/o su secuencia complementaria o la secuencia de nucleótidos LxVPc4 y/o su secuencia complementaria o la construcción genética LxVPc1 o la construcción genética LxVPc3 o la construcción genética LxVPc4 de la presente invención, un promotor que dirige su transcripción, al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción, señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas, secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, silenciadores transcripcionales, represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada uso concreto entre plásmidos de expresión de células que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora y del tipo de uso que se quiera realizar.

Por tanto, según un modo de realización particular de la presente invención dicho vector es un plásmido. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia al igual que para la transformación de los microorganismos se pueden utilizar diferentes métodos como, pero sin limitación, transformación química, electroporación, microinyección, entre otros.

Un aspecto adicional de la presente invención lo constituye una célula transformada que comprende una secuencia de nucleótidos LxVPc1 y/o su secuencia complementaria o una secuencia de nucleótidos LxVPc3 y/o su secuencia complementaria o una secuencia de nucleótidos LxVPc4 y/o su secuencia complementaria o una construcción genética LxVPc1 o una construcción genética LxVPc3 o una construcción genética LxVPc4 o un vector LxVPc1 o un vector LxVPc3 o un vector LxVPc4 de la presente invención y que es capaz de expresar el péptido LxVPc1 o el péptido LxVPc3 o el péptido LxVPc4 respectivamente, de la presente invención en condiciones adecuadas. La célula LxVPc1 o la célula LxVPc3 o la célula LxVPc4 de la invención puede ser una célula procariota o eucariota en función de las necesidades concretas y pueden ser elaboradas por un experto en la materia con la información descrita en la presente invención.

La secuencia de nucleótidos, construcción genética, vector de expresión, las células transformadas y el péptido LxVPc1, c3 o c4 de la presente invención pueden ser utilizados directamente o mediante su expresión genética en células huésped para la elaboración de sistemas de identificación o screening de compuestos farmacéuticos reguladores de la ruta de señalización CN-NFAT, más concretamente de la acción biológica de la CN sobre los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2, preferentemente antagonistas selectivos de CN-NFAT mediante la determinación del efecto de la adición de un potencial compuesto sobre dicha actividad. En estos ensayos se pueden utilizar distintas combinaciones, uno o más, de las potenciales formas posibles de los péptidos LxVPc1, c3 o c4. El uso directo del péptido LxVPc1, c3 o c4, de la presente invención puede utilizarse, después de su extracción y purificación, en un ensayo *in vitro* de interacción o unión de proteínas. En estos ensayos se puede utilizar conjuntamente las proteínas o fragmentos de las mismas implicadas en la interacción para la que se desea identificar compuestos reguladores; mientras que la interacción de dichas proteínas se puede valorar por ejemplo mediante Western blot (ver ejemplos).

Los compuestos a identificar pueden ser de distinto origen: natural (plantas, procariota, etc) o sintético. Este sistema de screening puede medir o detectar (cuantitativa o cualitativamente) la unión competitiva de un compuesto candidato a un péptido señal mediante marcaje directo o indirecto de alguno de los elementos de dicho sistema.

5 Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención lo constituye un procedimiento o ensayo de identificación o screening de nuevos compuestos farmacéuticos reguladores, preferentemente antagonistas selectivos, de la ruta de señalización CN-NFAT, más concretamente de la acción biológica de la CN sobre los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2 y que comprende el uso de la secuencia de nucleótidos, construcción génica, vector de expresión, las células huésped y/o los péptidos de la presente invención de forma aislada o en una de sus combinaciones posibles.

10 Otro aspecto de la presente invención lo constituye un ensayo de identificación de compuestos farmacéuticos en el que el procedimiento es un ensayo de identificación de compuestos farmacéuticos en el que el procedimiento es un ensayo *in vitro* o es un ensayo *in vivo*, como por ejemplo, un ensayo de co-inmunoprecipitación o de inmunodetección.

15 Tal y como se utiliza en la presente invención el término selectivos se refiere a que la capacidad del péptido de la invención de actuar como antagonista de la actividad de CN es considerablemente mayor que su capacidad de actuar como antagonistas de otras proteínas y, por otro lado, a que pueden seleccionarse péptidos más específicos para inhibir distintas actividades de la misma proteína CN.

20 Por lo tanto, otro aspecto de la invención lo constituye una composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades que comprenda cualquiera de los péptidos anteriormente mencionados (SEQs ID No 18, 21, 22) incluyendo sus análogos y sustancialmente análogos o cualquier otro compuesto que comprenda el núcleo básico y que sea capaz de inhibir selectivamente la ruta de señalización CN-NFAT, en adelante composición farmacéutica de la invención, que cursen con activación de la CN, y preferentemente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, con la activación del sistema inmunológico.

Otro aspecto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en la profilaxis y tratamiento de enfermedades humanas que cursen con activación de la CN, y preferentemente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, con activación de linfocitos T, tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, inflamación, alergia o situaciones de rechazo a trasplantes.

Finalmente, otro aspecto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención como herramienta para la investigación básica para el aislamiento de nuevos sustratos de CN importantes para la señalización mediada por Calcio en diferentes especies.

35 A continuación los siguientes ejemplos y figuras sirven para ilustrar pero no limitan la presente invención.

Ejemplos de realización

40 Ejemplo 1

La unión de CN a NFATc1 es más fuerte que a NFATc2

45 Para analizar la capacidad de interacción de NFATc1 y NFATc2 con la CN realizamos ensayos de unión *in vitro*. Comparamos la CN unida a concentraciones decrecientes de los dominios reguladores recombinantes purificados de NFATc1 o NFATc2 fusionados a la proteína GST (GST-NFATc1 y GST-NFATc2 respectivamente). La cuantificación mediante densitometría de la CN unida indicó que NFATc1 tiene capacidad de unión a CN del orden submicromolar, y que la afinidad de NFATc2 parece ser mucho más baja que la de NFATc1 (Fig. 2A).

50 Se realizaron experimentos complementarios en los que se varió la concentración de CN. En cada caso, la cantidad de CN unida a las proteínas de fusión GST-NFAT decrecía a medida que la concentración de CN era progresivamente disminuida. Sin embargo, y concordando con los resultados obtenidos variando las concentraciones de GST-NFAT, a cada concentración de CN ensayada, la unión a NFATc1 era más fuerte que a NFATc2 (Fig. 2B).

55 Ejemplo 2

La capacidad unión de CN al motivo LxVPc1 es mayor que a los motivos PxxIT

60 Estas diferencias de unión de CN podrían deberse a una capacidad diferencial de unión de CN a los sitios PxxIT y LxVP de NFATc1 y NFATc2. Los segundos sitios de unión de CN muestran una homología limitada entre los diferentes miembros de NFAT, aunque su alineamiento indica que existen tres residuos conservados en todos los miembros (Leucina, Valina y Prolina) (Fig. 1A). Para probar la capacidad de interacción de cada secuencia independiente PxxIT y LxVP con CN, fusionamos la proteína GST con los motivos PxxIT y LxVP de NFATc1 y NFATc2 (Fig. 1A), y los usamos en experimentos de *pull-down* con CN (Fig. 3). La cantidad de CN unida a GST-LxVPc1 era mucho mayor que la unida a GST-PxxITc1 o GST-PxxITc2, mientras que GST-LxVPc2 era incapaz de unir CN en las mismas condiciones experimentales. La relevancia de los aminoácidos conservados (Valina, Leucina y Prolina) para

la unión de LxVPc1 a CN se estudió usando una construcción GST-mutLxVPc1, en la cual cada residuo conservado se reemplazó por Alanina; GST-mutLxVPc1 fue incapaz de unir CN (Fig. 3). Este resultado sugiere que la mayor capacidad de unión de CN al motivo LxVP de NFATc1 (con relación a los motivos PxlITc1 y PxlITc2) podría ser la responsable de la mayor fortaleza en la interacción de CN con NFATc1 *versus* NFATc2.

