



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 326 348**

② Número de solicitud: 200602025

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/522 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A2

② Fecha de presentación: **27.07.2006**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.2009**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.10.2009

⑥ Número de la solicitud inicial: **200500953**

⑦ Solicitante/s: **Universidad Autónoma de Madrid
Ciudad Universitaria Canto Blanco
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Valenzuela Fernández, Agustín;
Cabrero García, José Román;
Naranjo Suárez, Salvador;
Gordón Alonso, Mónica;
Barrero Villar, Marta y
Sánchez-Madrid, Francisco**

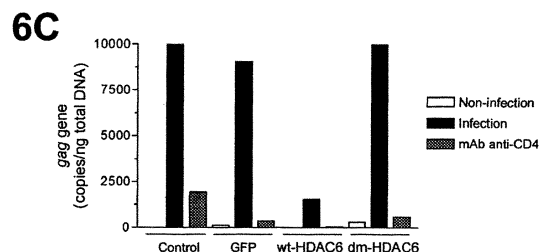
⑦ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑤ Título: **Uso de compuestos agonistas de la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6 en la elaboración de composiciones farmacéuticas, dichas composiciones farmacéuticas y sus aplicaciones en el tratamiento de infecciones virales.**

⑦ Resumen:

Uso de compuestos agonistas de la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6 en la elaboración de composiciones farmacéuticas, dichas composiciones farmacéuticas y sus aplicaciones en el tratamiento de infecciones virales.

La presente invención se basa en el hecho de que el equilibrio de la acetilación/desacetilación de los microtúbulos es clave para modular la entrada de virus fusogénicos en las células eucariotas, preferentemente la entrada del virus VIH-1 en las células T, y que está regulado por la proteína HDAC6, lo que permite definir nuevas aproximaciones terapéuticas para la profilaxis y tratamiento de infecciones virales. Estas aproximaciones terapéuticas se basan en el uso de compuestos activadores de la actividad de dicha proteína HDAC6 y de las composiciones farmacéuticas que los contienen en métodos de tratamiento de dichas infecciones virales.



ES 2 326 348 A2

DESCRIPCIÓN

Uso de compuestos agonistas de la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6 en la elaboración de composiciones farmacéuticas, dichas composiciones farmacéuticas y sus aplicaciones en el tratamiento de infecciones virales.

La presente invención se basa en el hecho de que el equilibrio de la acetilación/desacetilación de los microtúbulos es clave para modular la entrada de virus fusogénicos en las células eucariotas, preferentemente la entrada del virus VIH-1 en las células T, y que está regulado por la proteína HDAC6, lo que permite definir nuevas aproximaciones terapéuticas para la profilaxis y tratamiento de infecciones virales. Estas aproximaciones terapéuticas se basan en el uso de compuestos activadores de la actividad de dicha proteína HDAC6 y de las composiciones farmacéuticas que los contienen en métodos de tratamiento de dichas infecciones virales.

Sector de la técnica

La presente invención se enmarca en el desarrollo de nuevas composiciones farmacéuticas para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades provocadas por virus fusogénicos, y más preferentemente por el virus VIH-1. Por lo tanto, debe adscribirse al sector farmacológico y biomédico de las enfermedades virales.

Estado de la técnica

El proceso de infección de células eucariotas por virus con envoltura o fusogénicos requiere de la fusión de las membranas plasmática o endosomal de la célula huésped con la viral. Esta reacción está catalizada por proteínas específicas de la envoltura del virus, denominadas proteínas de fusión, que permiten sobrepasar las barreras energéticas del proceso. Por ejemplo, la penetración de Retrovirus en células permisivas para la infección puede ocurrir por fusión de membrana de forma dependiente o independiente del pH. El primer caso es propio del virus de la gripe (T. Stegmann, A. Helenius. *Influenza Virus Fusion: from models toward a mechanism*, in: J. Bentz (Ed.). *Viral Fusion Mechanisms*, CRC Press, Boca Raton, FL (1993, pp. 89-111)), del virus Semliki Forest (R. Bron, *et al.*, 1993. *EMBO J.* 12: 693-701), y el segundo caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y simios (SIV) (M.O. McClure, *et al.*, 1988. *EMBO J.* 7: 513-518) o del virus Sendai (D. Hoekstra *et al.*, 1985. *Biochemistry* 24: 4739-4745). Hay que destacar que ambos procesos son mecanísticamente similares, salvo que la fusión de membrana tiene lugar en endosomas o en la superficie de la célula diana, respectivamente (I. Martín, *et al.*, 1999. *Advance Drug Delivery Reviews* 38: 233-255). Durante el proceso de fusión las proteínas virales de fusión interaccionan simultáneamente con las membranas celular y viral, favoreciendo la formación del poro de fusión (T.H. Sollner, 2004. *Current Opinión in Cell Biology* 16: 429-435). La mayoría de las proteínas virales de fusión que se conocen interaccionan con la envoltura viral a través de su dominio de transmembrana, que conecta la región intraviral (o citoplasmática, en las células infectadas) con el ectodominio de la proteína de fusión. Por otra parte, se acepta que la interacción de la proteína de fusión viral con la membrana de la célula diana involucra un dominio altamente hidrofóbico, de unos 15 residuos aminoacídicos, denominado péptido de fusión (S.G. Peisajovich, *et al.*, 2003. *BBA* 1614: 122-129). Este segmento se encuentra localizado en la región N-terminal de las proteínas de fusión, como ocurre en la mayoría de los ortomixovirus, paramixovirus y otros retrovirus relacionados (J. White *et al.*, 1983. *Q. Rev. Biophys.* 16: 151-195; B.M. Blumberg *et al.*, 1985. *J. Gen. Virol.* 66: 317-331; W.R. Gallaher. 1987. *Cell* 50: 327-328), o en el interior del ectodominio de la proteína de fusión como en los casos del virus del Sarcoma de Rous (E. Hunter *et al.*, 1983. *J. Virol.* 46: 920-936), del virus de la Estomatitis Vesicular (M.A. Whitt, *et al.*, 1990. *J. Virol.* 64: 4907-4913) y del virus Ébola (W.R. Gallaher. 1996. *Cell* 85: 477-478). Generalmente, se acepta que cada proteína de fusión viral contiene un único péptido de fusión, el cual es responsable directo de la desestabilización de la membrana celular e iniciador de la formación del poro de fusión, aunque no se puede obviar la participación de otras regiones de las proteínas de fusión viral en la formación del poro de fusión (S.G. Peisajovich, *et al.*, 2003. *BBA* 1614: 122-129).

Las proteínas de fusión se clasifican en dos grupos principales: Tipo I (ej. Virus de la gripe, ébola, HIV y Measles) y tipo II (virus del Dengue, de la fiebre amarilla y de la encefalitis) (Revisiones en, T.H. Sollner. 2004. *Current Opinión in Cell Biology* 16: 429-435; A.E. Smith and A. Helenius, 2004. *Science* 304: 237-242). Las proteínas de Tipo I consisten en glucoproteínas que se ensamblan en homotrímeros, los cuales se asocian entre sí a través de estructuras alargadas con forma de espiral enrollada, en cuya región N-terminal se localiza el péptido de fusión. La liberación de energía que se produce durante la inserción del péptido en la membrana celular, permite la aproximación de las membranas viral y celular de forma focalizada, generándose el poro de fusión (Revisión en, A.E. Smith and A. Helenius, 2004. *Science* 304: 237-242). Las proteínas de Tipo II son propias de Flavivirus y virus alfa (Revisión en, A.E. Smith and A. Helenius, 2004. *Science* 304: 237-242), se caracterizan por poseer secuencias de fusión internas, y se sintetizan y ensamblan en la superficie viral como heterodímeros con otras proteínas de membrana. A pH bajo, se produce un cambio en la estructura cuaternaria de los heterocomplejos, permitiendo la disociación de la proteína de fusión viral del heterodímero, y favoreciendo la reagrupación entre sí de las proteínas de fusión para formar homotrímeros activos y funcionales (Revisión en, A.E. Smith and A. Helenius, 2004. *Science* 304: 237-242).

Por otro lado, el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (F. Barre-Sinoussi, *et al.*, 1983. *Science* 200:868-871). El VIH de tipo 1 (HIV-1) infecta principalmente células CD4+ como linfocitos T, monocitos y células dendríticas, a nivel de los órganos linfoides y las mucosas de las regiones de entrada viral (A.S. Fauci, 1988. *Science* 239: 617-622; S. Patterson, *et al.*, 1994. *Res. Virol.* 145: 171-176). La infección por VIH-1 necesita de una interacción de alta afinidad entre las glucoproteínas

de la envuelta del virus, gp120/gp41, con el receptor CD4 (A.G. Dalgleish, *et al.*, 1984. *Nature* 312: 763-767; P.J. Maddon, *et al.*, 1986. *Cell* 47: 333-348) y requiere además de la asociación con receptores de quimiocinas, principalmente CCR5 (H. Choe, *et al.*, 1996. *Cell* 85: 1135-1148; H. Deng, *et al.*, 1996. *Nature* 381: 661-666; T. Dragic, *et al.*, 1996. *Nature* 381: 667-673) y CXCR4 (Y. Feng, *et al.*, 1996. *Science* 272: 872-877), denominados co-receptores. Así, se ha propuesto que la unión secuencial de la proteína viral gp120 con CD4, y con uno de los co-receptores, induce cambios conformacionales específicos en gp41, permitiendo así la fusión viral con la membrana plasmática celular y la formación del poro de fusión (H. Choe, *et al.*, 1996. *Cell* 85: 1135-1148). El co-receptor utilizado por el VIH-1 determina el tropismo de la cepa viral. En consecuencia, los virus que utilizan el receptor CCR5 se denominan R5 trópicos y los que utilizan CXCR4, X4 trópicos (E.A. Berger, *et al.*, 1999. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 657-700).

Desde un punto de vista clínico, los virus VIH-1 R5 infectan monocitos y macrófagos, y se implican en la transmisión horizontal (M.T. Roos, *et al.*, 1992. *J. Infect. Dis.* 165: 427-432) y vertical (G. Scarlatti, *et al.*, 1993. *Virology* 197: 624-629) del virus, prevaleciendo en la fase seropositiva asintomática de la enfermedad. En etapas avanzadas de la enfermedad, los virus VIH-1 X4, que infectan principalmente linfocitos T CD4 (E.A. Berger, *et al.*, 1999. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 657-700), se convierten en la cepa predominante, detectándose en un 50% de los enfermos infectados por el VIH-1 (M. Tersmette, *et al.*, 1988. *J. Virol.* 62: 2026-2032; R.I. Connor, *et al.*, 1997. *J. Exp. Med.* 185:621-628). La fase de progresión de la enfermedad se caracteriza, además, por un aumento de la carga viral (viremia) y una disminución rápida y dramática de linfocitos T CD4+ (G. Pantaleo and A.S. Fauci, 1996. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 825-854), que se relaciona con el colapso general del sistema inmune, y se considera factor clave en la evolución del SIDA (J.D. Lifson, *et al.*, 1986. *Science* 232: 1123-1127; H. Blaak, *et al.*, 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 1269-1274).

El tejido linfoide, en el cual se localizan células inmunocompetentes activadas y permisivas para la infección por el VIH-1, representa unos de los principales reservorios del VIH-1 y un entorno favorable para la replicación viral. Durante los procesos de presentación del antígeno los contactos célula infectada-célula huésped se favorecen. Esto deriva en la fusión celular, generándose células gigantes multinucleadas (sincitios), y favoreciéndose la propagación viral. Las células infectadas fusionadas mueren por apoptosis, rápidamente después de su formación. Este proceso se relaciona con la degeneración del entorno linfoide, la depleción dramática de células T CD4+, y se asocia con la aparición de cepas VIH-1 X4 trópicas (A.S. Fauci, 1996. *Nature* 384: 529-539; A.B. Van't Wout, *et al.*, 1998. *J. Virol.* 72: 5099-5107). La fusión y muerte de las células infectadas, conjuntamente con la lisis de células individuales, se consideran los efectos citopáticos agudos del VIH (D.D. Ho, *et al.*, 1995. *Nature* 373: 123-126; X. Wei, *et al.*, 1995. *Nature* 373: 117-122).

El proceso de fusión e infección de células T CD4+ por el virus VIH-1 se establece por interacción cooperativa de la proteína viral gp120, asociada no covalentemente a la proteína viral de transmembrana gp41, con el receptor CD4 y el correceptor CXCR4 ó CCR5 de la célula diana (R.W. Doms, 2000. *Virology* 276: 229-37; S.E. Kuhmann, *et al.*, 2000. *J. Virol.* 74: 7005-15). Durante esta primera etapa de interacción virus-célula, el VIH induce la codistribución y/o asociación del receptor CD4 con el correceptor CXCR4 ó CCR5, en las zonas de contacto entre el virus y la célula diana. En consecuencia, el bloqueo de la codistribución de los receptores CD4 y CXCR4/CCR5 dificulta la formación del poro de fusión, inhibiendo las etapas de fusión y entrada viral (D.S Dimitrov, *et al.*, 1999. *Virology* 259:1-6). Más concretamente, distintos estudios sugieren que cada trímero de Env del virus VIH-1 interactúa con múltiples moléculas de CD4, CXCR4 o CCR5 (H. Choe, *et al.*, 1996. *Cell* 85: 1135-1148) y que son necesarios varios trímeros para la formación del poro de fusión (S.E. Kuhmann, *et al.*, 2000. *J. Virol.* 74: 7005-7015). La fusión de las membranas celular y viral, regida en último término por la proteína gp41, implica necesariamente la reorganización del citoesqueleto de la célula diana, modificaciones de la morfología celular y la inducción de señales celulares.

Sin embargo, y aunque hay evidencias de la importancia del citoesqueleto para la infección viral, existen pocos datos sobre los procesos de reorganización del mismo que tienen lugar durante la infección por VIH-1. Por otro lado, los componentes celulares del citoesqueleto están implicados en los eventos tempranos durante la infección por distintos virus, regulando la entrada del virus y la liberación de su genoma así como promoviendo el movimiento de las cápsidas virales y la integración del genoma viral. Así, los citoesqueletos de actina y tubulina deben estar intactos para una entrada eficaz del virus del herpes simple y del virus simio 40, respectivamente (H. Deng, *et al.*, 1996. *Nature* 381: 661-666; T. Dragic, *et al.*, 1996. *Nature* 381: 667-673). En el caso del virus VIH-1, se ha descrito que la infección y la fusión con la célula huésped pueden ser completamente inhibidas mediante la disrupción de la red de actina (Y. Feng, *et al.*, 1996. *Science* 272: 872-877; E.A. Berger, *et al.*, 1999. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 657-700), probablemente mediante la interferencia de la co-localización de los receptores CD4 y CXCR4 (Y. Feng, *et al.*, 1996. *Science* 272: 872-877). En esta línea, se ha descrito además que la actina y la tubulina del citoesqueleto están implicadas en la transmisión y secreción del virus VIH-1 (R. Pearce-Pratt, *et al.*, 1994. *J. Virol.* 68: 2898-2905; C. Jolly, *et al.*, 2004. *J. Exp. Med.* 199: 283-293).