Ejemplo 3

Efecto de los péptidos PxlIT y LxVP en la interacción NFAT-CN in vitro

Dadas las diferencias en la capacidad de interacción de CN con los sitios PxlIT y LxVP, evaluamos la capacidad de los péptidos correspondientes a dichas secuencias para competir la unión de GST-NFATc1 con CN *in vitro*. Los péptidos sintéticos correspondientes a las secuencias de unión de CN LxVP y PxlIT de NFATc1 y NFATc2 se muestran en la Fig. 1A. La cantidad de CN unida a GST NFAT se detectó mediante análisis por *western blot*. En estos ensayos, el péptido VIVIT (Fig. 1B), una secuencia altamente específica seleccionada mediante una librería combinatorial de péptidos (29), se usó como un potente competidor control.

Los péptidos PxlIT correspondientes a NFATc1 y NFATc2 (PxlITc1 y PxlITc2, respectivamente) tenían una potencia similar desplazando la unión de NFATc2 y CN (Fig. 4A), pero existían claras diferencias entre los dos péptidos basados en las secuencias LxVP. LxVPc1, el péptido que contenía la secuencia LxVP de NFATc1, interfería la unión de CN a NFATc2. Este efecto era incluso más fuerte que el causado por la secuencia PxlITc2, descrita como el sitio de anclaje de CN a este NFAT (Fig. 4A). Por contra, la misma concentración del péptido LxVP específico de NFATc2 (LxVPc2) no fue capaz de competir la unión de NFATc2 con CN (Fig. 4A, panel izquierdo). En estos ensayos, el péptido mutLxVPc1 no afectó a la unión de NFATc2 y CN, indicando que estos residuos son necesarios para competir la unión de NFAT a CN *in vitro*.

Estos resultados sugieren que LxVPc2 no interacciona con CN, o más en profundidad, que su capacidad de interacción con CN es mucho más débil que la de LxVPc1. Para ahondar en este punto, incrementamos la concentración de péptidos competidores en las reacciones de unión. Como se muestra en la Fig. 4B, mientras que una concentración de 100 μ M de PxlITc1, PxlITc2 o LxVPc1 bloqueaba eficientemente la interacción de CN con NFATc2, LxVPc2 era incapaz de afectar a la unión a esta concentración, y usando concentraciones tan elevadas como 300 μ M sólo producía una inhibición parcial. Por otro lado, tanto péptido control mutLxVPc1 como otro péptido que contenía una distribución aleatoria de los aminoácidos del VIVIT (*scrambled*) (Ver Fig. 1B) fueron incapaces de afectar la unión de CN a NFATc2, incluso a las concentraciones de péptido más elevadas.

Los péptidos que impidieron la interacción CN-NFATc2 fueron también capaces de inhibir la unión de NFATc1 a CN (Fig. 4C). Consistentemente con la capacidad de unión diferencial observada de CN a NFATc1 y NFATc2 (Fig. 2), los péptidos, incluso a 200 μ M, fueron menos efectivos compitiendo la unión de CN con NFATc1 que con NFATc2 (Fig. 4C). Estos resultados refuerzan aun más la hipótesis de que la afinidad global de NFATc1 por CN es mayor que la de NFATc2.

Ejemplo 4

El péptido LxVPc1 es un potente inhibidor de la unión de CN y NFAT

Experimentos de competición “dosis-dependiente” confirmaron que el péptido LxVPc1 es más potente que el LxVPc2 compitiendo la unión de GST-NFATc2 a CN (Fig. 5). En estos experimentos, la cantidad de CN unida se analizó mediante cuantificación computerizada de ensayos de *western blot*. El péptido VIVIT, usado como control positivo, fue el competidor más potente (Fig. 5, panel izquierdo). Una concentración de 50 μ M del péptido LxVPc1 bloqueó totalmente la unión, mientras que la misma concentración de PxlITc2 produjo sólo un efecto inhibidor parcial (Fig. 5, panel central y derecho).

Las diferencias entre la capacidad inhibidora de los péptidos LxVPc1 y LxVPc2 nos hizo ampliar el estudio a los motivos LxVP de los restantes miembros de NFAT. Los péptidos sintéticos correspondientes a las secuencias LxVP de NFATc1, c3 y c4 inhibieron la interacción de GST-NFATc1 con CN de un modo similar cuando se usaron a 32 μ M (Fig. 6A); solo los péptidos LxVPc2 y mutLxVPc1 (usado como control negativo) no fueron capaces de alterar la unión NFAT-CN a esa concentración. En experimentos paralelos, usamos los péptidos basados en las secuencias PxlIT de todos los miembros de NFAT como competidores. Como se muestra en la Fig. 6B, una dosis de 100 μ M de todos los péptidos PxlIT (tres veces mayor que la concentración usada para los péptidos LxVP) fue capaz de bloquear la interacción de CN con NFATc1 o NFATc2, mientras que el péptido control *SCRAMBLED* no fue capaz de hacerlo. De todos los péptidos correspondientes a las dos secuencias de anclaje de los diferentes NFAT, sólo el LxVPc2 no compitió eficientemente la interacción *in vitro* de CN con NFATc1 o NFATc2; los demás péptidos LxVP se han demostrado mejores competidores que los péptidos PxlIT.

Ejemplo 5

Competición cruzada entre las diferentes secuencias de unión a CN de los NFATs

La capacidad que poseía el péptido LxVPc1 para competir la unión de CN a NFATc2 (Fig. 4, 5 y 6) resultaba sorprendente. Para profundizar en este hecho, realizamos nuevos experimentos de competición, esta vez para analizar la capacidad de los péptidos para competir la unión de CN a unas proteínas de fusión de GST-péptido. El péptido LxVPc1 compitió la unión de CN a GST-PxIxITc2, así como los péptidos PxIxITc2 y VIVIT (péptido derivado de la secuencia PxIxIT) compitieron la unión de CN a GST-LxVPc1 (Fig. 7). Dada la falta de similitudes claras entre estos dos motivos de NFAT, el resultado sugiere que las secuencias de CN que interaccionan con los motivos PxIxIT y LxVP de NFAT deben ser interdependientes de algún modo.

Ejemplo 6

La expresión in vivo del péptido LxVPc1 bloquea la activación de NFATc2

Para analizar si los péptidos derivados de los sitios de unión de CN a NFATc1 tenían la capacidad de regular NFATc2 en células vivas, co-transfectamos un vector de expresión de NFATc2 *wild type* junto con otro que codificaba para las proteínas de fusión GFP-LxVP o GFP-PxIxIT de NFATc1 y NFATc2. Usamos la línea celular HeLa porque carece de expresión endógena de NFAT. Como control positivo y negativo se usaron las proteínas de fusión GFP-VIVIT o GFT-mutLxVPc1 respectivamente.

El análisis mediante *western blot* de extractos celulares totales mostró que la expresión de GFP-LxVPc1 bloqueaba la desfosforilación de NFATc2 inducida mediante incremento del calcio intracelular (Fig. 8A), por el contrario, la expresión de GFP, GFP-LxVPc2 o GFP-mutLxVPc1 no tenía ningún efecto. Sin embargo, y en aparente discrepancia con datos previamente publicados (15), no detectamos ningún efecto significativo sobre la desfosforilación de NFATc2 cuando se expresaron las construcciones GFP-PxIxITs (datos no mostrados). Dado que la causa de esta discrepancia podría ser la presencia de NFATc2 en células GFP negativas, analizamos mediante inmunofluorescencia el efecto directo de las construcciones GFP-péptidos en la translocación nuclear de NFATc2. El análisis de inmunofluorescencias control de células no estimuladas demostró que NFATc2 se encontraba en el citoplasma de las células transfectadas con las diferentes construcciones GFP (dato no mostrado). En la mayoría de las células transfectadas con la construcción GFP-péptido control, NFATc2 se localizaba en el núcleo tras la activación con ionóforo de calcio, mostrando sólo un 9% de células tinción citosólica de NFATc2 (Fig. 8B). Al igual que con la desfosforilación de NFATc2, el mayor efecto inhibitorio sobre la translocación nuclear de NFATc2 se lograba con la expresión de GFP-VIVIT y GFP-LxVPc1: 92% y 77% de células con tinción citosólica de NFATc2 respectivamente. Además, observamos que la expresión de GFP-PxIxITc2 o GFP-PxIxITc1 inhibía parcialmente la translocación nuclear de NFATc2: Entre el 33% y el 39% de células GFP positivas mostraban localización citosólica de NFATc2 tras la activación (Fig. 7B), dato concordante con los publicados por Aramburu *et al.* (15). Estos resultados también estaban de acuerdo con los estudios de unión *in vitro*, e indicaban claramente que el péptido LxVPc1 mantenía su capacidad para interaccionar fuertemente con CN e inhibir su interacción con NFATc2 *in vivo*, evitando la desfosforilación y translocación nuclear de NFATc2.

Por otro lado, se ha observado que el péptido LxVPc1 inhibe la actividad fosfatasa de CN. Se valoró la actividad fosfatasa de la calcineurina *in vitro* en presencia de distintos péptidos. Así se observó que el péptido PxIxIT no inhibía la actividad fosfatasa (datos no mostrados). Sin embargo, la adición del péptido LxVPc1 (pero no su forma mutada) bloqueó severamente *in vitro* la actividad fosfatasa de la CN.

Ejemplo 7

Materiales y métodos

Las construcciones GST-NFATc1 que expresa la región reguladora de NFATc1 (1-418 aa) fusionada a la proteína glutathione *S-transferase* (GST) fue generosamente suministrada por la Dra. A. Rao (12). La construcción GST-NFATc2 se generó mediante subclonaje en fase a partir de un cDNA que codificaba la secuencia desde el aminoácido 4 hasta el 385 de NFATc2 en un vector pGEX4T3 (Amersham Biosciences) digerido con *BamHI-SmaI*:

Los vectores de expresión GST-péptido y GFP-péptido se generaron mediante clonaje en fase en el vector digerido pGEX (Amersham Biosciences) o pEGFP-C (Clontech) de oligonucleótidos anillados con extremos protuberantes que codificaban las diferentes secuencias peptídicas.

El plásmido de expresión pEF-BOS HA-NFATc2 se ha descrito previamente (39), y codifica la proteína NFATc2 completa fusionada al epítipo HA (*influenza virus hemagglutinin*) en su extremo NH₂-terminal.

Ejemplo 7.1

Transfección y análisis mediante Western Blot de extractos celulares

Las células HeLa se cultivaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) (Gibco) completado con suero fetal bovino (FBS) (Sigma) al 10%. El día anterior a la transfección, las células se sembraron en placas de 6 pocillos para que alcanzasen una confluencia del 80% en el momento de la transfección. Las células se transfectaron con 18 ng de pEF-BOS HA-NFATc2 mas 1,1 μ g de los plásmidos GFP-péptido con 4 μ l de reactivo Plus más 6 μ l de reactivo Lipofectamina (Invitrogen) durante 3 h en 1 ml de medio OPTIMEM (Gibco). Mediante citometría de flujo se cuantificó la eficiencia de transfección como el porcentaje de células que expresaban GFP. Se obtuvieron eficiencias de transfección similares para las diferentes construcciones y en experimentos independientes.

Veinticuatro horas después de la transfección, el medio de cultivo de las HeLa se reemplazó por DMEM+1%FBS. Tras dos horas más, las células se estimularon durante 1 hora usando 20 ng/ml de PMA (*phorbol 12 myristate 13 acetato*) (Sigma) más 1 μ M de ionóforo de calcio A23187 (Sigma) y 3 mM de CaCl_2 . A continuación las células se lavaron usando un tampón fosfato salino frío (PBS) y se obtuvieron los extractos celulares usando un tampón de rotura [20 mM Hepes pH 7,6 con 0,4 M de NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM EGTA, 1 μ M DTT (*dithiothreitol*), 1 mM PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), 100 μ M benzamidina, 1 μ g/ml de pepstatina, 1 μ g/ml de aprotinina y 1% de Triton X-100]. Las proteínas celulares se extrajeron durante 15' usando una noria y posteriormente se centrifugaron a 14000xg durante 15'. Todos los pasos anteriores se realizaron a 4°C. Tras la centrifugación, se añadió tampón Laemmli a los sobrenadantes obtenidos. Los extractos celulares totales se hirvieron durante 10' y se cargaron en geles de poliacrilamida con SDS (*sodium dodecyl sulphate*) (6% para NFAT y 10% para CN activa o GFP). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones reductoras. Los geles de proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo [10% (peso/volumen) de leche desnatada en PBS]. Tras algunos lavados con PBS-T (0,1% de Tween-20 en PBS), las membranas se incubaron durante 2 h con la solución de anticuerpo primario respectiva: anti-HA monoclonal de ratón 12CA5 [0,05% (vol/vol)] en PBS-T con 1% de albúmina sérica bovina (BSA) para detectar NFATc2; o el anti-GFP policlonal de conejo suministrado por el Dr. I. Crespo [0,1% (vol/vol)] en PBS-T con 5% de leche desnatada. Posteriormente se lavaron las membranas tres veces durante 5' cada vez con PBS-T, y se incubaron durante 1 h con los anticuerpos hechos en cabra anti-IgG de ratón (Pierce) o anti-IgG de conejo (Pierce) conjugados con peroxidasa. Tras tres lavados con PBS-T y uno adicional con H_2O , el anticuerpo unido a las membranas se detectó mediante el sistema ECL (Amersham Biosciences).

Ejemplo 7.2

Inmunofluorescencias

Las células HeLa se transfectaron como se describe en el apartado anterior usando 1,2 μ g de los plásmidos de expresión GFP-péptido junto con 40 ng de pEF-BOS HA-NFATc2. Dos horas antes de la estimulación, se reemplazó el medio de cultivo por DMEM+1 %FBS. Tras estimular durante 30' con ionóforo de calcio A23187 (1 μ M) y CaCl_2 (3 mM), las células se fijaron a temperatura ambiente durante 10' con una solución al 10% de formaldehído en PBS conteniendo un 4% de sacarosa. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS y se permeabilizaron a temperatura ambiente durante 10' con una solución de PBS con 0,25% de Triton X-100. A continuación se incubaron las células durante 20' con un tampón de bloqueo (10% BSA en PBS) y posteriormente con una solución 1:500 del anticuerpo 12CA5 (anti-HA) durante 1 h. La localización subcelular de los NFATs se detectó usando un microscopio de fluorescencia (Axiovert-200, Zeiss) utilizando un anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 594 (Molecular Probes) como anticuerpo secundario. Se calculó el porcentaje de células con una distribución citosólica o nuclear de NFAT usando no menos de 130 células positivas por transfección.