Por tanto, los eventos moleculares que tienen lugar durante la fusión celular y la formación del poro de fusión mediada por el virus VIH-1 son fenómenos claves en el proceso infeccioso de dicho virus y del desarrollo de la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA). Sin embargo, existe un número de aspectos aun desconocidos del proceso de fusión que tiene lugar en un proceso infeccioso entre un virus y su célula huésped, y más preferentemente del proceso infeccioso del virus VIH-1, y del papel del citoesqueleto en este proceso. De igual forma, tampoco existe mucha información de cómo se puede producir la regulación del proceso infeccioso del virus VIH-1 mediante la interferencia en el estado dinámico de la membrana plasmática de la célula huésped, aunque se ha observado que la Env del virus VIH-1 induce la reorganización del citoesqueleto de actina vía Rac-1 (S.E. Pontow, *et al.*, 2004. *J. Virol.* 78: 7138-7147).

Por otro lado, la unión del citoesqueleto a la membrana plasmática celular proporciona un mecanismo de soporte a dicha membrana que regula su rigidez, fortaleza y elasticidad (J. Dai and M.P. Sheetz, 1999. *Biophys. J.* 77: 3363-3370). La asociación entre la membrana celular y el citoesqueleto es compleja e incluye interacciones del citoesqueleto con proteínas y lípidos de la membrana. La α -tubulina acetilada constituye la forma hidrofóbica de la tubulina que se asocia predominantemente a la membrana (M. Nunez-Fernandez, *et al.*, 1997. *Mol. Cell Biochem.* 170: 91-98) por su directa interacción con la proteína ubicua de la superficie celular Na⁺, K⁺-ATPasa (C.H. Casale, *et al.*, 2003. *FEBS Lett.* 534: 115-118).

Resultados experimentales indican que la acetilación de microtúbulos cortos corticales, de la α -tubulina, está directamente involucrada en el control de la dinámica de la membrana plasmática, y de la migración celular (C. Gubert, *et al.*, 2002. *Nature* 417: 455-458), así como en la estabilización de las diferentes estructuras intracelulares (B.J. Jamin, *et al.*, 1990. *Nature* 344: 673-675). Además, La proteína α -tubulina acetilada está implicada en la estabilidad y funcionalidad de los microtúbulos (G. Piperno, *et al.*, 1987. *J. Cell Biol.* 104: 289-302). Los microtúbulos estables regulan el plegamiento de la membrana plasmática dependiente de actina y la movilidad celular mediante la activación de Rac-1 (C.M. Waterman-Storer, *et al.*, 1999. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 61-67) ó Rho (G. Piperno, *et al.*, 1987. *J. Cell Biol.* 104: 289-302).

La acetilación de la proteína α -tubulina se encuentra bajo el control de la enzima histona desacetilasa 6 (HDAC6) (C. Hubbert, *et al.*, 2002. *Nature* 417: 455-458; A. Matsuyama, *et al.*, 2002. *EMBO J.* 21: 6820-6831), perteneciente a la clase II de la familia de proteínas HDACs, la cual se localiza principalmente en el citoplasma de las células eucariotas, y es inhibida por tricostatina (TSA) (C. Hubbert, *et al.*, 2002. *Nature* 417: 455-458; A. Matsuyama, *et al.*, 2002. *EMBO J.* 21: 6820-6831) y tubacina (S.J Haggarty, *et al.*, 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4389-4394).

Recientemente, se ha descrito que la enzima HDAC6, a través de su actividad tubulina desacetilasa, controla la organización en la membrana celular de los receptores de superficie CD3 y LFA-1, la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y la activación de los linfocitos T (J.M. Serrador, *et al.*, 2004. *Immunity* 20: 417-28).

Sin embargo, el papel de la proteína tubulina del citoesqueleto cortical de la célula huésped sobre la capacidad de fusión viral y la formación del poro de fusión es desconocido. Mas aún, no hay datos disponibles sobre la posible implicación de las formas acetiladas de α -tubulina en la infección y fusión del virus VIH-1.

Descripción de la invención

La presente invención se basa en el hecho de que el equilibrio de la acetilación/desacetilación de los microtúbulos es clave para modular la entrada de virus fusogénicos en las células eucariotas, preferentemente la entrada del virus VIH-1 en las células T, y que está regulado por la proteína HDAC6, lo que permite definir nuevas aproximaciones terapéuticas para la profilaxis y tratamiento de enfermedades provocadas por virus fusogénicos, preferentemente provocada por el virus de inmunodeficiencia humana adquirida (VIH-1). Estas aproximaciones terapéuticas se basan en el uso de compuestos activadores de la actividad de dicha proteína HDAC6 y de las composiciones farmacéuticas que los contienen.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente regulador, preferentemente un activador, inductor o agonista de la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6 en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para la profilaxis y tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías de mamíferos, ya sean humanos u otros animales, provocadas por por la entrada e infección de células eucariotas por un virus fusogénico.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con la entrada e infección de un virus fusogénico en una célula eucariota, preferentemente en células humanas, y más preferentemente en linfocitos T que comprende un compuesto ó agente activador de la proteína HDAC6, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables y que es capaz de inhibir la entrada de dicho virus en la célula eucariota. Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la presente invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología provocada por la infección de un virus fusogénico consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que modifica el estado de acetilación de la tubulina y que actúa inhibiendo la entrada del virus en el interior de la célula.

Descripción detallada

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas herramientas eficaces para la identificación de nuevos compuestos farmacéuticos y nuevas terapias para la profilaxis y el tratamiento de infecciones virales, preferentemente de virus fusogénicos, y más preferentemente del virus VIH-1.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los resultados descritos demuestran que la acetilación/desacetilación de la proteína α -tubulina representa un regulador clave de la susceptibilidad de las células eucariotas huésped para fusionarse -formación del poro de fusión- y ser infectadas por un virus fusogénico, sin afectar a la

expresión y distribución en la superficie celular de los receptores implicados en la fase de reconocimiento específico del proceso infectivo de la célula huésped, en concreto, la infección del linfocito T por el virus VIH-1 a través de receptores CD4, CCR5 y CXCR4. Este hecho indica que dicha vía de regulación de los mecanismos generales de fusión de membrana inherentes al mecanismo de fusión de toda una serie de virus con envoltura, a través de la enzima HDAC6, es clave para permitir la infección de células eucariotas por estos virus fusogénicos.

En la presente invención, la estabilización de la acetilación de la proteína α -tubulina se obtuvo mediante el silenciamiento de la expresión de la enzima HDAC6 utilizando RNAs de interferencia (siRNA) o mediante su inhibición química (TSA). Hay que resaltar que aunque el compuesto TSA puede inhibir otras HDACs nucleares, otros inhibidores químicos de amplio espectro como el butirato sódico (NaBut) o trapoxina B no afectan a la actividad tubulina desacetilasa HDAC6 (C. Gubert, 2002. Nature 417:455-458). Así, la cuantificación de la proteína α -tubulina acetilada en presencia de TSA en comparación con NaBut, permite monitorizar el efecto de la inhibición específica de la actividad tubulina desacetilasa de la enzima HDAC6. Cabe destacar que la estabilización de la α -tubulina acetilada mediante la inhibición del enzima HDAC6 se asoció fuertemente con una mayor capacidad de las células a fusionarse y a ser infectadas por el virus VIH-1.

Por el contrario, las células diana que sobre-expresan la forma activa “wild-type” (wt) de la enzima HDAC6, acopladas o no a la proteína verde GFP, presentaron unos niveles reducidos de α -tubulina acetilada al igual que una menor susceptibilidad para fusionarse y para ser infectadas con el virus VIH-1, sugiriendo que la acetilación de α -tubulina puede regular la deformabilidad de la membrana celular. Sin embargo, la sobre-expresión de la forma activa (wt) de HDAC6 no alteró la expresión de CD4 ni de CXCR4, ni tampoco su distribución en los pseudópodos inducidos por VIH-1. Además, la redistribución de la enzima HDAC6 en la región de agrupamiento CXCR4/CD4 disminuye la cantidad de α -tubulina acetilada en las áreas de contacto célula/virus VIH-1, tal como se ha observado en el presente trabajo, pudiendo estar asociado con una menor deformabilidad de la membrana por el virus VIH-1. Por lo tanto, se propone que la conexión entre la membrana plasmática y la proteína α -tubulina acetilada se encuentra influenciada por la actividad de la enzima HDAC6, regulando la dinámica y elasticidad de la membrana plasmática, y, por tanto, influye fuertemente en la capacidad de fusión de las proteínas virales con sus células huésped, y en concreto de las proteínas Env gp41/gp120 del virus HIV-1 con el linfocito T.

Como la enzima HDAC6 es reclutada en las áreas de contacto célula/virus, la sobre-expresión de esta enzima puede representar un mecanismo celular de protección frente a la infección del virus VIH-1, al alterar la acumulación de la proteína α -tubulina acetilada en las áreas de contacto célula/VIH-1. Es por tanto plausible que el efecto negativo de la enzima HDAC6 en la fusión e infección del virus VIH-1 fuera más relevante cuanto mayor cantidad de proteína HDAC6 es expresada en las células huésped, la cual podría actuar fácilmente en las formas acetiladas de α -tubulina que se concentran en las áreas de contacto célula/VIH-1. A este respecto, las zonas ricas (“hot spots”) generadas por la acción del VIH-1, donde se asocian CD4 y el co-receptor, no contenían α -tubulina acetilada en las células que sobre-expresan la enzima activa HDAC6.

Teniendo en cuenta todas estas evidencias experimentales, puede postularse que la inhibición de la enzima HDAC6 representa un mecanismo putativo para la regulación positiva de la capacidad de fusión de las proteínas gp41/gp120, la cual podría ser dependiente de la capacidad de la membrana celular del huésped a ser deformable, y directamente relacionada con el estado del citoesqueleto cortical de tubulina. En este modelo, la tubulina está implicada en la infección por VIH-1 en las etapas iniciales de la infección, cuando la proteína α -tubulina acetilada confiere a la membrana celular el estado dinámico necesario para la fusión entre la membrana celular-virus.

En resumen, la presente invención se basa en el hecho de que el equilibrio de la acetilación/desacetilación de los microtúbulos es clave para modular la entrada de virus fusogénicos en las células eucariotas, preferentemente la entrada del virus VIH en las células T, y que está regulado por la proteína HDAC6, lo que permite definir nuevas aproximaciones terapéuticas para la profilaxis y tratamiento de enfermedades provocadas por virus fusogénicos, preferentemente provocada por el virus de inmunodeficiencia humana adquirida (VIH-1). Estas aproximaciones terapéuticas se basan en el uso de compuestos activadores de la actividad de dicha proteína HDAC6 y de las composiciones farmacéuticas que los contienen.

Los compuestos activadores o agonistas de HDAC6 podrían impedir la fusión y entrada de virus fusogénicos en células eucariotas, preferentemente la fusión y entrada del virus VIH-1 en los linfocitos T. En este sentido, además, la tecnología de transferencia génica podría, mediante vectores adecuados, ser de utilidad en un procedimiento de tratamiento de terapia génica para expresar, preferentemente de forma tejido-específica, el enzima HDAC6 en los linfocitos T de pacientes que sufren este tipo de enfermedades.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente regulador, preferentemente un activador, inductor o agonista de la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6, en adelante uso de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para la profilaxis y tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías de mamíferos, ya sean humanos u otros animales, provocadas por la entrada e infección de células eucariotas por un virus fusogénico.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto/agente activador o agonista” se refiere a una molécula que cuando se une o interactúa con la proteína HDAC6, o con fragmentos funcionales de la misma, incrementa la intensidad o prolonga la duración de la actividad biológica de dicha proteína. En esta definición se incluye

además aquellos compuestos o moléculas que permiten incrementar la expresión del gen codificante de la proteína HDAC6, ya sea la forma endógena existente de forma natural en una célula o una forma exógena que se introduce artificialmente en dicha célula. Un agente activador puede estar constituido por un péptido, una proteína, un ácido nucleico, carbohidratos, un anticuerpo, un compuesto químico, o cualquier otro tipo de molécula que incremente el efecto y/o la duración de la actividad de la proteína HDAC6.

Tal y como se utiliza en la presente invención el término “virus fusogénico” se refiere a un virus que infecta células eucariotas, preferentemente de mamíferos humanos y no humanos, mediante la fusión de la membrana plasmática o endosomal de dicha célula huésped y la envoltura viral perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, al siguiente grupo: el virus de la gripe (Revisión en, T. Stegmann and A. Helenius. *Influenza virus fusion: fusion models toward a mechanism*, in: J. Bentz (Ed.), *Viral Fusion Mechanisms*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp: 89-111), el virus Semliki Forest (R. bron, *et al.*, 1993. *EMBO J.* 12: 693-701), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) (M.O. McClure, *et al.*, 1988. *EMBO J.* 7: 513-518), el virus Sendai (D. Hoekstra, *et al.*, 1985. *Biochemistry* 24: 4739-4745), el virus del Sarcoma de Rous (Revisión en, S.G. Peisajovich and Y. Shai. 2003. *BBA* 1614: 122-129), el virus de la Estomatitis Vesicular (Revisión en, S.G. Peisajovich and Y. Shai. 2003. *BBA* 1614: 122-129), el virus Ébola (Revisión en, S.G. Peisajovich and Y. Shai. 2003. *BBA* 1614: 122-129), el virus Measles, virus del Dengue, el virus de la fiebre amarilla y de la encefalitis (Revisión en, T.H. Sollner. 2004. *Current Opinión in Cell Biology* 16: 429-435; Revisión en, A.E. Smith and A. Helenius 2004. *Science* 304: 237-242).

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en el que la composición farmacéutica se utiliza para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad de inmunodeficiencia humana adquirida provocada por el virus VIH-1.

Tal y como se utiliza en la presente invención el término “virus VIH-1” se refiere a cualquiera de las cepas existentes del virus VIH-1 y VIH-2.

En este sentido, en el estado de la técnica existen descritos compuestos agonistas de la actividad de las proteínas HDACs, que pueden ser utilizados en el ámbito de la presente invención como agonistas de la proteína HDAC6, y que se indican a continuación a título ilustrativo sin que eso signifique una limitación al alcance de la presente invención: xantinas (patente US 20030134865).

Así, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la presente invención en el que el compuesto agonista está constituido por una xantina o sus derivados.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la presente invención en el que el compuesto está constituido por una construcción genética, en adelante construcción génica HDAC6 de la presente invención, que permite la expresión de una proteína o péptido con actividad tubulina desacetilasa que mimetiza la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6 humana en el interior de células de mamífero, preferentemente humanas, y más preferentemente en linfocitos T, de forma similar a las construcciones genéticas elaboradas en la presente invención (ver Ejemplo 3) y que comprende una o varias secuencias de nucleótidos HDAC6 pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína tubulina desacetilasa humana HDAC6,
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a), b) y c).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia de mostrada en la presente memoria (SEQ ID NO1), por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que permita la codificación de un péptido o proteína capaz de mimetizar la acción tubulina desacetilasa de la HDAC6 humana.

La secuencia de nucleótidos, longitud completa, codificante de la proteína tubulina desacetilasa humana HDAC6 que se utiliza en la presente invención (SEQ ID NO1) está identificada por el número de acceso AF132609 en el NCBI.

En general, una secuencia de nucleótidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 30%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%. Hay que indicar que la secuencia de nucleótidos de la HDAC6 humana (SEQ ID NO1) presenta una homología variable con respecto a otras formas existentes en otras especies.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso del compuesto de la presente invención en el que la secuencia de nucleótidos de a) de la construcción génica HDAC6 es la secuencia de nucleótidos HDAC6 caracterizada por la SEQ ID NO1 codificante de la proteína tubulina desacetilasa humana HDAC6 (SEQ ID NO2). Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso del compuesto de la presente invención en el que la construcción génica HDAC6 comprende la secuencia de nucleótidos HDAC6 caracterizada porque es un fragmento de b) constituido por una secuencia de nucleótidos codificante al menos de la secuencia de aminoácidos comprendida entre los dos residuos de histina 216 y 611 de la HDAC6 humana (SEQ ID NO2), claves para su actividad funcional. Hay que indicar que la mutación en estas dos histinas produce una proteína HDAC6 inactiva (ver Ejemplo 3; Serrador JM *et al.*, 2004. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity* 20: 417-428) por lo que este dominio puede ser necesario para que un fragmento de HDAC6 sea funcionalmente activo.

La construcción génica HDAC6 de la invención también puede comprender, en caso necesario y para permitir un mejor aislamiento, detección o secreción al citoplasma del péptido expresado, a una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento, detección o secreción de dicho péptido. Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la presente en el que el compuesto agonista es una construcción genética HDAC6 descrita anteriormente que comprende, además de la secuencia de nucleótidos HDAC6, cualquier otra secuencia de nucleótidos codificante de un péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento, la detección o la secreción al citoplasma celular del péptido expresado, por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, una secuencia de polihistidina (6xHis), una secuencia peptídica reconocible por un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, para su identificación, o cualquier otra que sirva para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad: péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E-tag) (Using antibodies: a laboratory manual. Ed. Harlow and David Lane (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: Tagging proteins. Pp. 347-377).

La secuencia de nucleótidos HDAC6 y la construcción genética HDAC6 descritas previamente pueden obtenerse por un experto en el sector de la técnica mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook *et al.* "Molecular cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Sping Harbor Laoratory Press, N.Y., 1989 vol 1-3). Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar integradas en un vector de expresión génica que permite la regulación de la expresión de la misma en condiciones adecuadas.

Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la presente invención en el que el compuesto está constituido por un vector de expresión génica, en adelante vector de expresión HDAC6, que comprende una secuencia de nucleótidos HDAC6 o una construcción genética HDAC6 descritas en la presente invención y que permite la expresión de una proteína o péptido con actividad tubulina desacetilasa que mimetiza la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6 humana en el interior de células de mamíferos, preferentemente células humanas, y más preferentemente en linfocitos T.

En general, un vector de expresión comprende, además de la secuencia de nucleótidos HDAC6 o de la construcción genética HDAC6 descritos en la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, *pT7*, *plac*, *ptc*, *ptac*, *ABAD*, \square *ret*, etc), 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 (*tlt2*, etc), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RES), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión, vectores virales (DNA o RNA), cósmidos, cromosomas artificiales, etc. 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 huésped 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 técnicos en la materia al igual que para la transformación de microorganismos y células eucariotas se pueden utilizar diferentes métodos ampliamente conocidas -transformación química, electroporación, microinyección, etc- descritos en diversos manuales [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.].

Los sistemas de expresión génica pueden permitir o no la integración del nuevo material genético en el genoma de la célula huésped. De esta forma, tanto la secuencia de nucleótidos, construcción génica o el vector de expresión HDAC6 pueden utilizarse como un medicamento para proteger células huésped, preferentemente linfocitos T, contra la infección de un virus fusogénico, preferentemente por el virus VIH-1, en un procedimiento de tratamiento y profilaxis de terapia génica *in vitro* de linfocitos T humanos frente a VIH-1. Las herramientas biofarmacéuticas y los procedimientos de terapia génica son suficientemente conocidas por un experto del sector de la técnica.

Finalmente, el origen de estos compuestos reguladores agonistas de la actividad de las proteínas HDACs puede ser variado, de tal forma que pueden ser origen natural (por ejemplo, de origen vegetal, bacteriano, vírico, animales o microorganismos eucariotas) o sintético.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con la entrada e infección de un virus fusogénico en una

ES 2 326 348 A2

célula eucariota, preferentemente en células humanas, y más preferentemente en linfocitos T, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto ó agente activador de la proteína HDAC6, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables y que es capaz de inhibir la entrada de dicho virus en la célula eucariota.

5

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

10

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto regulador, agonista, de la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración. En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

15

20

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto agonista es una xantina o sus derivados.

25

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto activador es una construcción genética o un vector de expresión HDAC6 que permite la expresión de una proteína o péptido con actividad tubulina desacetilasa que mimetiza la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6 humana en el interior de células de mamífero, preferentemente humanas, y más preferentemente en linfocitos T, de forma similar a las construcciones genéticas elaboradas en la presente invención (ver ejemplo 3) y que comprende una o varias de las secuencias de nucleótidos HDAC6 pertenecientes al siguiente grupo:

30

a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína tubulina desacetilasa humana HDAC6,

35

b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),

c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y

40

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

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de a) es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO1 codificante de la proteína tubulina desacetilasa humana HDAC6 (SEQ ID NO2).

45

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos de b) es un fragmento constituido por una secuencia de nucleótidos codificante, al menos, de la secuencia de aminoácidos comprendida entre los dos residuos de histina 216 y 611 de la HDAC6 (SEQ ID NO2).

50

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la presente invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología provocada por la infección de un virus fusogénico consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que modifica el estado de acetilación de la tubulina y que actúa inhibiendo la entrada del virus en el interior de la célula.

55

De esta forma, este compuesto agonista de la HDAC6 puede favorecer la desacetilación de la tubulina mediante el aumento de la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6 en el interior de las células eucariotas y, por tanto, impedir la entrada e infección del virus.

60

El uso de la composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

65

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad provocada por un virus fusogénico que infecta células eucariotas, preferentemente células de mamíferos humanos y no humanos, perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, al siguiente grupo: el virus de la gripe (Revisión en, T. Stegmann and A. Helenius.

Influenza virus fusion: fusion models toward a mechanism, in: J. Bentz (Ed.), *Viral Fusion Mechanisms*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp:89-111), el virus Semliki Forest (R. bron, *et al.*, 1993. *EMBO J.* 12:693-701), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) (M.O. McClure, *et al.*, 1988. *EMBO J.* 7:513-518), el virus Sendai (D. Hoekstra, *et al.*, 1985. *Biochemistry* 24:4739-4745), el virus del Sarcoma de Rous (Revisión en, S.G. Peisajovich and Y. Shai. 2003. *BBA* 1614:122-129), el virus de la Estomatitis Vesicular (Revisión en, S.G. Peisajovich and Y. Shai. 2003. *BBA* 1614:122-129), el virus Ébola (Revisión en, S.G. Peisajovich and Y. Shai. 2003. *BBA* 1614:122-129), el virus Measles, virus del Dengue, el virus de la fiebre amarilla y de la encefalitis (Revisión en, T.H. Sollner. 2004. *Current Opinión in Cell Biology* 16:429-435; Revisión en, A.E. Smith and A. Helenius 2004. *Science* 304:237-242).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de la enfermedad de inmunodeficiencia humana adquirida provocada por el virus fusogénico VIH-1.

15 Descripción de las figuras

Figura 1.- La inhibición de HDAC6 incrementa la fusión célula-célula mediada por las proteínas Env del virus VIH-1. (a) El marcaje X-Gal de las células HeLa P5 fusionadas con células HeLa ADA en ausencia (control) o presencia de TSA (10, 100 y 300 nM), NaBut (2 μ M), RANTES (300 y 700 nM) o anticuerpo monoclonal (Acm) anti-CD4 (5 μ g/ml). (b) Cuantificación β -Gal de los experimentos de fusión celular mediados por Env de las cepas trópica R5 y trópica X4 en células HeLa P5 tratadas con TSA, y en presencia o ausencia de anticuerpo monoclonal anti-CD4. (c) Western blot para el análisis cinético de la acetilación de la proteína α -tubulina acetilada en células HeLa P5 tratadas con TSA (10, 100 y 300 nM) o NaBut (500 μ M). Las cifras indican las veces que se incrementa la proteína α -tubulina acetilada con respecto a células no tratadas. (d) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD4, CXCR4 y CCR5 en células HeLa P5 tratadas con 300 nM de TSA 2 μ M NaBut o células no tratadas (e) Western blot para el análisis cinético de la desacetilación de proteína α -tubulina tras el tratamiento con TSA (300 nM, 4 hrs.) en células HeLa P5 aclaradas. Las cifras indican la cantidad de proteína α -tubulina acetilada después de eliminar el TSA, y referido al momento cero (4 hrs. de tratamiento con TSA 300 nM). (f) Cuantificación β -Gal de los experimentos de fusión de células HeLa ADA con células HeLa P5 pretratadas con TSA o Nabut durante 4 hrs. a 37°C antes de la adición de las células HeLa ADA. Se muestra además el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-CD4. (g) El marcaje X-Gal de las células HeLa ADA fusionadas con no tratadas (control) o con células HeLa P5 pre-tratadas con 300 nM TSA, en presencia o en ausencia de un anticuerpo monoclonal anti-CD4.

Figura 2.- La inhibición de la enzima HDAC6 incrementa la fusión celular en linfocitos T mediada por proteínas Env del virus VIH-1. (a) Análisis por citometría de flujo de sincitios fusionados entre células J77 y células T Hxhc2-Env en presencia o en ausencia de TSA o NaBut. Se muestra un Western blot de análisis cinéticos de la acetilación de la proteína α -tubulina en células J77 tratadas con TSA (2 μ M). Los valores indican el incremento de la acetilación α -tubulina en comparación con los definidos en la banda de control de α -tubulina. (b) Imágenes de los sincitios formados entre las células J77 y las Hxhc2 bajo tratamientos de TSA y NaBut. Además, se muestran el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-CD4. (c) Análisis de citometría de flujo de células J77 que expresan CD4 y CXCR4 tratadas con TSA (300 nM), NaBut (2 μ M) o de células no tratadas. (d) Internalización de CXCR4 inducida por SDF-1 α en ausencia de TSA o en presencia de 300 nM de TSA. (e) α -tubulina acetilada en células J77 tratadas con TSA (300 nM) o NaBut (2 mM) y en células no tratadas. Los datos de las imágenes de fluorescencia y de los western blots son representativos de 3 experimentos independientes (media \pm SE; n=4).

Figura 3.- El silenciamiento de la expresión de HDAC6 incrementa la fusión con células que expresan proteínas Env del virus VIH-1. (a) Cuantificación mediante western blot de la expresión de la enzima HDAC6 y de α -tubulina acetilada en células HeLa P5 tratadas con siRNA. Las imágenes de fluorescencia muestran altos niveles de α -tubulina acetilada en células donde la expresión de HDAC6 fue silenciada (cabezas de flechas). (b) Imágenes DIC de sincitios formados entre células HeLa ADA fusionadas con células HeLa P5 tratadas con siRNA (1 y 2) o sin tratar (4) o con células HeLa P5 transfectadas con un siRNA como control negativo y de especificidad (5). Se muestra además el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-CD4 en células no tratadas (3) o células tratadas con siRNA-HDAC6 (6). (c) Cuantificación de β -Gal de la fusión celular mediada por Env entre células HeLa P5, tratadas con siRNA (si) o no, con células HeLa que expresan Env de las cepas R5- o X4-trópicas, en presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal anti-CD4.

Figura 4.- El silenciamiento e inhibición de HDAC6 favorece la infección por el virus VIH-1. (a) Efecto de TSA o NaBut en la infección por el virus VIH-1 de células HeLa P5 con las cepas virales VIH-1_{Bal} y VIH-1_{NL43}. La infección fue medida mediante la producción de β -Gal, 52 hrs después de la infección. (b) Producción viral (medida de p24) en PBL activados con PHA pretratadas con TSA o NaBut. Las imágenes de inmunofluorescencia y los análisis de western blot muestran los niveles de α -tubulina acetilada en PBL activadas con PHA, después de 2 hrs. de tratamiento con TSA (300 nM) o Nabut (2 μ M). Se muestran además el efecto de AZT, un neutralizante del anticuerpo monoclonal anti-CD4, RANTES y SDF-1 α en los paneles A y B. (c) Efecto del silenciamiento del siRNA HDAC6 en la infección por el virus VIH-1 de células HeLa P5. La infección se mide mediante la producción β -Gal. Además, se muestra el efecto de un anticuerpo monoclonal neutralizante.

Figura 5.- La sobre-expresión de HDAC6 disminuye la capacidad de las células de fusionarse y de ser infectadas por el virus de VIH-1. (a) Expresión de las formas salvajes (wt) y mutada (dm) de la enzima HDAC6-GFP en células

HeLa P5. (b) Análisis de western blot de la expresión de la enzima salvaje (wt) y mutada (dm) HDAC6-GFP y sus efectos en los niveles de la proteína α -tubulina acetilada. (c) Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD4, CXCR4 y CCR5 en células HeLa P5 no transfectadas o transfectadas con la forma salvaje (wt) o mutada (dm) de la enzima HDAC6-GFP. (d) Cuantificación (producción de β -Gal) de la fusión celular mediada por Env entre células HeLa ADA y no transfectadas (control), o entre células HeLa P5 transfectadas con la forma salvaje (wt) o mutada (dm) de la enzima HDAC6-GFP. Se muestran además imágenes DIC de los sincitios formados después de 16 horas de la fusión. (e) Infección del virus VIH-1 en células HeLa P5 no transfectadas (control) o en transfectadas con la forma salvaje (wt) o mutada (dm) de la enzima HDAC6-GFP con la cepa VIH-1_{BaL}. Además, se muestra el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-CD4 y AZT. Las imágenes de western blot y DIC son representativas de tres experimentos independientes (media \pm SEM; n=4).

Figura 6.- La sobre-expresión de HDAC6 altera la infección por el virus VIH-1 y la redistribución de la proteína α -tubulina acetilada en las áreas de contacto célula/virus VIH-1. (a) Análisis de citometría de flujo de células MT-2 que expresan las formas salvaje (wt) y mutada (md) de la enzima HDAC6-GFP y la proteína GFP. (b) Análisis de citometría de flujo de CD4 y CXCR4 en células MT-2 parentales, expresando wt-HDAC6 o dm-HDAC6. (c) Análisis de la entrada e infección del virus VIH-1 en células MT-2 transfectadas con retrovirus con las formas salvaje (wt) y mutada (md) de la enzima HDAC6-GFP mediante la cuantificación de DNA VIH-1-gag intracelular, con respecto a células MT-2 control transfectadas o no con GFP (control). Estos resultados son representativos de 3 experimentos independientes. (d) Localización de α -tubulina acetilada y de la enzima salvaje (wt) o mutada (dm) HDAC6-GFP en células MT-2, antes y durante la infección de VIH-1 (control, panel izquierdo y VIH-1_{NL43} en panel derecho, respectivamente).