Ejemplo 7.3

Ensayos de unión in vitro de CN-NFAT

Las proteínas de fusión de GST se expresaron en la cepa deficiente de proteasas de *E. coli* BL21(DE3). Se purificaron usando el reactivo *glutathione (GSH)-Sepharose B beads* (Amersham Biosciences). La unión de CN a estas proteínas de fusión de GST se usó para realizar ensayos de *pull-down*, que se realizaron como se explica a continuación. Se empleó una cantidad variable de las bolas que contenían las proteínas de fusión de GST fusionadas a los dominios reguladores de NFAT (1-2 μ g) o a los péptidos (10-30 μ g). Éstas se lavaron dos veces con el tampón de unión (20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1,5 mM CaCl_2 , 6 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, 1 μ M DTT, 1 μ g/ml de aprotinina, 1 μ g/ml de pepstatina, 100 μ M de benzamidina y 0,2% de Triton X-100) y posteriormente se incubaron durante 30' en una noria a 4°C con una solución de 20 nM de Calcineurina (Sigma) más 600 nM de Calmodulina (Sigma) en tampón de unión con o sin el péptido correspondiente. A continuación se centrifugaron brevemente las muestras a 4°C. Se añadió tampón Laemmli a los sobrenadantes (fracción no unida) y se guardaron para su posterior análisis. Las bolas se lavaron cinco veces con tampón de unión frío y recién preparado y se añadió tampón Laemmli; las muestras se hirvieron para separar las proteínas unidas (fracción unida). Las fracciones unida y no unida se cargaron en geles al 10% de SDS-poliacrilamida y se separaron mediante electroforesis en condiciones reductoras. La Calcineurina se detectó mediante *western blot* usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CnA (clon G182-1847, PharMingen). Donde

ES 2 327 694 A1

se indica, la cantidad de CN unida a las proteínas de fusión de GST se cuantificó mediante densitometría usando el programa Quantity One (BIO-RAD).

Los péptidos se sintetizaron en el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” CSIC-UAM.

En esta solicitud, sobre todo en las figuras, los aminoácidos se abrevian utilizando los códigos de una letra aceptados en el campo, en la forma que se muestra a continuación:

A =	Ala =	Alanina
C =	Cys =	Cisteína
D =	Asp =	Ácido aspártico
E =	Glu =	Ácido glutámico
F =	Phe =	Fenilalanina
G =	Gly =	Glicina
H =	His =	Histina
I =	Ile =	Isoleucina
K =	Lys =	Lisina
L =	Leu =	Leucina
M =	Met =	Metionina
N =	Asn =	Asparagina
P =	Pro =	Prolina
Q =	Gln =	Glutamina
R =	Arg =	Arginina
S =	Ser =	Serina
T =	Thr =	Treonina
V =	Val =	Valina
W =	Trp =	Triptófano
Y =	Tyr =	Tirosina

Bibliografía

1. Aramburu, J., Heitman, J., and Crabtree, G. R. (2004) *EMBO Rep* **5**, 343-348.
2. Crabtree, G. R., and Olson, E. N. (2002) *Cell* **109 Suppl**, S67-79.
3. Horsley, V., and Pavlath, G. K. (2002) *J Cell Biol* **156**, 771-774.
4. Lambrechts, D., and Carmeliet, P. (2004) *Cell* **118**, 532-534.
5. Wilkins, B. J., and Molkentin, J. D. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1178-1191.
6. Rao, A., Luo, C., and Hogan, P. G. (1997) *Annu Rev Immunol* **15**, 707-747.
7. Klee, C. B., Ren, H., and Wang, X. (1998) *J Biol Chem* **273**, 13367-13370.
8. Stemmer, P. M., and Klee, C. B. (1994) *Biochemistry* **33**, 6859-6866.

9. Loh, C., Shaw, K. T., Carew, J., Viola, J. P., Luo, C., Perrino, B. A., and Rao, A. (1996) *J Biol Chem* **271**, 10884-10891.
10. Wesselborg, S., Fruman, D. A., Sagoo, J. K., Bierer, B. E., and Burakoff, S. J. (1996) *J Biol Chem* **271**, 1274-1277.
11. Garcia-Cozar, F. J., Okamura, H., Aramburu, J. F., Shaw, K. T., Pelletier, L., Showalter, R., Villafranca, E., and Rao, A. (1998) *J Biol Chem* **273**, 23877-23883.
12. Luo, C., Shaw, K. T., Raghavan, A., Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Perrino, B. A., Hogan, P. G., and Rao, A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8907-8912.
13. Masuda, E. S., Liu, J., Imamura, R., Imai, S. I., Arai, K. I., and Arai, N. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 2066-2075.
14. Shibasaki, F., Price, E. R., Milan, D., and McKeon, F. (1996) *Nature* **382**, 370-373.
15. Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Raghavan, A., Okamura, H., Rao, A., and Hogan, P. G. (1998) *Mol Cell* **1**, 627-637.
16. Chow, C. W., Rincon, M., and Davis, R. J. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 2300-2307.
17. Park, S., Uesugi, M., and Verdine, G. L. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7130-7135.
18. Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J. C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., and McKeon, F. (1998) *Cell* **93**, 851-861.
19. Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A., and Crabtree, G. R. (1988) *Science* **241**, 202-205.
20. Macian, F. (2005) *Nat Rev Immunol* **5**, 472-484.
21. Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S. H., Horton, H. F., Byrne, M. C., and Rao, A. (2002) *Cell* **109**, 719-731.
22. Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., and Rao, A. (2001) *Oncogene* **20**, 2476-2489.
23. Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Avots, A., Chuvpilo, S., Klein-Hessling, S., Jha, M. K., Kondo, E., Pagel, P., Schulze-Luehrmann, J., and Palmethofer, A. (2004) *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1166-1170.
24. Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991) *Cell* **66**, 807-815.
25. Crabtree, G. R., and Clipstone, N. A. (1994) *Annu Rev Biochem* **63**, 1045-1083.
26. Liu, J. (1993) *Immunol Today* **14**, 290-295.
27. Rao, A. (1994) *Immunol Today* **15**, 274-281.
28. Kiani, A., Rao, A., and Aramburu, J. (2000) *Immunity* **12**, 359-372.
29. Aramburu, J., Yaffe, M. B., Lopez-Rodriguez, C., Cantley, L. C., Hogan, P. G., and Rao, A. (1999) *Science* **285**, 2129-2133.
30. Roehrl, M. H., Kang, S., Aramburu, J., Wagner, G., Rao, A., and Hogan, P. G. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A*.
31. Liu, J., Masuda, E. S., Tsuruta, L., Arai, N., and Arai, K. (1999) *J Immunol* **162**, 4755-4761.
32. Liu, J., Arai, K., and Arai, N. (2001) *J Immunol* **167**, 2677-2687.
33. Abbott, K. L., Friday, B. B., Thaloer, D., Murphy, T. J., and Pavlath, G. K. (1998) *Mol Biol Cell* **9**, 2905-2916.
34. Boss, V., Abbott, K. L., Wang, X. F., Pavlath, G. K., and Murphy, T. J. (1998) *J Biol Chem* **273**, 19664-19671.
35. Ferrari, D., Stroh, C., and Schulze-Osthoff, K. (1999) *J Biol Chem* **274**, 13205-13210.

36. **Johnson, E. N., Lee, Y. M., Sander, T. L., Rabkin, E., Schoen, F. J., Kaushal, S., and Bischoff, J.** (2003) *J Biol Chem* **278**, 1686-1692.

37. **Lyakh, L., Ghosh, P., and Rice, N. R.** (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 2475-2484.

38. **Van Rooij, E., Doevendans, P. A., De Theije, C. C., Babiker, F. A., Molkentin, J. D., and De Windt, L. J.** (2002) *J Biol Chem* **10**, 10.

39. **Gomez del Arco, P., Martinez-Martinez, S., Maldonado, J. L., Ortega-Perez, I., and Redondo, J. M.** (2000) *J Biol Chem* **275**, 13872-13878.

40. **Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A.** (2003) *Genes Dev* **17**, 2205-2232.

41. **Martinez-Martinez, S., and Redondo, J. M.** (2004) *Curr Med Chem* **11**, 997-1007.

42. **Li, H., Rao, A., and Hogan, P. G.** (2004) *J Mol Biol* **342**, 1659-1674.

43. **Rodriguez, A., Martinez-Martinez, S., Lopez-Maderuelo, M. D., Ortega-Perez, I., and Redondo, J. M.** (2005) *J Biol Chem* **280**, 9980-9984.

REIVINDICACIONES

1. Secuencia de aminoácidos, para inhibir selectivamente la ruta de señalización de la Calcineurina (CN) sobre los factores de transcripción NFAT (CN-NFAT), que comprende la secuencia de aminoácidos

$$R_1 - L - R_2 - V - P - R_3,$$

donde R_1 es un aminoácido aromático del tipo Tirosina o Fenilalanina; R_2 es un aminoácido del tipo Alanina o Serina y R_3 no es el aminoácido Prolina.