Figura 7.- El virus VIH-1 recluta a la enzima HDAC6 y a la proteína α -tubulina acetilada en las áreas de contacto célula/virus, donde CD4 y CXCR4 se co-distribuyen. (a) Redistribución de la proteína α -tubulina acetilada en modelos de fusión celular con células HeLa y linfocitos T (ver punta de flechas) en las áreas de contacto célula/célula del sincitio. (b) Expresión y localización de la enzima endógena HDAC6 y de la proteína α -tubulina acetilada en células MT-2 parentales infectadas por el virus VIH-1 y en células no infectadas. (c) Análisis de microscopía de fluorescencia de CD4, CXCR4 y de la enzima salvaje (wt) o mutada (dm) HDAC6-GFP en células MT-2 no infectadas (panel izquierdo) o infectadas (panel derecho).

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

El bloqueo de la enzima HDAC6 promueve la formación del sincitio dependiente de gp41/gp120

Con el objeto de evaluar el efecto de la estabilización de la proteína α -tubulina en la capacidad de fusión de las proteínas de la envoltura del virus VIH-1 gp41/gp120 se utilizaron inhibidores químicos de HDAC6. Así, se ensayó el efecto del inhibidor general de las proteínas HDACs, TSA, el cual además inhibe la actividad tubulina desacetilasa de HDAC6, y el butirato sódico (NaBut) en distintos modelos de fusión célula-célula mediados por el virus VIH-1. En primer lugar, se empleó un modelo de fusión celular mediado por proteínas Env en células HeLa 243 o en células ADA que se fusionaron con células HeLa P5 (Schwartz, O. *et al.*, 1994. *Virology* 198: 360-365; Pleskoff, O. *et al.*, 1997. *Science* 276: 1874-1878). Se observó que TSA promueve fuertemente la formación de células polinucleadas gigantes (sincitio) de manera dosis dependiente (Figura 1A, 1B), mientras que NaBut no provocaba dicho resultado (Figura 1A). Los sincitios formados por las células tratadas con TSA fueron mayores que aquellos obtenidos en células no tratadas o tratadas con NaBut (Figura 1A), y este efecto fue observado tanto con proteínas Env de las cepas tropicas X4 y R5, con una actividad máxima a dosis de 300 nM de TSA (Figura 1B). Una clara correlación se observó entre el efecto de TSA en la capacidad de fusión de gp41/gp120 (Figura 1B) y la cantidad de proteína α -tubulina acetilada (Figura 1C), siendo ambas dependientes de la dosis (Figura 1B y 1C, las cuales presentan 300 nM de TSA) y del tiempo. Por el contrario, no observó ningún efecto en la acetilación de la proteína α -tubulina con distintas dosis y tiempos de tratamientos con NaBut (Figura 1C). Como se esperaba, el efecto de TSA en la formación de sincitios fue revocado mediante anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-CD4 (Figura 1A y 1B), o mediante RANTES (Figura 1A) y SDF-1 α (datos no mostrados). Mas aún, los niveles de expresión de CD4, CXCR4 y CCR5 en células HeLa P5 no fueron alterados de forma significativa por la adición de TSA (Figura 1D). Estos datos sugieren que TSA favorece el paso de formación del poro de fusión durante el proceso de fusión celular, provocando cambios en la deformabilidad de la membrana sin alterar la interacción inicial de las proteínas Env con el receptor CD4.

Para valorar el efecto de TSA en la activación de *LTR-lacZ* se realizaron una serie de experimentos de fusión célula-célula mediante el pretratamiento de las células HeLa P5 con TSA, y eliminándolo antes de la adición de las células HeLa Env+. Se observó que TSA estabiliza un importante conjunto de α -tubulina acetilada, la cual disminuye hasta los niveles basales después de 2 horas de haber eliminado el TSA (Figura 1E). La cantidad de α -tubulina acetilada eliminada a los 30 y 60 minutos fue un 60% y un 30% mayor, respectivamente, que aquellas observadas en células no tratadas o en células tratadas con NaBut (Figura 1E). Como una vez que se produce el contacto con el virus VIH-1, la fusión de membrana y la entrada viral tienen lugar en aproximadamente en 30-60 minutos (Reeves, J.D. *et al.*, 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 16249-54; Raviv, Y. *et al.*, 2002. *Virology* 293: 243-51), estos datos sugieren que la acetilación de los microtúbulos se traduce en una mayor permisividad de las células a la fusión. Por lo tanto, el tratamiento de las células HeLa P5 con TSA incrementa la formación de sincitio con respecto al tratamiento con

ADA en células HeLa (Figura 1F) y en células HeLa 243 (datos no mostrados). El efecto del TSA o del NaBut en la transcripción de *LTR-lacZ*, después de eliminar las drogas, fue excluido por la ausencia de producción β -Gal en las células control no fusionadas HeLa P5, o en las células tratadas con NaBut (Figura 1F, 1G)

5 Con el objeto de trasladar estas observaciones a linfocitos T se empleó un modelo de fusión célula-célula basado en células Jurkat que expresan X4-tropic Hxhc2-Env (Cao, J., *et al.*, 1996. J Virol 70, 1340-54), co-cultivadas con células J77 (CXCR4+/CD4+). El tratamiento de las células J77 con TSA claramente estabiliza una intensa corteza de proteína α -tubulina acetilada (Figura 2A, 2E) e induce la formación de grandes sincitios, mientras que NaBut no produjo ningún efecto (Figura 2A y 2B). Como se observó en células HeLa, la expresión de las proteínas CXCR4 y
10 CD4 no se vieron modificadas significativamente por el tratamiento con TSA o con NaBut (Figura 2C), y tampoco la internalización de CXCR4 inducida por SDF-1 α se vio afectada por TSA (Figura 2D).

Ejemplo 2

15

El silenciamiento de la proteína HDAC6 incrementa la entrada y la infección por VIH-1

Para valorar adicionalmente el papel de la proteína α -tubulina acetilada en la fusión e infección por VIH-1 se realizaron un silenciamiento selectivo de la expresión HDAC6 mediante la inhibición específica de su RNAm con
20 RNAs de interferencia (siRNA) (Hubbert C., *et al.*, 2002. Nature 417: 455-458; Serrador J.M., *et al.*, 2004. Immunity 20: 417-28). La inhibición de la expresión endógena de HDAC6 en las células HeLa P5 indujo un incremento 3 veces mayor de la proteína α -tubulina, sin afectar a los niveles totales de esta proteína o de otros componentes del citoesqueleto, como la vimentina (Figura 3A) o la expresión de CXCR4, CCR5 y CD4 (datos no mostrados). El silenciamiento específico de HDAC6 generó unas células HeLa P5 más permisivas, las cuales presentan una mayor
25 actividad de fusión con ambos Env R5-tropic y X4-tropic (Figura 3B, 3C).

En los modelos de fusión célula-célula, las áreas de contacto presentadas por las células que expresan Env fueron mayores que aquellas observadas en modelos de infección celular, mediante el uso de partículas virales de VIH-1 purificadas. La siguiente pregunta que se planteó fue si el efecto de la inhibición de HDAC6 y, por tanto la subsiguiente
30 estabilización de la proteína α -tubulina acetilada cortical, influye en la infección por el virus VIH-1 utilizando células HeLa P5 o linfocitos de células periféricas activadas con PHA (PHA-activated PBL). La infección del virus VIH-1 en células HeLa P5 se valoró mediante la producción de β -Gal y la activación de los linfocitos de sangre periférica por PHA mediante la determinación del antígeno p24 en el sobrenadante libre de células (Figura 4A y 4B, respectivamente). Se observó que TSA incrementó la infección por el virus VIH-1 de una manera dosis dependiente en células HeLa
35 P5 y en PBL (Figura 4A y 4B) con cualquiera de las cepas utilizadas: R5-tropic VIH-1_{Bal} y X4-tropic VIH-1_{NL-43} (Figura 4A y 4B). TSA incrementó la infección de VIH-1 a través de la inhibición de la enzima HDAC6 citosólica y de la estabilización de la proteína α -tubulina acetilada cortical (Figura 4B), el cual se mantuvo tras la eliminación de TSA (Figura 4A y 4B), lo que excluye los efectos transcripcionales de TSA en la producción de β -Gal y en la replicación del virus VIH-1. Al igual que en los modelos de fusión célula-célula, el incremento de la infección del
40 virus VIH-1 en células HeLa P5 (Figura 4A) y en células PBL activadas con PHA se correlacionó con los niveles de proteína α -tubulina acetilada (Figura 1E y 4B). Asimismo, el silenciamiento de HDAC6 produjo células HeLa P5 más permisivas, las cuales fueron infectadas más eficazmente con partículas virales de cepas R5- o X4 trópicas de VIH-1 (Figura 4C).

45 Estos resultados sugieren que los niveles de proteína α -tubulina acetilada ejercen un claro efecto en la susceptibilidad de células diana a fusionarse y ser infectadas por el virus VIH-1.

Ejemplo 3

50

La sobreexpresión de HDAC6 altera la fusión celular y la infección viral por VIH-1

Se valoró además el efecto de la sobre-expresión de la forma salvaje activa de HDAC6 (wild-type, wt) (Figura 5A y 5B) sobre la capacidad de fusión de las proteínas gp120/gp41 y la infección por el virus VIH-1. Como control se utilizó en paralelo una forma mutada de la enzima HDAC6 desacetilasa inactiva (dm) (Figura 5A y 5B) en las
55 cuales dos residuos de histidina claves para la actividad desacetilasa fueron mutados a alanina (Serrador J.M., *et al.*, 2004. Immunity 20: 417-28). Se observó que i) la capacidad de fusión de células HeLa P5 transformadas con la forma salvaje de la proteína HDAC6-GFP con células HeLa ADA (Figura 5D) o con células 243 (datos no mostrados), y ii) la capacidad de ser infectadas por cepas virales de VIH-1 trópicas R5 y X4 (Figura 5E y datos no mostrados, respectivamente) se redujeron drásticamente con respecto a lo observado con células parentales o células HeLa P5
60 transfectadas con la forma inactiva de HDAC6-GFP (dm).

Resultados similares fueron observados en experimentos de infección con el virus VIH-1 (Figura 6C) con la línea celular de linfocitos T MT-2 que expresan la forma salvaje o mutada de HDAC6-GFP, traducidas por espinoculación viral (Figura 6A, alrededor del 70% de las células expresan las dos formas de la enzima). Los microtúbulos acetilados
65 corticales se detectaron pobremente en las células MT-2 que expresan la forma salvaje de la proteína HDAC6-GFP (Figura 6D, determinado por la ausencia de fluorescencia en células blancas (marcadas con arterisco) al compararse con las células parentales o las células MT-2 que expresan la forma mutada de la proteína HDAC6-GFP (Figura 6D,

ver la fluorescencia en células de la parte inferior de la figura). Se observó que la enzima salvaje HDAC6-GFP altera la entrada y la infección del virus VIH-1 (Figura 6C, alrededor de un 75% de inhibición) mediante la determinación cuantitativa del DNA proviral VIH-1-gag contenido en las células MT-2 infectadas 12 horas después de la infección con el virus VIH-1 (Figura 6C). Por otro lado, la sobre-expresión de la enzima HDAC6 no modificó los niveles de CD4, CCR5 o CXCR4 en la superficie celular (Figura 5C y 6B).

Por tanto, la susceptibilidad de las células a ser infectadas por el virus VIH-1 parece estar directamente relacionado con sus niveles de proteína α -tubulina acetilada, e inversamente ligada a la actividad de la enzima HDAC6 (Figura 5E y 6C.)

Ejemplo 4

EL virus VIH-1 recluta a la enzima HDAC6 y a la proteína α -tubulina acetilada en las áreas de contacto virus/célula

Tal y como se ha comentado anteriormente, la interacción cooperativa debe tener lugar entre la envoltura viral y el receptor celular y las moléculas co-receptoras para que se produzca la entrada del virus (Layne S.P., *et al.*, 1990. Nature 346: 277-9; Kuhmann S.E., *et al.*, 2000. J. Virol 74: 7005-15) La modificación de la co-distribución de CD4 y de las moléculas co-receptoras en las áreas de contacto célula/virus puede alterar el proceso de formación del poro de fusión (Dimitrov D.S., *et al.*, 1999. Virology 259: 1-6) y, por tanto, regular la infección por el virus VIH-1.

Por ello, se procedió a determinar si la concentración de la enzima HDAC6 y de la proteína α -tubulina desacetilada localizadas en el área de contacto célula/célula durante la infección del virus VIH-1 inducían la formación de sincitios. En ambas células transformadas, HeLa y MT-2, la forma salvaje (wt) y mutada (dm) de la enzima HDAC6-GFP se localizaron en el citoplasma (Figura 5A, 6D y 7C), de forma similar a lo observado con la enzima endógena (Figura 7B). Las células HeLa P5 y MT-2 que expresan las dos formas de la enzima HDAC6 no sufrieron cambios morfológicos significativos y como se indica anteriormente, los niveles de CD4, CXCR4 y CCR5 en la superficie celular se mantuvieron inalterados (Figura 5C y 6B). Interesantemente, se observó que la proteína α -tubulina acetilada estaba concentrada principalmente en el área de contacto de las células usando ambas células Env R5-tropic y X4-tropic (Figura 7B, indicado mediante flechas.)

Seguidamente, se determinó la localización de la enzima HDAC6 durante la infección celular y se observó que el virus VIH-1 indujo la redistribución de la enzima HDAC6-GFP hacia las estructuras de pseudopodia, co-localizándose con CXCR4 y CD4 (Figura 7C), lo cual indica que la enzima HDAC6 es reclutada en las áreas de contacto célula/virus VIH-1. Esta redistribución de la enzima HDAC6 fue independiente de su actividad enzimática, ya que tanto la forma salvaje como la mutada presentaron una localización similar (Figura 7C). Más aún, la proteína α -tubulina acetilada además se concentra en la pseudopodia inducida por el virus VIH-1, aunque sólo en las células que expresan la forma inactiva (dm) de la enzima HDAC6-GFP (Figura 6D, ver fluorescencia en las figuras inferiores del panel derecho) o en células T no tratadas que presentan bajos niveles de la enzima endógena HDAC6 (Figura 7B), mientras que no se observa dicha concentración en células que sobre-expresan la forma activa (wt) de la enzima HDAC6-GFP (Figura 6D, evaluado por la ausencia de fluorescencia, células blancas en el panel derecho, ver asterisco).

La capacidad de la enzima tubulina desacetilasa HDAC6 de regular la co-distribución de CXCR4 y CD4 inducida por el virus VIH-1 se analizó durante las etapas iniciales del proceso infeccioso. La cepa del virus VIH-1NL43 trópica X4 indujo el agrupamiento de CXCR4 y CD4 después de 90 minutos de la infección en células MT-2 transformadas ya sea con la forma salvaje (wt) o con la forma mutada (dm) de la enzima HDAC6-GFP (Figura 7C). La sobre-expresión de la forma activa (wt) de la enzima HDAC6-GFP no tuvo efecto en la co-distribución de CD4-CXCR4 (Figura 7C). Estos datos indican que la enzima HDAC6 altera la entrada y la infección por el virus VIH-1 por un mecanismo que no parece alterar las interacciones virus VIH-1/receptor-co-receptor en la membrana celular.

Material y Métodos

Anticuerpos y reactivos

El anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD4 HP2/6 (IgG1) que inhibe la interacción gp120/CD4 ya ha sido descrito anteriormente (Carrera A.C., *et al.*, 1987. Eur. J. Immunol. 17: 179-86); el mAb anti-CD4 v4-ficoeritrina (PE) (IgG1) que no reacciona con el punto de unión gp120 fue proporcionado por Becton Dickinson (San José, CA). El anticuerpo policlonal sc-5255 anti-HDAC6 fue proporcionado por Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA), y el mAb anti- α -tubulina B-5-1-2, el anti-tubulina acetilada 6-11B-1 y el anti-vimentina fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El TSA y el butirato sódico (Nabut) fueron adquiridos a Calbiochem (San Diego, CA). SDF-1 α fue proporcionado gentilmente por el Dr. F. Baleux (Pasteur Institute, Paris, Francia), el RANTES fue obtenido de R&D (Marina del Rey, CA). Los localizadores fluorescentes de células CMTMR y CMAC fueron obtenidas de Molecular Probes (Eugene, OR).

Células

Las líneas celulares T humanas Jurkat J77, las células MT-2 y las células Jurkat T que expresan la envoltura del virus VIH-1 (Env)-Hxhc2 (Jurkat Hxhc2) fueron cultivadas en el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS. El clon celular HeLa P5, transformado de forma estable con el cDNA de las proteínas CD4 y CCR5 humanas y con un gen reportero β -Gal dirigido por el *LTR* del VIH (Pleskoff O., *et al.*, 1997. *Science* 276: 1874-8) fue proporcionado por el Dr. M. Alizon (Hôpital Cochin, Paris, Francia). Las células HeLa 243 y ADA fueron también proporcionadas por el Dr. M. Alizon, y co-expresan las proteínas Tat y Env del virus VIH-1 (Schwartz O., *et al.*, 1994. *Virology* 198: 360-5; Pleskoff O., *et al.*, 1997. *Science* 276: 1874-8). Los linfocitos de sangre periférica humanos (PBL) fueron obtenidos y aislados de donantes sanos usando un gradiente de densidad por centrifugación Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Las células PBL fueron activadas durante 3 días con 1 μ g/mL de PHL (Murex Diagnostics Corp. Norcross, GA) y entonces fueron cultivados con IL-2 (6 unidades/mL).

15 *Construcciones de DNA recombinantes HDAC6 y técnica de lipo-transfección celular*

La construcción salvaje (wt)-HDAC6-GFP y su mutante (dm)-HDAC6-GFP, que presenta una doble mutación (H216A/H611A) que provoca la inactivación desacetilasa ya han sido descritas con anterioridad (Serrador J.M., *et al.*, 2004. *Immunity* 20: 417-28). Estos dos vectores de expresión fueron transfectados en células HeLa P5 usando Megafectin-20 (Qbiogene Inc. Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Transducción retroviral HDAC6 en células T

Las células MT-2 y Jurkat J77 que expresan GFP, la forma salvaje (wt) o mutada (dm) de HDAC6-GFP fueron obtenidas mediante la infección con un virus murino Moloney modificado (MLV), el cual es defectivo para la replicación. Brevemente, GFP, wt-HDAC6-GFP y dm-HDAC6-GFP fueron clonados en el vector bicistrónico pLZR-IRES/GHR (gentilmente proporcionado por el Dr. Antonio Bernad, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) Madrid, España). La producción retroviral y la transducción celular se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente (Abad J.L., *et al.*, 2002. *J. Gene. Med.* 4: 27-37).

Análisis de citometría de flujo y ensayos de internalización

Células no tratadas y tratadas con TSA o NaBut fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos anti-CXCR4 o anti-CCR5 marcados con PE-12G5, o con anti-CD4 marcado con FITC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como controles se utilizaron otros mAbs frente a dominios irrelevantes. Para los ensayos de internalización de CXCR4, las células J77 fueron incubadas con distintas concentraciones de SDF-1 α durante 1 hora a 37°C y posteriormente las células fueron analizadas como se ha descrito (Valenzuela-Fernandez A., *et al.*, 2001. *J. Biol. Chem.* 276: 26550-8).

Inmunofluorescencia

Las células HeLa P5, MT-2 y Jurkat J77 fueron fijadas y permeabilizadas durante 3 minutos en PBS 2% formaldehído- 0.5% Triton X-100, e inmunomarcadas para α -tubulina, α -tubulina acetilada o HDAC6 tal como se ha descrito anteriormente (Grozinger C.M., *et al.*, 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 4868-73; Serrador J.M., *et al.*, 2004. *Immunity* 20: 417-28). Las células fueron visualizadas usando un fotomicroscopio Leica DMR (Leica, Heidelberg, Alemania) y un microscopio confocal Leica TCS-SP.

Análisis de Western blot

Las células fueron resuspendidas en 60 μ L de una solución MES (10 mM MES a pH 7.4, 150 mM de CiNa, 5 mM EGTA, 5 mM de MgCl₂) que contiene además un conjunto de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania), se sonicaron 2 veces durante 30 segundos a 4°C y hervidos en solución 5% β -mercaptoetanol durante 1 minuto a 100°C. Los lisados celulares fueron analizados en un gel 12% SDS-PAGE e inmunomarcados para la proteína HDAC6, α -tubulina, α -tubulina acetilada y vicentina tal como se ha descrito (Serrador *et al.* (2004) HDAC6 deacetylase activity links the tunulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity* 20: 417-28).

Determinación de la fusión celular célula-célula mediada por Env del virus VIH-1

Los ensayos de fusión celular β -galactosidasa se realizaron tal como se ha descrito (Valenzuela-Fernandez A., *et al.*, 2001. *J. Biol. Chem.* 276: 26550-8). Brevemente, las células HeLa 243 o HeLa ADA fueron co-incubadas con células HeLa P5 dispuestas en placas de 96 pocillos en un ratio 1:1 durante 16 horas. Entonces, las células fusionadas fueron lavadas, lisadas (50 μ L de solución de lisis) y la actividad enzimática se evaluó mediante quimioluminiscencia (ensayo de gen reportero β -gal, Roche Diagnostics GMBH). Cuando se indique, las células HeLa P5 fueron pre-tratadas con TSA o NaBut. La tinción X-Gal de los sincitios formados, después de 16 horas de co-cultivo celular se

ES 2 326 348 A2

realizó mediante la fijación de las células con 0.5% glutaraldehído y marcaje con el sustrato de β -galactosidasa X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosida), tal como se ha descrito anteriormente (Pleskoff O., *et al.*, 1997. Science 276: 1874-8).

5 El ensayo de fusión celular de doble fluorescencia se realizó según está descrito (Valenzuela-Fernandez A., *et al.*, 2001. J. Biol. Chem. 276: 26550-8). Brevemente, las células Jurkat Hxhc2, que expresan la Env Hxhc2 de la cepa trópica X4 del virus VIH-1, marcadas con CMAC fueron co-cultivadas con células TJ77 pre-cargadas con CMTMR. El sincitio celular, marcado con dos cromóforos, se detectó 16 horas después mediante citometría de flujo o microscopía fluorescente. Cuando se indica, las células fueron pre-incubadas con TSA, Nabut o mAb anti-CD4.

10

Preparación de virus VIH-1

15 Las preparaciones altamente infecciosas de las cepas del virus VIH-1_{NL43} y VIH-1_{BAL}, se generaron mediante varios pases consecutivos de los aislados de VIH-1 originales aislados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tal como se ha descrito (Valenzuela A., *et al.*, 1997. J. Virol. 71: 8289-98). Brevemente, las células PBMC fueron infectadas con una dosis sincrónica del virus VIH-1_{NL43} Y VIH-1_{BAL}, los sobrenadantes del cultivo (centrifugados a 5.000 x g durante 10 minutos) se recuperaron tres días después y mantenidos a 70°C. Alícuotas descongeladas frescas fueron filtradas mediante un filtro de tamaño de poro de 0.22 μ m antes de sus uso.

20

Infección y entrada del virus VIH-1

25 La infección y entrada del virus VIH-1 NL43 se ensayó en células PBL activadas mediante PHA o en células MT-2. Cuando se indique, las células T pre-tratadas con los mAbs anti-CD4 (5 μ g/mL), SDF-1 α (300 nM), AZT (5 μ g/mL), TSA o NaBut. La entrada del virus VIH-1 en las células MT-2 se monitorizó durante 12 horas después de la infección con VIH-1 con la medida del DNA proviral gag VIH-1 mediante Taqman-PCR usando cebadores específicos tal como se ha descrito anteriormente (Zhao Y., *et al.*, 2002. J. Clin. Microbiol. 40: 675-8). La infección de VIH-1 de células PBL activadas con PHA se evaluaron midiendo la concentración de p24 en el sobrenadante de los cultivos mediante ELISA (INNOTEST HIV-1 antigen aAb Innogenetic N.Y. Ghent, Bélgica) tal como se ha descrito (Valenzuela A., *et al.*, 1997. J. Virol. 71: 8289-98).

30

35 La infección con cepas del virus VIH-1_{NL43} y VIH-1_{BAL}, de las células HeLa P5 se realizó en placas de 96 pocillos durante 5 horas a 37°C. El virus fue eliminado mediante lavado (PBS) y las células infectadas fueron tratadas con tripsina (5 minutos a 37°C). Las células HeLa P5 fueron cultivadas durante las próximas 52 horas. Entonces, las células infectadas fueron lisadas, y los niveles de infección de VIH-1 fueron evaluados mediante medida de β -galactosidasa. Cuando se indique, las células fueron pre-tratadas con TSA o NaBut durante 2 horas a 37°C antes de la infección con VIH-1.

40

Silenciamiento de HDAC6

45 Se generó un siRNA de doble cadena frente a la secuencia de HDAC6 comprendida entre los nucleótidos 211-231 (Eurogentec, Seraing, Bélgica) tal como se ha descrito (Serrador J.M., *et al.*, 2004. Immunity 20: 417-28). Las células HeLa P5 fueron transfectadas con este siRNA a una concentración final de 200 nM utilizando Oligofectamine (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. La transfección control negativo con sólo reactivo, o con mezclas de transfección con un siRNA de doble cadena (Eurogentec, Seraing, Bélgica) que no reconocen ninguna proteína eucariota, se utilizaron como controles. Las células fueron transfectadas dos veces durante 3 días y recogidas 24 horas después de la última transfección. Los lisados celulares totales (40 μ g) se analizaron mediante Western blot con anticuerpos anti-HDAC6, anti- α -tubulina acetilada y anti- α -tubulina.

50

Agrupamiento de las proteínas CXCR4 y CD4 durante la infección con VIH-1

55 Las células Jurkat J77 y MT-2 transfectadas con la forma salvaje (wt) de HDAC6-GFP o mutada (dm) HDAC6-GFP fueron co-cultivadas con la cepa VIH-1_{NL43} (MOI, 1) durante 90 minutos a 37°C. Entonces, las partículas virales fueron aclaradas y las células fijadas con un 2% paraformaldehído. La co-distribución de CD4 y CXCR4 en las estructuras de pseudopodia se analizó mediante inmunofluorescencia de las células marcadas con un anticuerpo monoclonal no neutralizante PE-v4 y con Alexa 350-estreptavidina contra un anticuerpo monoclonal primario biotinilado anti-CXCR4.

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un compuesto agonista de la actividad tubulina desacetilasa de la proteína HDAC6, constituido por una xantina o sus derivados, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para la profilaxis y tratamiento de enfermedades de mamíferos, ya sean humanos u otros animales, provocadas por la entrada e infección de un virus fusogénico de células eucariotas.

10 2. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el virus fusogénico pertenece al siguiente grupo: el virus de la gripe, el virus Semliki Forest, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV), el virus Sendai, el virus del Sarcoma de Rous, el virus de la Estomatitis Vesicular, el virus Ébola, el virus Measles, virus del Dengue, el virus de la fiebre amarilla y de la encefalitis.

15 3. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el virus fusogénico es el virus VIH-1.

15 4. Uso de un compuesto según las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la célula eucariota de un mamífero es un linfocito T humano.

20 5. Composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con la entrada e infección de un virus fusogénico en una célula eucariota **caracterizada** porque comprende un compuesto agonista de la proteína HDAC6 humana, constituido por una xantina o sus derivados, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