2. Secuencia de aminoácidos según la reivindicación 1, donde dichos factores de transcripción son, al menos, NFATc1 y NFATc2.

3. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada** porque está constituida por una secuencia de aminoácidos perteneciente al siguiente grupo:

- a) secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 18,
- b) secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- c) secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a (a) o (b).

4. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada** porque está constituida por una secuencia de aminoácidos perteneciente al siguiente grupo:

- a) secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 21,
- b) secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- c) secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a (a) o (b).

5. Secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada** porque está constituida por una secuencia de aminoácidos perteneciente al siguiente grupo:

- a) secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 22,
- b) secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- c) secuencia de aa que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a (a) o (b).

6. Secuencia de nucleótidos capaz de codificar una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6, donde dicha secuencia está seleccionada de uno de los siguientes grupos:

- a) secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 5 y/o su secuencia de nucleótidos complementaria SEQ ID NO 6,
- b) secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 21,
- c) secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 22,
- d) secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia (a), o (b) o (c),
- e) secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de (a), (b), (c) y (d).

8. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7, donde dicha secuencia es la SEQ ID NO 5 y/o la SEQ ID NO 6.

9. Construcción genética **caracterizada** porque comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 6-8.

10. Construcción genética según la reivindicación 9 que además comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o la detección del péptido expresado.

11. Vector de expresión génica que comprenda una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 6-8 o la construcción génica según las reivindicaciones 9-10.

12. Vector de expresión génica según la reivindicación 11, donde dicho vector es un plásmido.

13. Célula transformada que contiene una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, la construcción génica según las reivindicaciones 9-10 o el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 11-12.

14. Procedimiento de identificación de nuevos compuestos farmacéuticos capaces de inhibir la acción biológica de la Calcineurina sobre los factores de transcripción NFATc1 y NFATc2, que comprende el uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, la construcción génica según las reivindicaciones 9-10, el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 11-12 o la célula transformada según la reivindicación 13.

15. Procedimiento de identificación de nuevos compuestos según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dichos compuestos son antagonistas selectivos de la actividad biológica de Calcineurina A.

16. Procedimiento de identificación de nuevos compuestos según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicho procedimiento es un ensayo *in vitro* de interacción o unión de proteínas.

17. Uso de los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de enfermedades que cursen con activación de la Calcineurina.

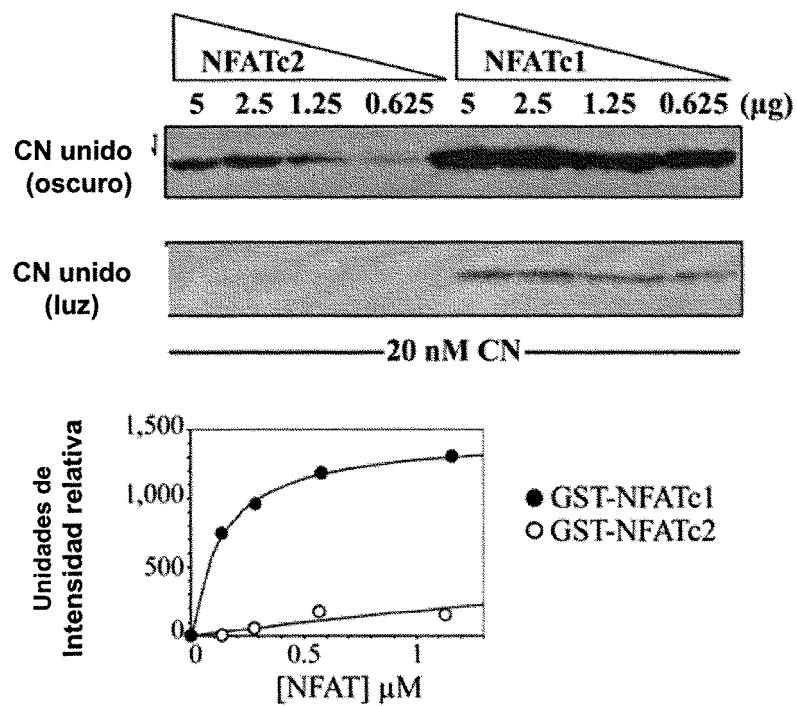
18. Uso de los péptidos según la reivindicación 17, donde dicha enfermedad cursa con activación de linfocitos T y pertenece al siguiente grupo: enfermedades autoinmunes, inflamación, alergia o situaciones de rechazo a transplantes.