25

30

35

40

45

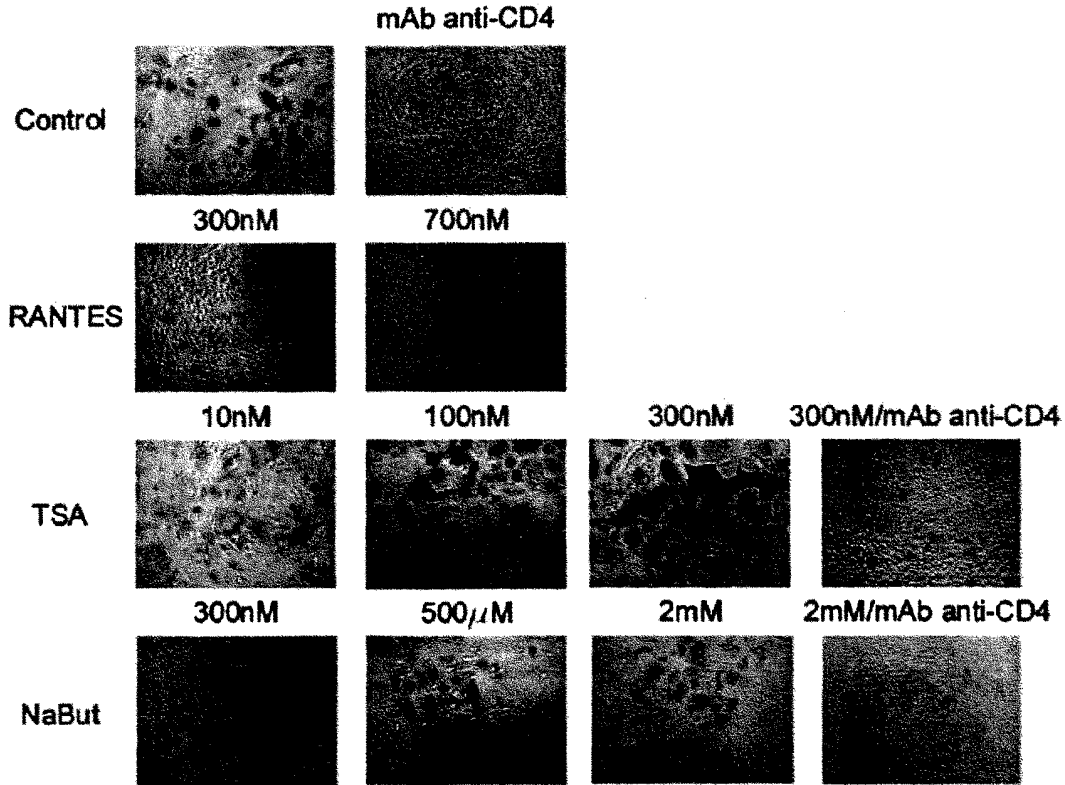
50

55

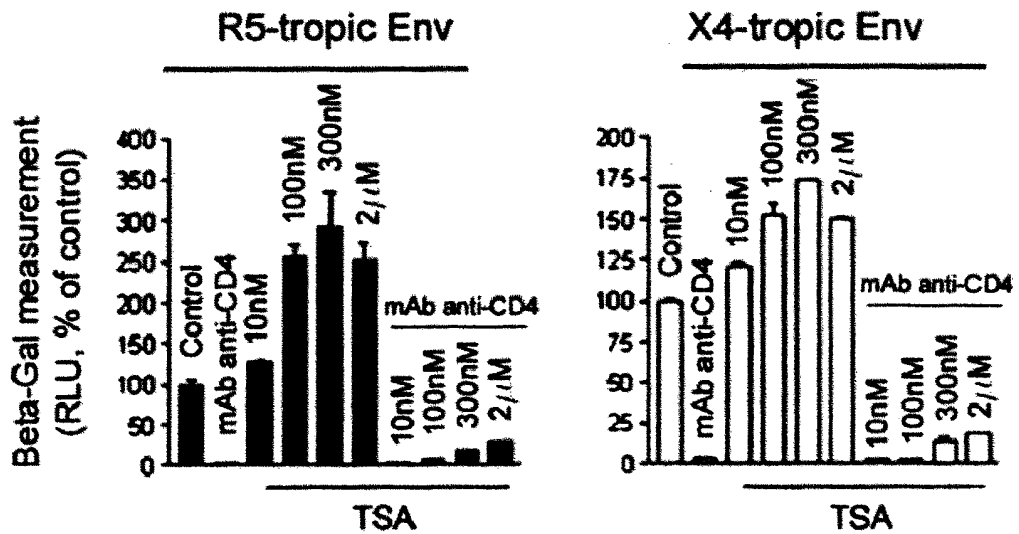
60

65

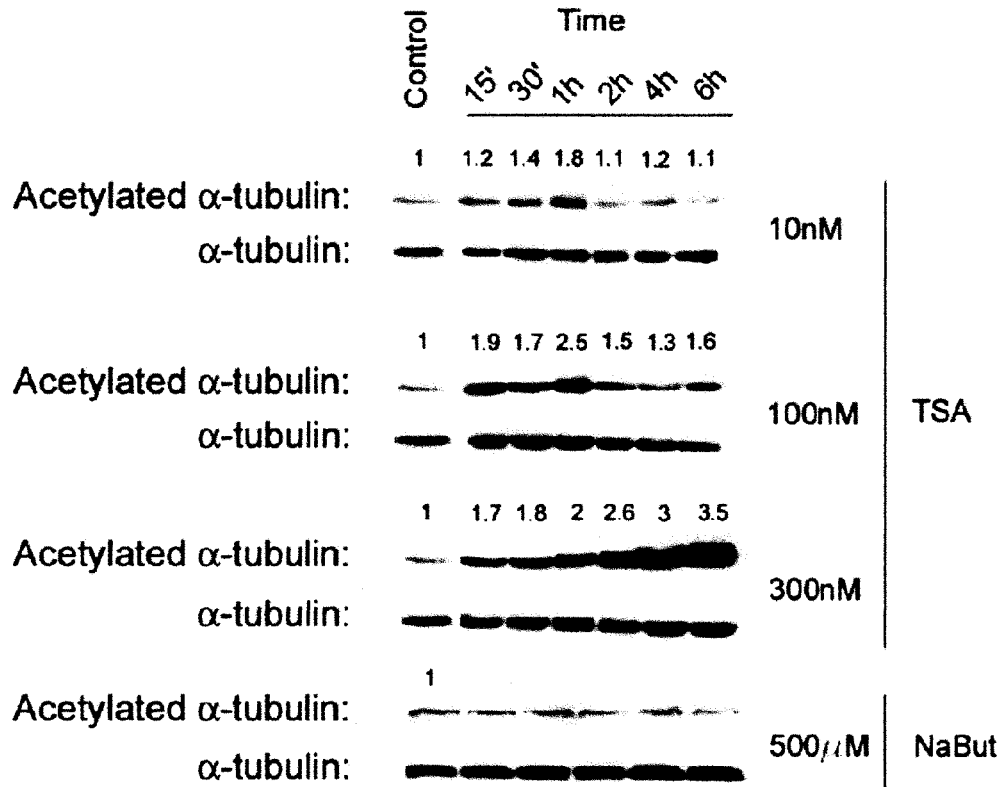
1A



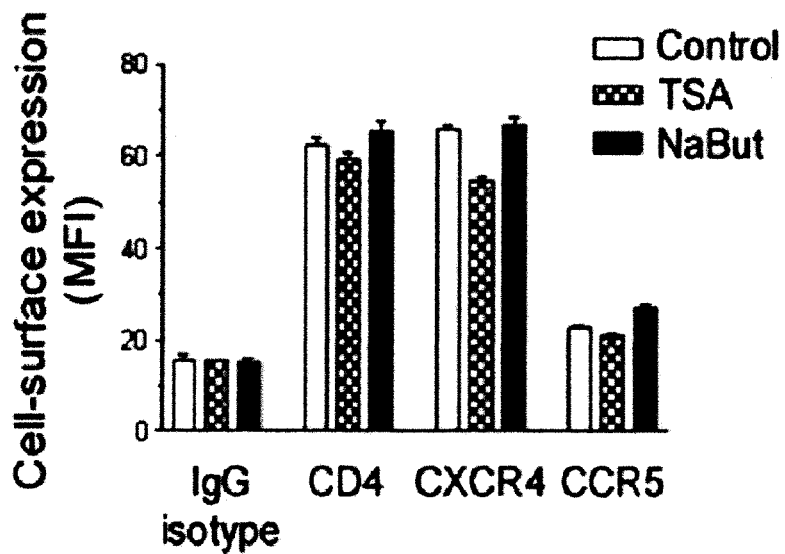
1B



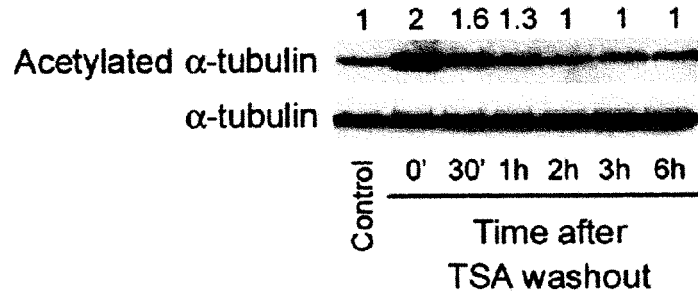
1C



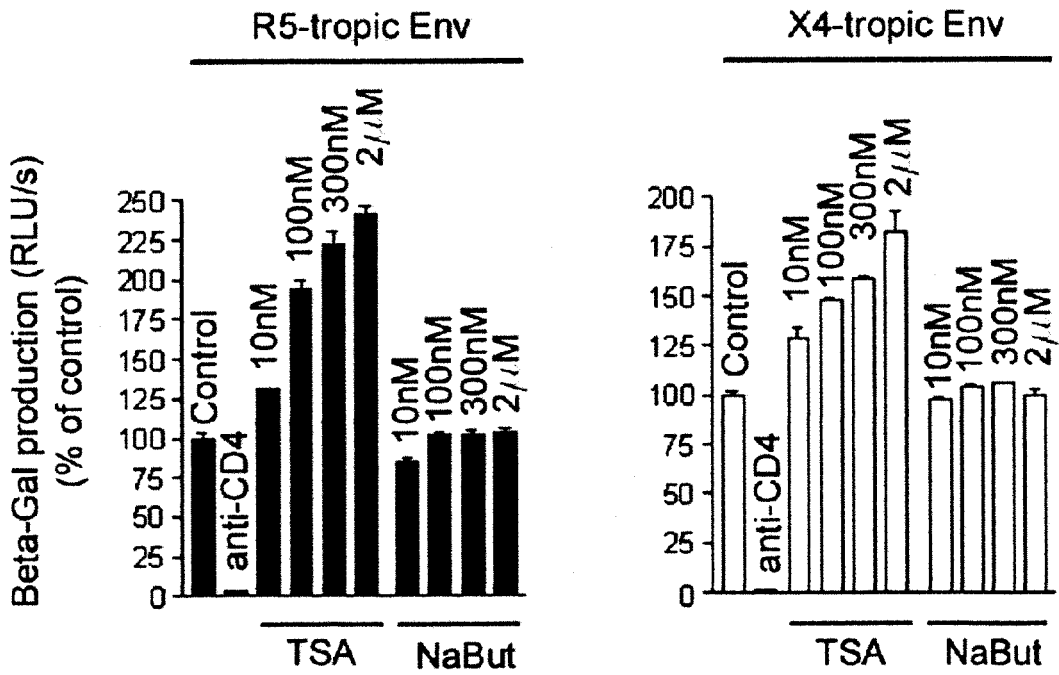
1D



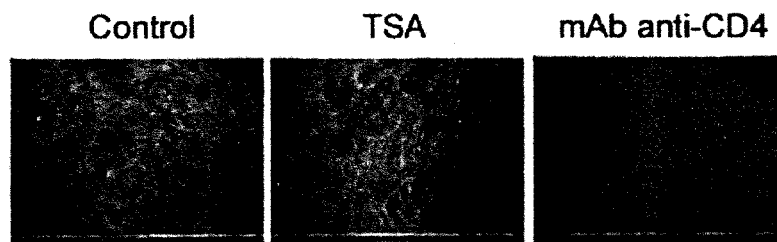
1E



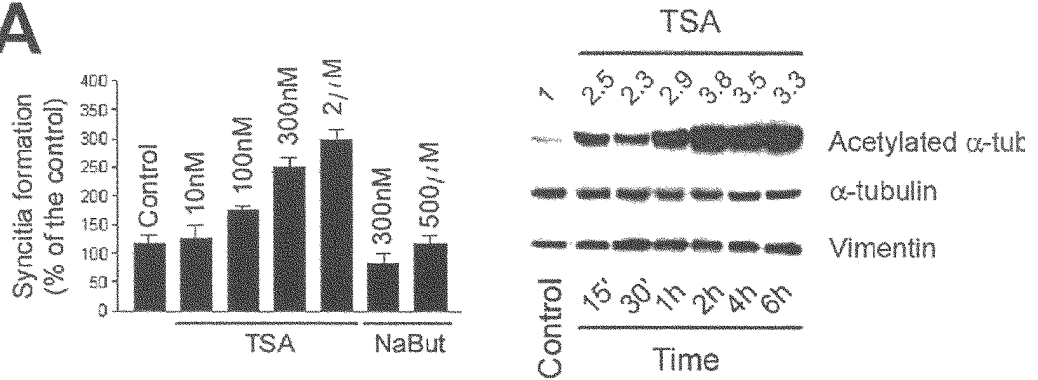
1F



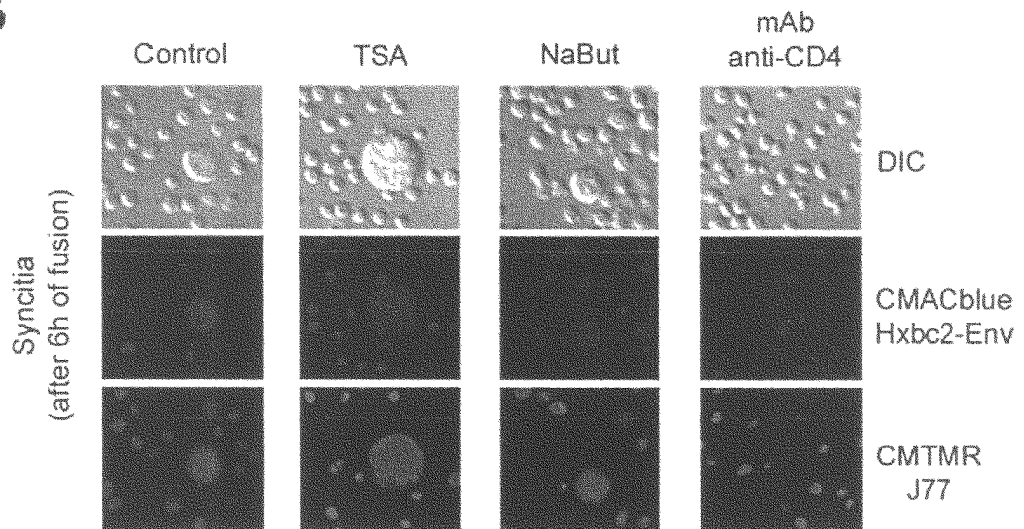
1G



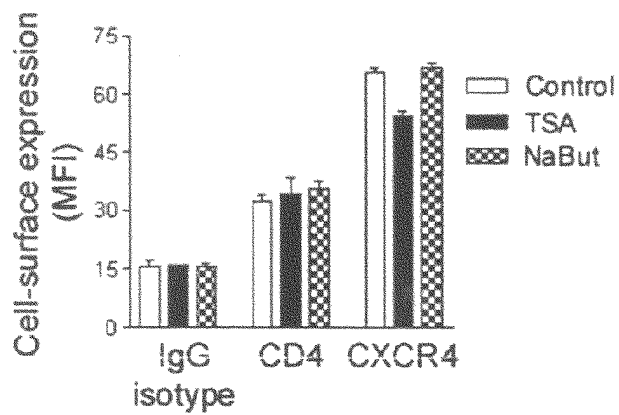
2A



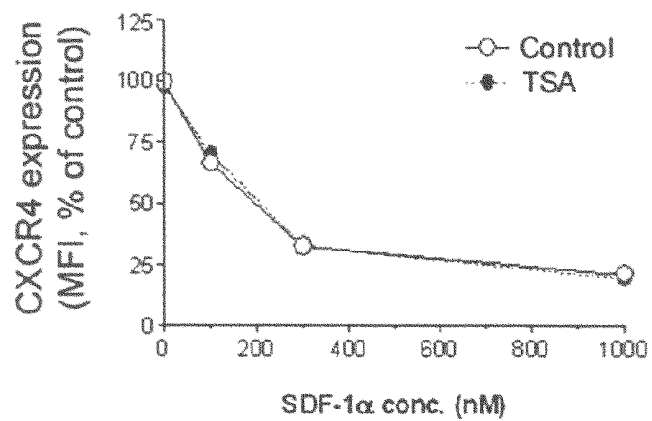
2B



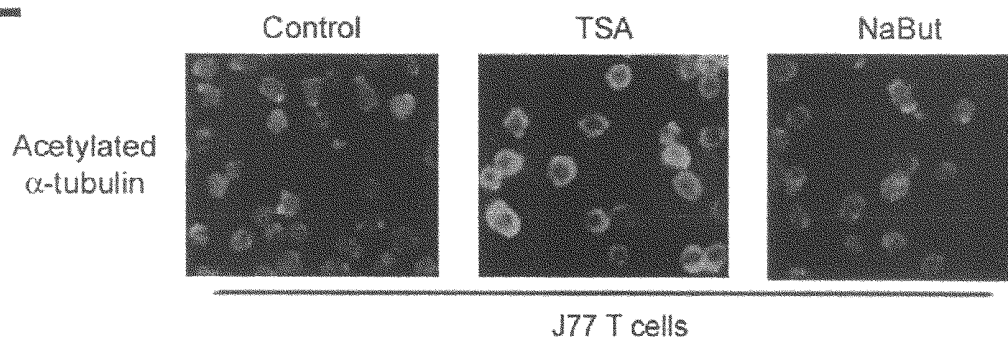
2C



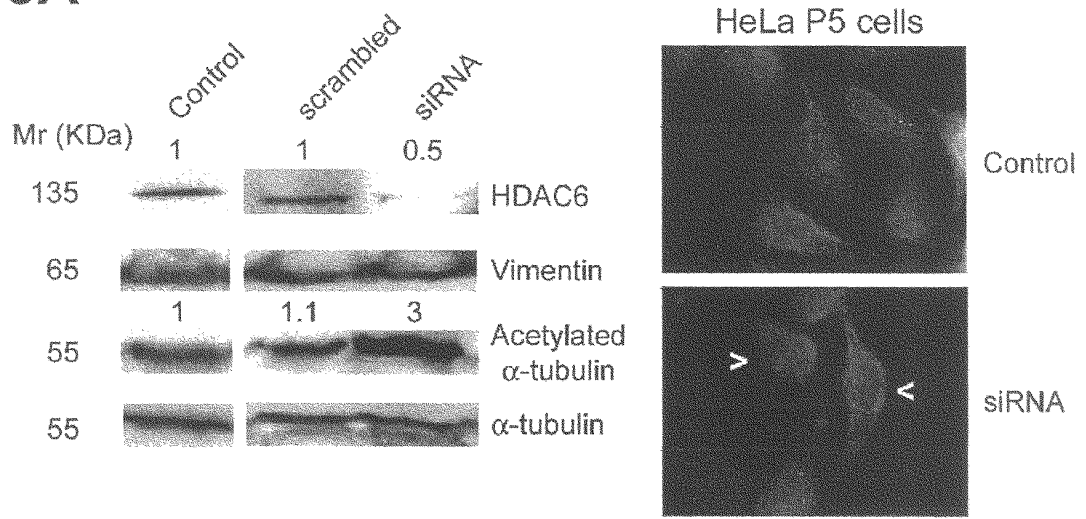
2D



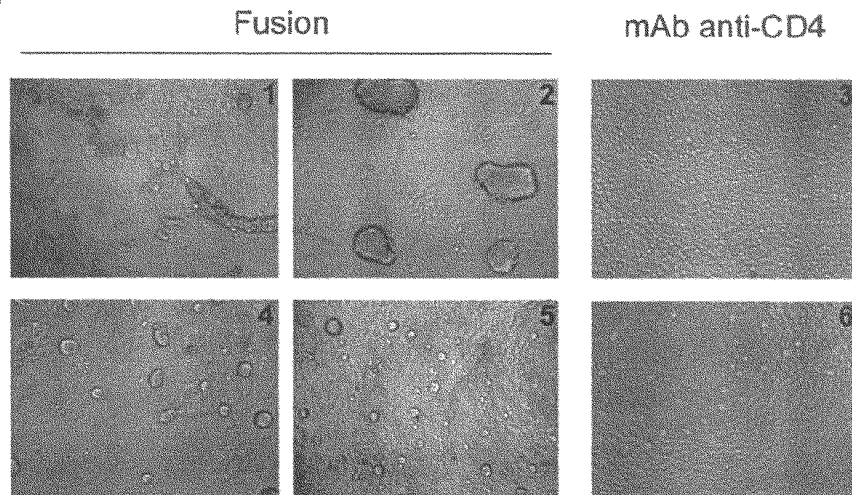
2E



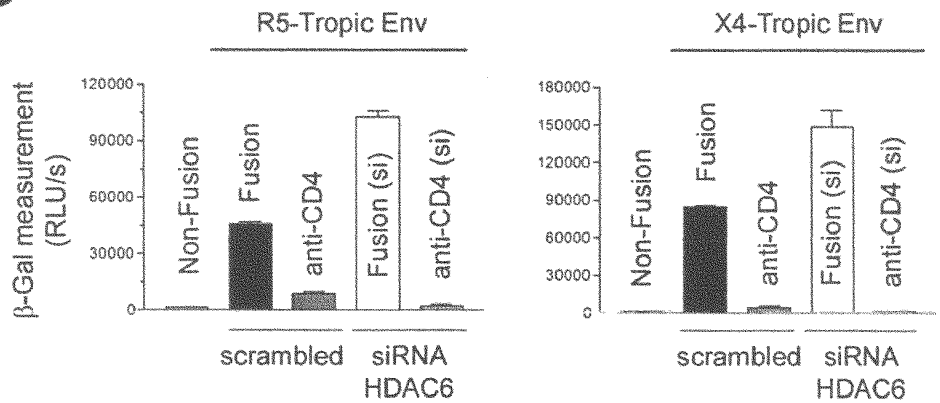
3A



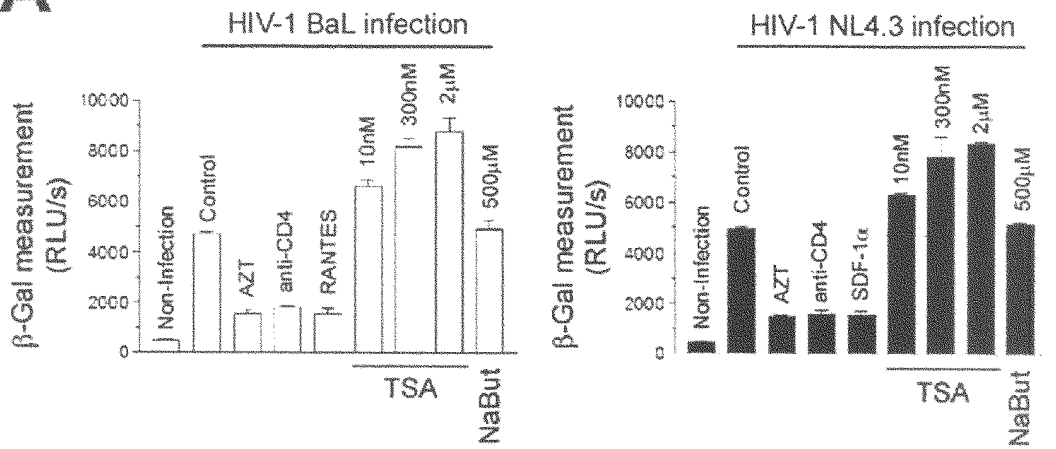
3B



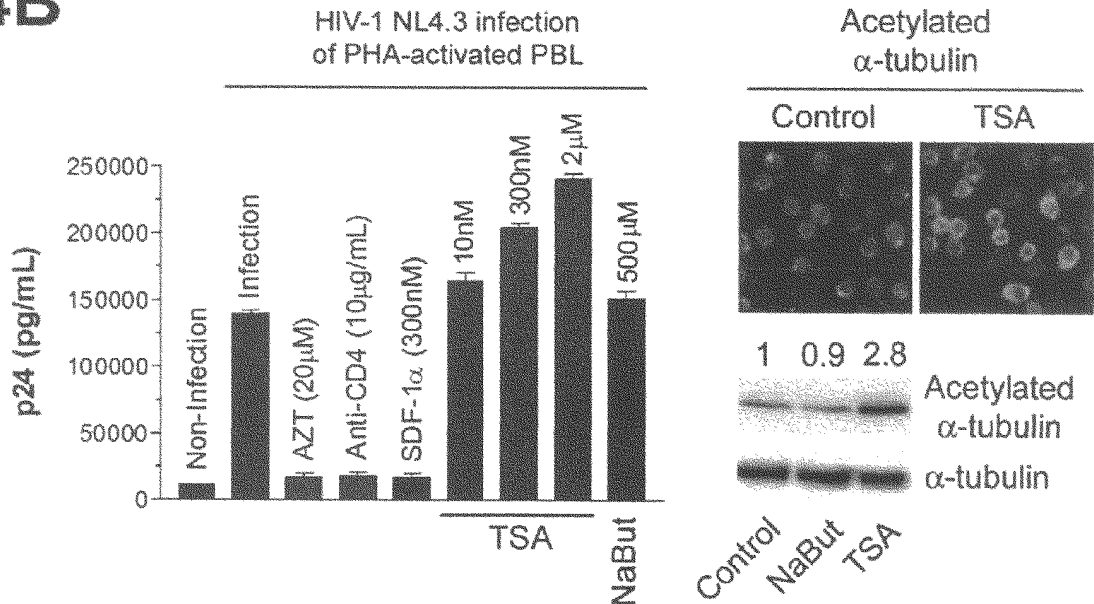
3C



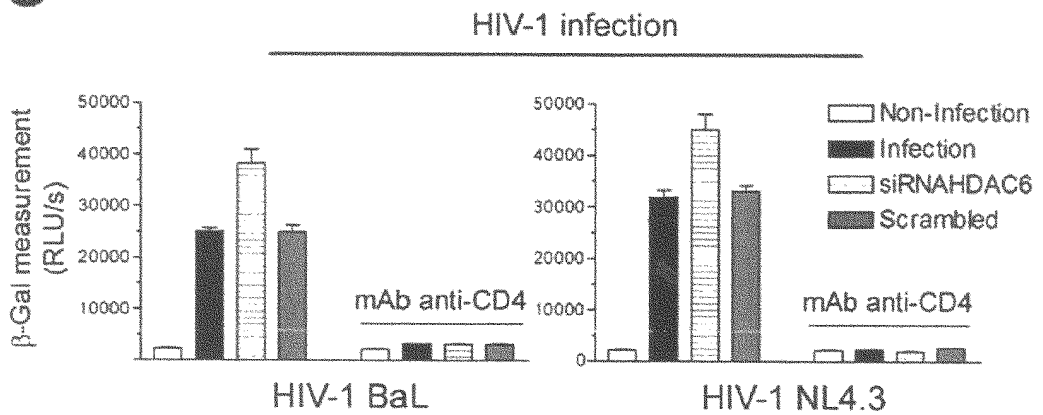
4A



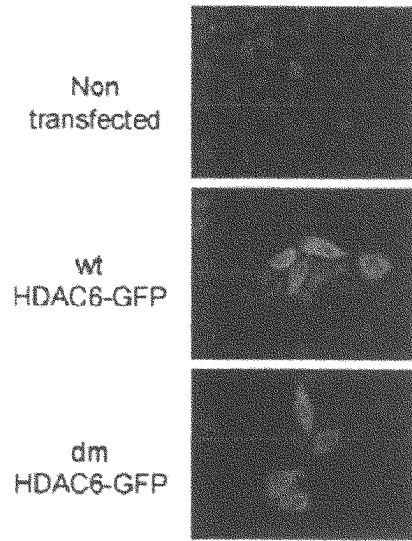
4B



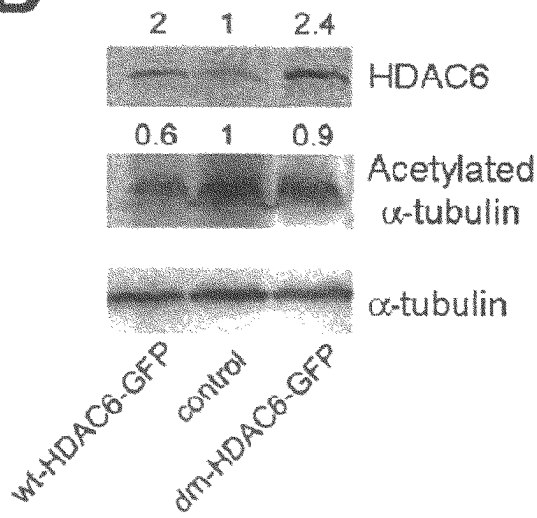
4C



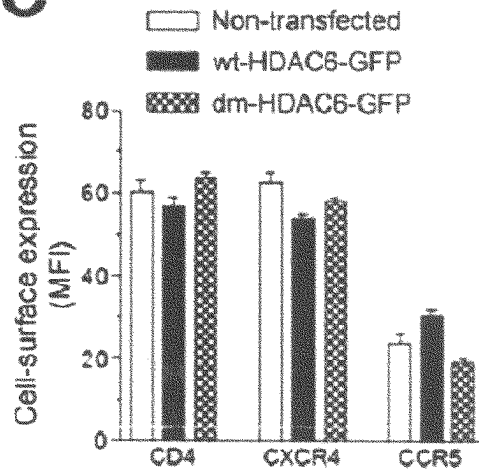
5A



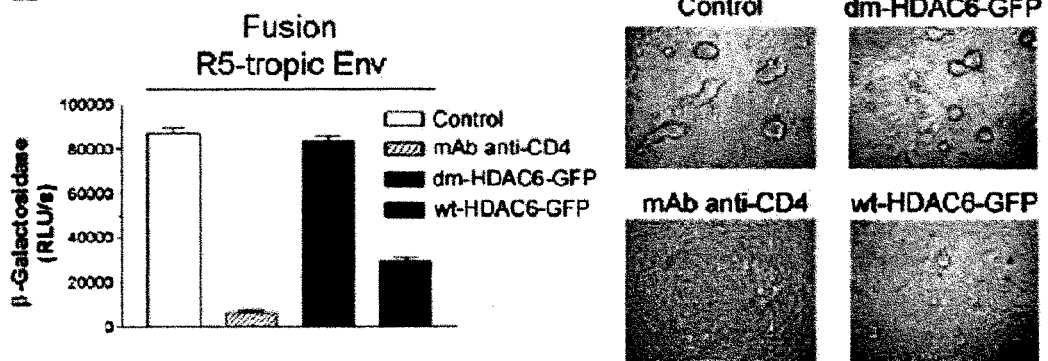
5B



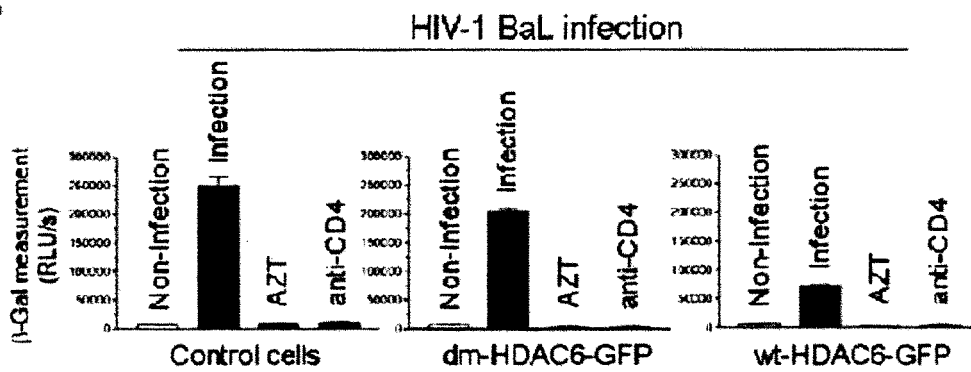
5C



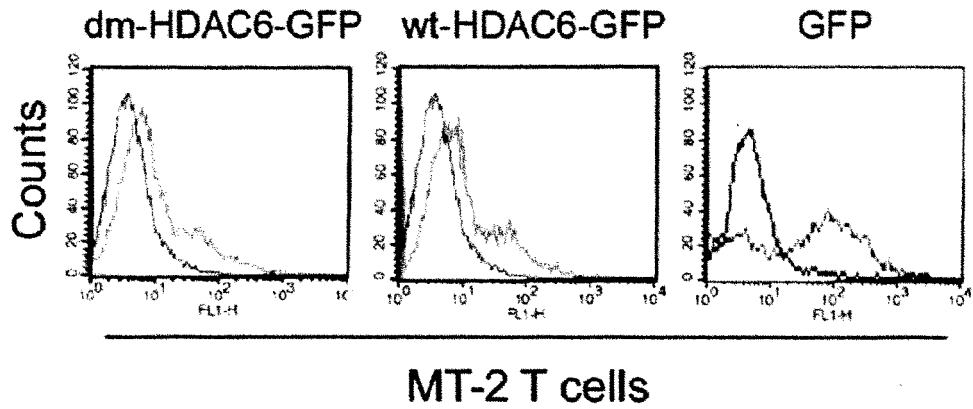
5D



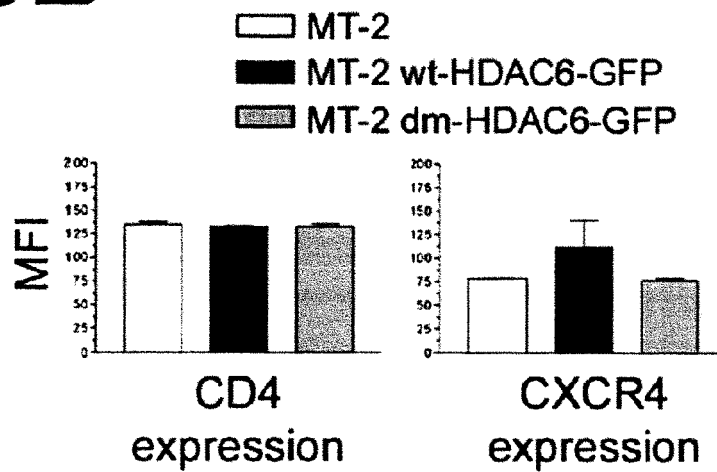
5E



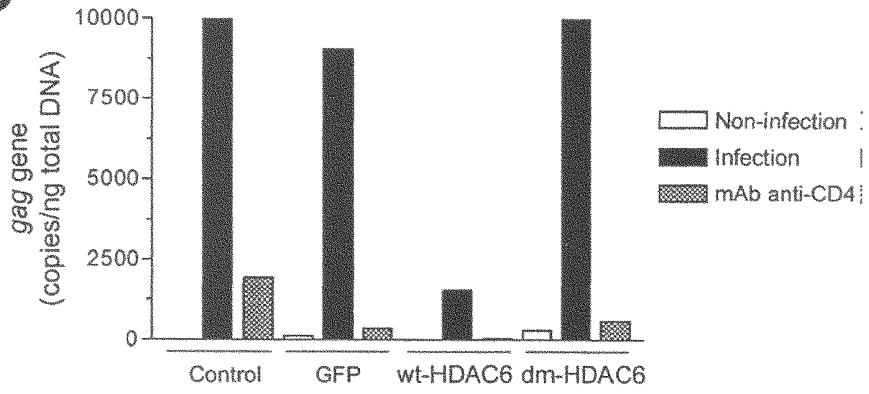
6A



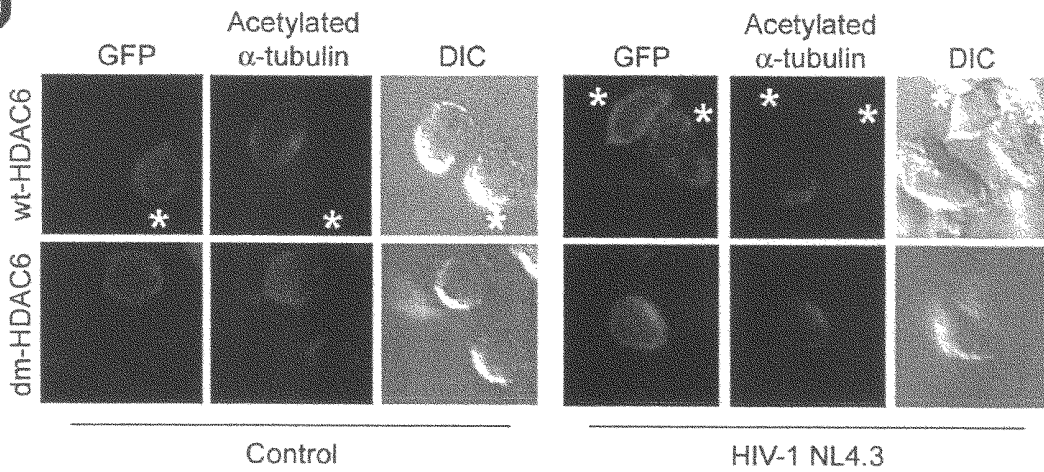
6B