VIVIT MAGPHPVIVITGPPHEE
SCRAMBLED MVGIPVAIHGTPPHEE

FIG. 1

A



B

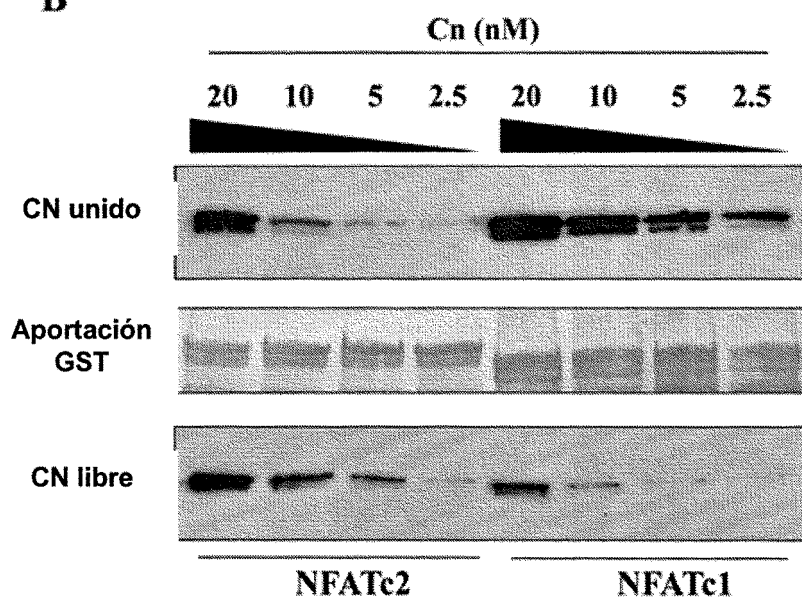


FIG. 2

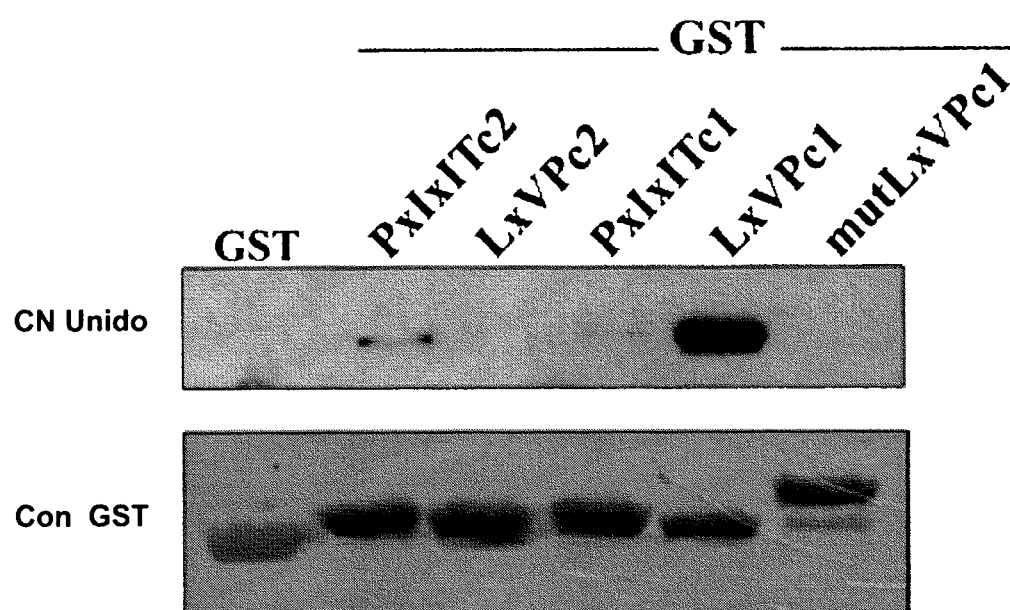
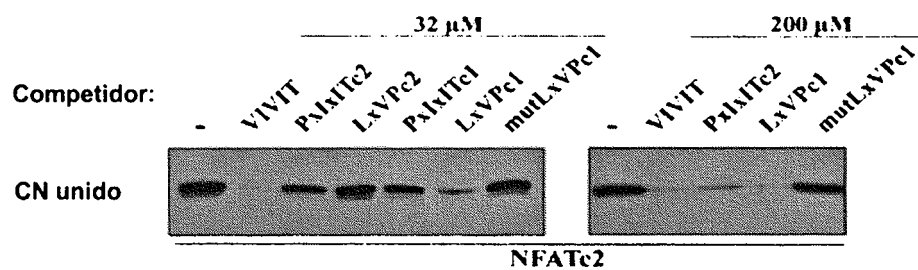
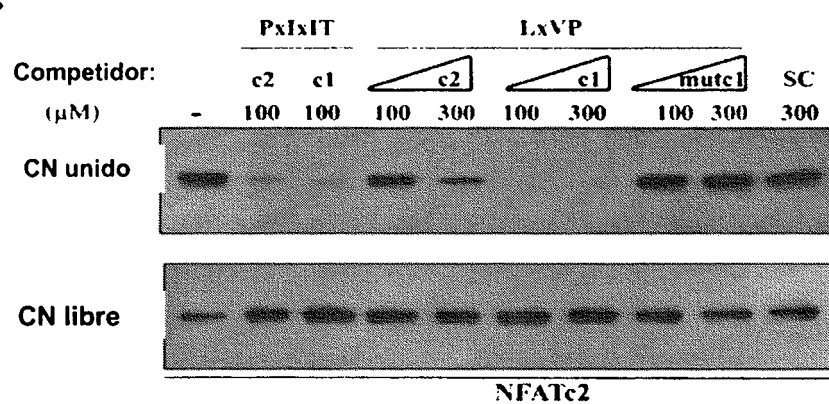