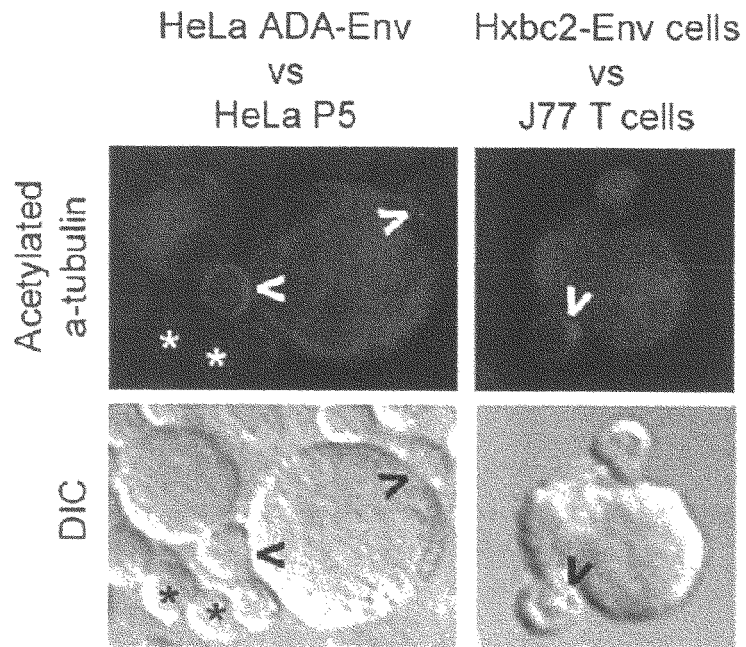
6C



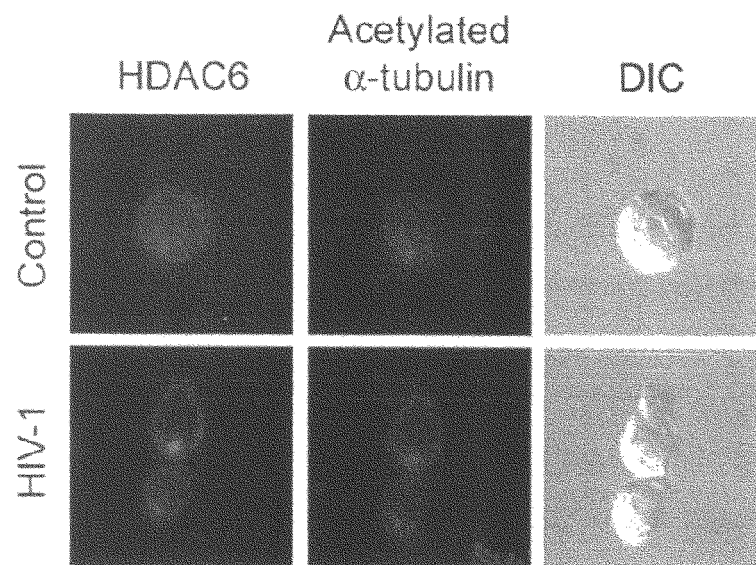
6D



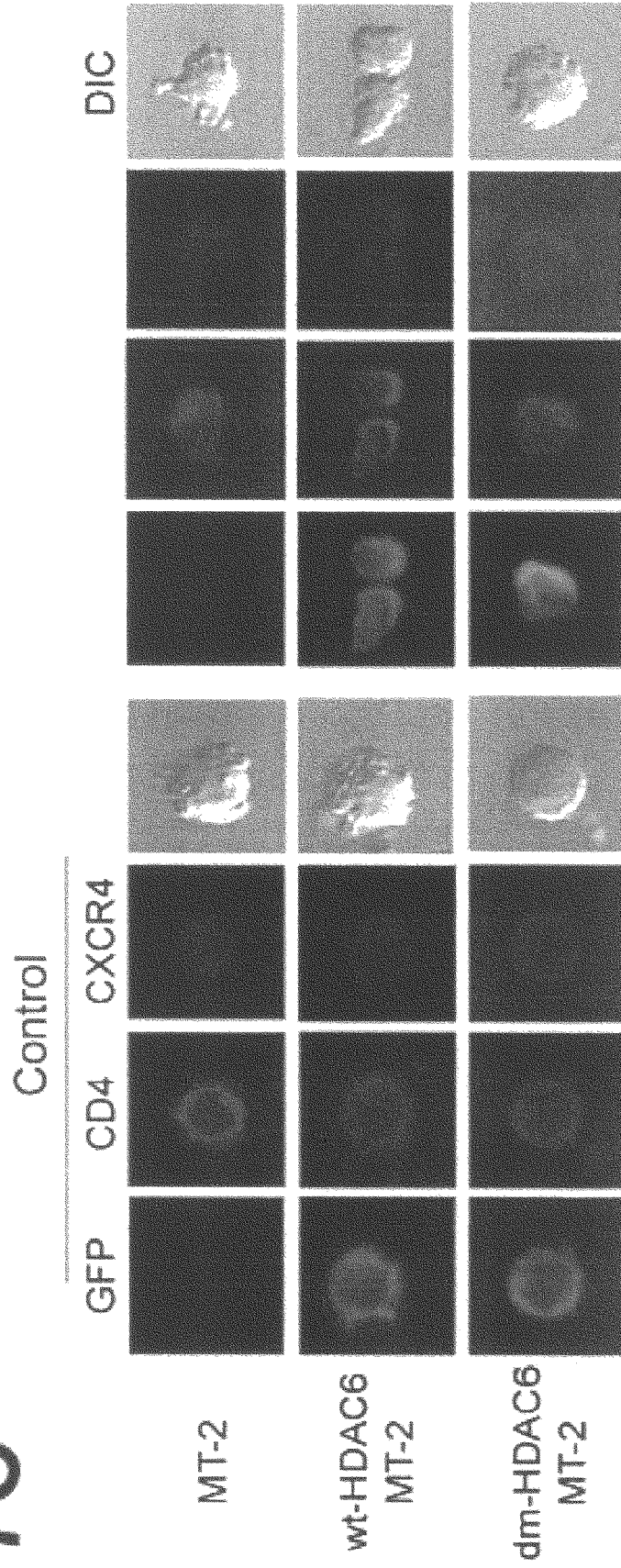
7A



7B



7C



ES 2 326 348 A2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

5 <120> USO DE COMPUESTOS AGONISTAS DE LA ACTIVIDAD TUBULINA DESACETILASA DE HDAC6
EN LA ELABORACIÓN DE COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS, DICHAS COMPOSICIONES FAR-
MACÉUTICAS Y SUS APLICACIONES EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES VIRALES

10 <130> P574/2005

<160> 2

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3648

20 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(3648)

<223> Secuencia codificante de HDAC6

30 <400> 1

	atg	acc	tca	acc	ggc	cag	gat	tcc	acc	aca	acc	agg	cag	cga	aga	agt	48
	Met	Thr	Ser	Thr	Gly	Gln	Asp	Ser	Thr	Thr	Thr	Arg	Gln	Arg	Arg	Ser	
	1				5					10					15		
35	agg	cag	aac	ccc	cag	tcg	ccc	cct	cag	gac	tcc	agt	gtc	act	tcg	aag	96
	Arg	Gln	Asn	Pro	Gln	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Ser	Ser	Val	Thr	Ser	Lys	
				20					25					30			
40	cga	aat	att	aaa	aag	gga	gcc	gtt	ccc	cgc	tct	atc	ccc	aat	cta	gcg	144
	Arg	Asn	Ile	Lys	Lys	Gly	Ala	Val	Pro	Arg	Ser	Ile	Pro	Asn	Leu	Ala	
			35					40					45				
45	gag	gta	aag	aag	aaa	ggc	aaa	atg	aag	aag	ctc	ggc	caa	gca	atg	gaa	192