FIG. 3

A



B



C

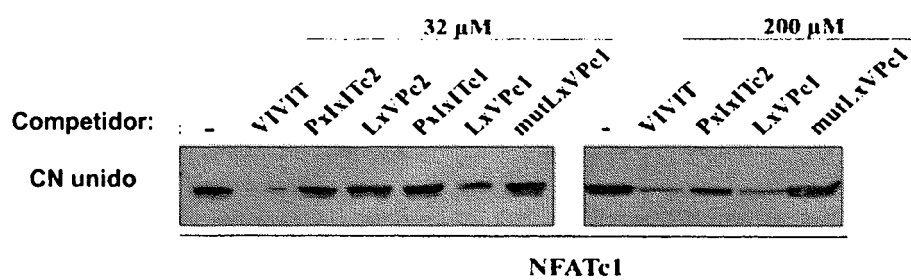


FIG. 4

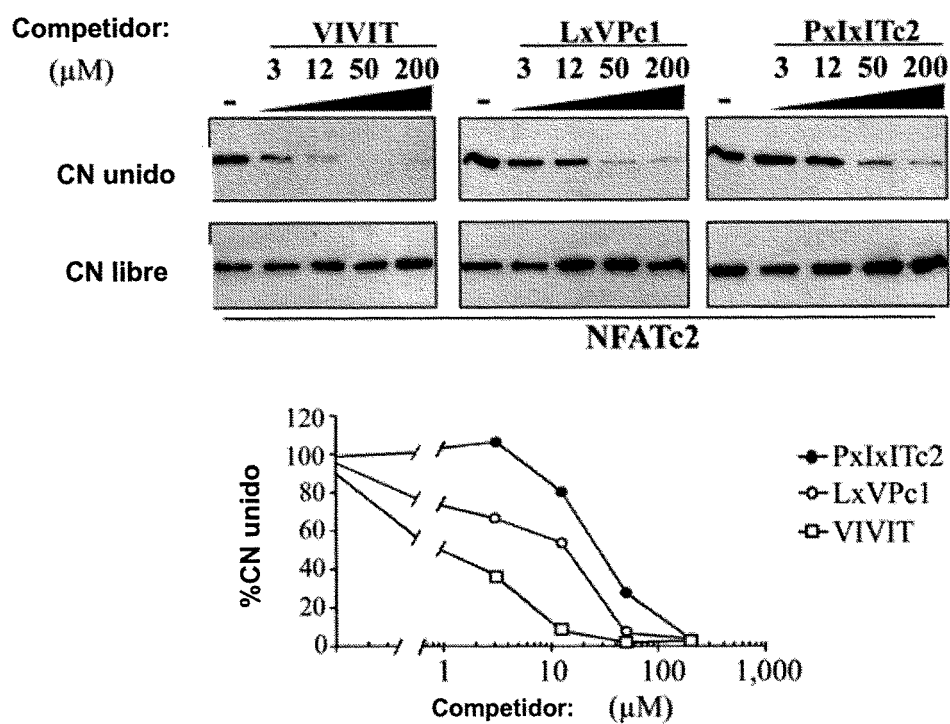


FIG. 5

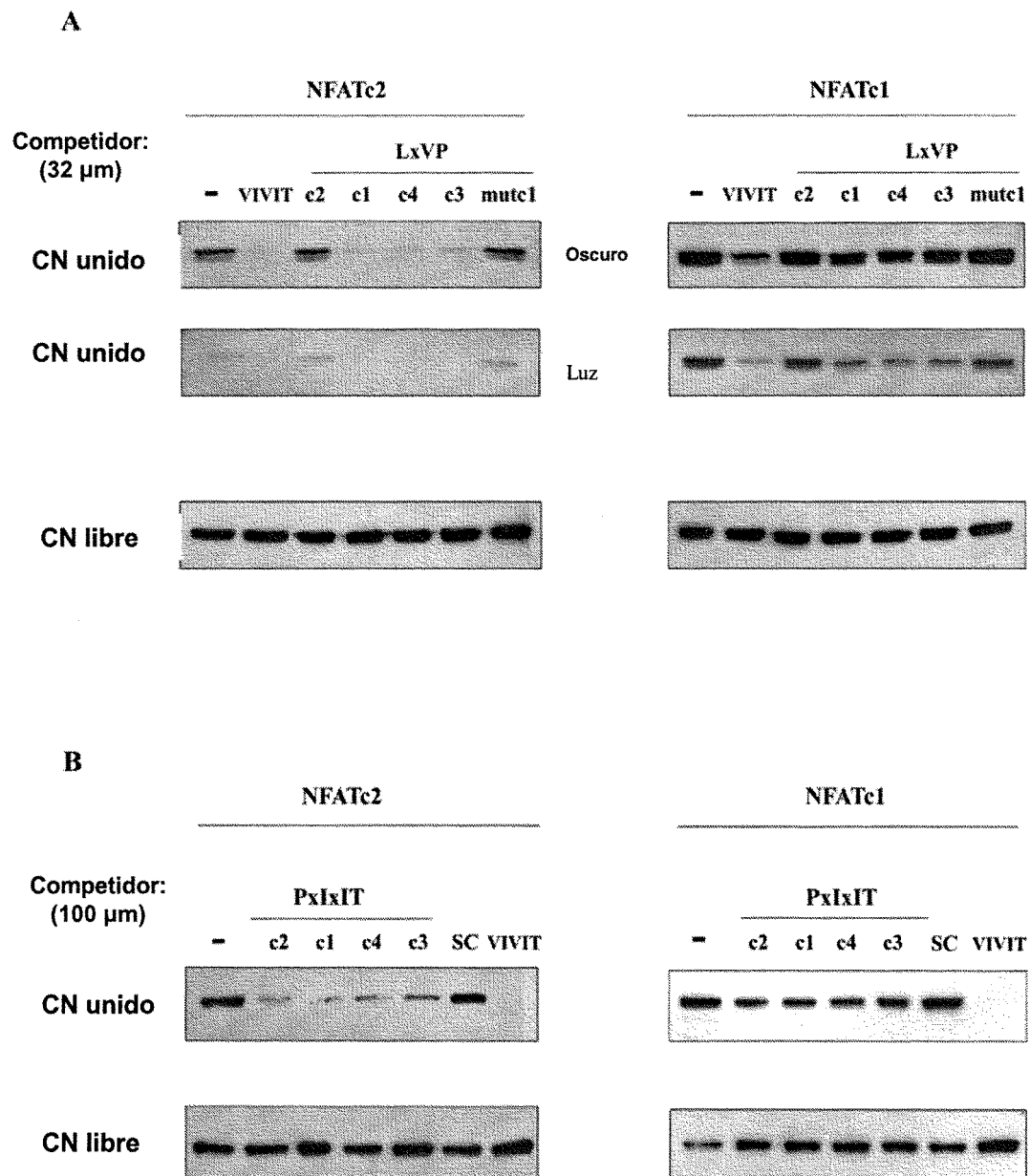


FIG. 6

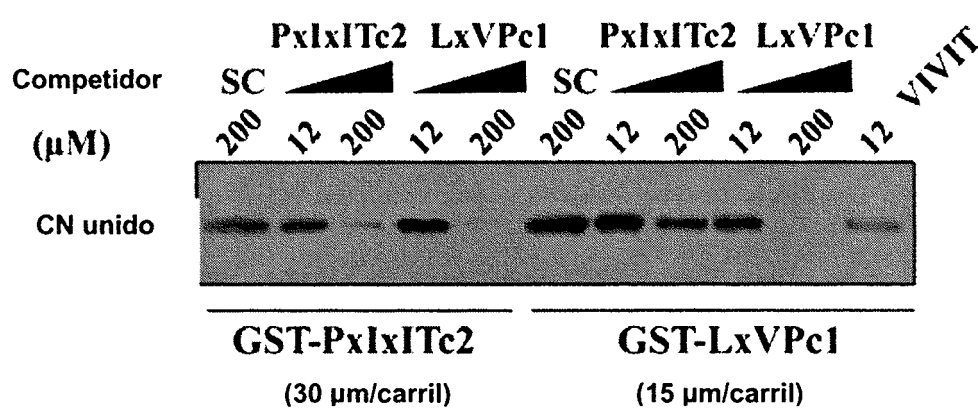


FIG. 7

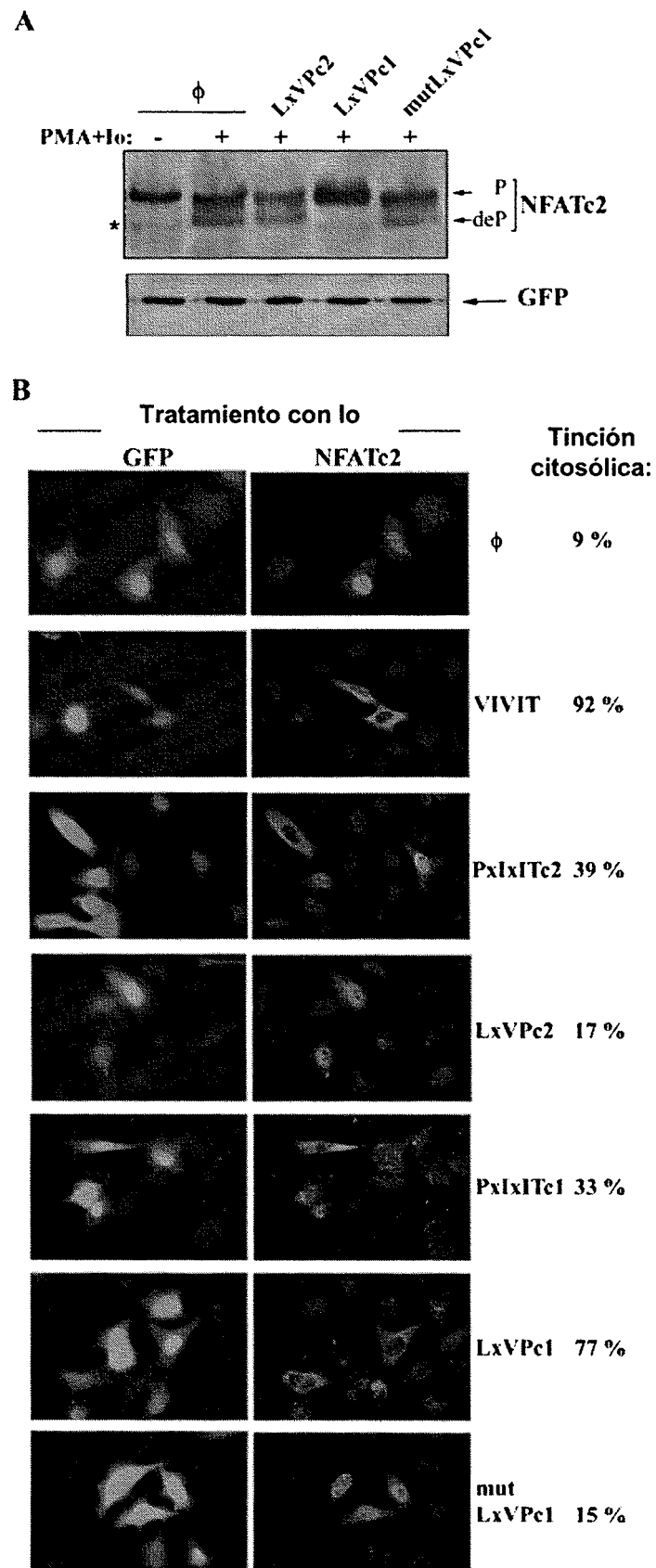


FIG. 8

ES 2 327 694 A1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> CSIC/CNIC	
5	<120> Péptidos inhibidores selectivos de la actividad biológica de la Calcineurina	
	<130> Csic/Cnic	
10	<160> 23	
	<170> PatentIn version 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 62	
	<212> DNA	
	<213> VIVITfw	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(62)	
25	<223> Secuencia nucleotídica codificante del peptido Vivit	
	<400> 1	
30	tcgagcatgg caggtccaca tccagtcac gtatcacccg gtccacatga ggaaggcgga	60
	cc	62
35	<210> 2	
	<211> 62	
	<212> DNA	
40	<213> VIVITrev	
	<220>	
	<221> misc_feature	
45	<222> (1)..(62)	
	<223> Secuencia nucleotídica complementaria del peptido Vivit	
50	<400> 2	
	catgggtccg ccttcctcat gtggaccggt gataacgatg actggatgtg gacctgcat	60
55	gc	62
	<210> 3	
60	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> PxlITc1fw	
65	<220>	
	<221> misc_feature	

ES 2 327 694 A1

<222> (1)..(63)

<223> Secuencia Nucleotídica codificante del peptido PxiITc1

5 <400> 3

agcttgcca ccatgccggc gttggaaagc ccacggatag agattacgag ttgcttggga 60

10 ttg 63

<210> 4

15 <211> 63

<212> DNA

<213> PxiITc1rev

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(63)

25 <223> Secuencia nucleotídica complementaria del peptido PxiITc1

<400> 4

30 gatccaatcc caagcaactc gtaatctcta tccgtgggct ttccaacgcc ggcatggtgg 60

cca 63

35

<210> 5

<211> 53

<212> DNA

40 <213> LxVPc1fw

<220>

<221> misc_feature

45 <222> (1)..(53)

<223> Secuencia nucleotídica codificante del peptido LxVPc1

<400> 5

50

tcgagcgatc agtacttggc cgtaccacag catccgtatc aatgggctaa ggg 53

55 <210> 6

<211> 53

<212> DNA

60 <213> LxVPc1rev

<220>

<221> misc_feature

65 <222> (1)..(53)

<223> Secuencia nucleotídica complementaria del peptido LxVPc1

ES 2 327 694 A1

	<400> 6	
5	aattccetta gccattgat acggatgctg tggtagggcc aagtactgat cgc	53
	<210> 7	
	<211> 60	
10	<212> DNA	
	<213> mutLcVPc1fw	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(60)	
	<223> Secuencia nucleotídica codificante del peptido mutLxVPc1	
20	<400> 7	
25	agcttggcca ccatggatca gtatgctggca gctgcccagc atccgatca atgggcgaag	60
	<210> 8	
	<211> 60	
	<212> DNA	
30	<213> mutLxVPc1rev	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(60)	
	<223> Secuencia nucleotídica complementaria del peptido mutLxVPc1	
40	<400> 8	
45	gaccttgcg ccatggatc ggatgctggg cagctgccgc atactgatcc atggtggcca	60
	<210> 9	
	<211> 63	
	<212> DNA	
50	<213> PxIxITc2fw	
	<220>	
55	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(63)	
	<223> Secuencia nucleotídica codificante del peptido PxIxITc2	
60	<400> 9	
65	gatctgccac catggcgagt ggggtgagcc cgaggataga gataacgccg agtcatgagt	60
	tag	63

ES 2 327 694 A1

<210> 10
 <211> 63
 <212> DNA
 5 <213> PxlITc2rev
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(63)
 <223> Secuencia nucleotídica complementaria del peptido PxlITc2
 <400> 10
 15
 gatcctaact catgactcgg cgttatctct atcctcgggc tcaacccaact cgccatgggtg 60
 20 gca 63
 <210> 11
 <211> 60
 25 <212> DNA
 <213> LxVPc2fw
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(60)
 <223> Secuencia nucleotídica codificante del peptido LxVPc2
 30
 35 <400> 11
 40 agcttggcca ccatggagag catcctgcta gtacctccga cctggcctaa gccgttgggtg 60
 <210> 12
 <211> 60
 45 <212> DNA
 <213> LxVPc2rev
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(60)
 <223> Secuencia nucleotídica complementaria del peptido LcVPc2
 50
 55 <400> 12
 60 gatccaccaa cggcttaggc caggtcggag gtactagcag gatgctctcc atggtggcca 60
 <210> 13
 <211> 16
 65 <212> PRT
 <213> VIVIT

ES 2 327 694 A1

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(16)
 5 <223> Secuencia aminoacídica del peptido Vivit

 <400> 13

 10 Met Ala Gly Pro His Pro Val Ile Val Ile Thr Gly Pro His Glu Glu
 1 5 10 15

 15 <210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> PxIxITc1ç

 <220>
 <221> PEPTIDE
 25 <222> (1)..(16)
 <223> Secuencia aminoacídica del peptido PxIxITc1

 <400> 14
 30

 Pro Ala Leu Glu Ser Pro Arg Ile Glu Ile Thr Ser Cys Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 35

 <210> 15
 <211> 16
 40 <212> PRT
 <213> PxIxITc2

 <220>
 45 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(16)
 <223> Secuencia aminoacídica del peptido PxIxITc2

 50 <400> 15

 Ala Ser Gly Leu Ser Pro Arg Ile Glu Ile Thr Pro Ser His Glu Leu
 55 1 5 10 15

 <210> 16
 60 <211> 16
 <212> PRT
 <213> PxIxITc3

 65 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(16)

ES 2 327 694 A1

<223> Secuencia aminoacídica del peptido PxIxITc3

<400> 16

5

Lys Pro Phe Glu Cys Pro Ser Ile Gln Ile Thr Ser Ile Ser Pro Asn
1 5 10 15

10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

15

<213> PxIxITc4

<220>

<221> PEPTIDE

20

<222> (1)..(16)

<223> Secuencia aminoacídica del peptido PxIxITc4

<400> 17

25

Arg Val Leu Glu Cys Pro Ser Ile Arg Ile Thr Ser Ile Ser Pro Thr
1 5 10 15

30

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

35

<213> LxVPc1

<220>

40

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(15)

<223> Secuencia aminoacídica del peptido LxVPc1

45

<400> 18

Asp Gln Tyr Leu Ala Val Pro Gln His Pro Tyr Gln Trp Ala Lys
1 5 10 15

50

<210> 19

55

<211> 15

<212> PRT

<213> mutLxVPc1

60

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(15)

65

<223> Secuencia aminoacídica del peptido mutLxVPc1

ES 2 327 694 A1

<400> 19

Asp Gln Tyr Ala Ala Ala Ala Gln His Pro Tyr Gln Trp Ala Lys
1 5 10 15

 $\langle 210 \rangle$ 20

10 $\langle 211 \rangle$ 15

<212> PRT

<213> LxVPc2

15 $\langle 220 \rangle$

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(15)

20 <223> Secuencia aminoacídica del peptido LxVPc2

 $\langle 400 \rangle$ 20

25
Glu Ser Ile Leu Leu Val Pro Pro Thr Trp Pro Lys Pro Leu Val
1 5 10 15

30 $\langle 210 \rangle$ 21

<211> 15

<212> PRT

35 <213> LxVPc3

 $\langle 220 \rangle$

<221> PEPTIDE

40 <222> (1)..(15)

<223> Secuencia aminoacídica del peptido LxVPc3

<400> 21

45
Asp Gln Phe Leu Ser Val Pro Ser Pro Phe Thr Trp Ser Lys Pro
1 5 10 15

50
<210> 22

<211> 15

55 <212> PRT

<213> LxVPc4

 $\langle 220 \rangle$

60 <221> PEPTIDE

<222> (1)..(15)

<223> Secuencia aminoacídica del peptido LxVPc4

65

ES 2 327 694 A1

<400> 22

5 Met Asp Tyr Leu Ala Val Pro Ser Pro Leu Ala Trp Ser Lys Ala
1 5 10 15

<210> 23

10 <211> 16

<212> PRT

<213> SCRAMBLED

15 $\langle 220 \rangle$

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(16)

<223> Secuencia aminoacídica del peptido scrambled

<400> 23

25 Met Val Gly Ile Pro Val Ala Ile His Gly Thr Pro Pro His Glu Glu
1 5 10 15

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 327 694

⑫ Nº de solicitud: 200503237

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 29.12.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LIU, J. et al. "Inhibition of NFATx activation by an oligopeptide: Disrupting the interaction of NFATx with Calcineurin". JOURNAL OF IMMUNOLOGY. 01.09.2001. Vol. 167, nº 5, páginas 2694-2699; todo el documento, especialmente Fig. 1, péptido Pep3.	1,2,6-13, 17,18
X	PARK, S. et al. "A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain". PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 20.06.2000. Vol. 97, nº 13, páginas 7130-7135; todo el documento, especialmente Fig. 2b.	1,2,6-13, 17,18
X	US 6352830 B1 (CRABTREE, G.R. et al.) 05.03.2002, todo el documento, especialmente SEQ ID nº 38,45,46; reivindicaciones.	1-3,6-18
X	US 6780597 B1 (ARAI, K. et al.) 24.08.2004, todo el documento, especialmente SEQ ID nº 2,4-7,10,11; reivindicaciones.	1,2,4,6-18
X	WO 03074007 A2 (RIGEL PHARMACEUTICALS, INC.) 12.09.2003, figuras 5-6.	1,2,5-18

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

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:

Fecha de realización del informe

10.05.2007

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)