	Glu	Val	Lys	Lys	Lys	Gly	Lys	Met	Lys	Lys	Leu	Gly	Gln	Ala	Met	Glu	
		50				55						60					
50	gaa	gac	cta	atc	gtg	gga	ctg	caa	ggg	atg	gat	ctg	aac	ctt	gag	gct	240
	Glu	Asp	Leu	Ile	Val	Gly	Leu	Gln	Gly	Met	Asp	Leu	Asn	Leu	Glu	Ala	
					70						75					80	
55	gaa	gca	ctg	gct	ggc	act	ggc	ttg	gtg	ttg	gat	gag	cag	tta	aat	gaa	288
	Glu	Ala	Leu	Ala	Gly	Thr	Gly	Leu	Val	Leu	Asp	Glu	Gln	Leu	Asn	Glu	
					85				90						95		
60	ttc	cat	tgc	ctc	tgg	gat	gac	agc	ttc	ccg	gaa	ggc	cct	gag	cgg	ctc	336
	Phe	His	Cys	Leu	Trp	Asp	Asp	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	
				100					105					110			
65	cat	gcc	atc	aag	gag	caa	ctg	atc	cag	gag	ggc	ctc	cta	gat	cgc	tgc	384
	His	Ala	Ile	Lys	Glu	Gln	Leu	Ile	Gln	Glu	Gly	Leu	Leu	Asp	Arg	Cys	
			115				120						125				
70	gtg	tcc	ttt	cag	gcc	cgg	ttt	gct	gaa	aag	gaa	gag	ctg	atg	ttg	gtt	432
	Val	Ser	Phe	Gln	Ala	Arg	Phe	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Leu	Met	Leu	Val	
			130				135					140					
75	cac	agc	cta	gaa	tat	att	gat	ctg	atg	gaa	aca	acc	cag	tac	atg	aat	480
	His	Ser	Leu	Glu	Tyr	Ile	Asp	Leu	Met	Glu	Thr	Thr	Gln	Tyr	Met	Asn	
					150						155					160	
80	gag	gga	gaa	ctc	cgt	gtc	cta	gca	gac	acc	tac	gac	tca	gtt	tat	ctg	528

ES 2 326 348 A2

	Glu	Gly	Glu	Leu	Arg 165	Val	Leu	Ala	Asp	Thr 170	Tyr	Asp	Ser	Val	Tyr 175	Leu	
5	cat His	ccg Pro	aac Asn	tca Ser	tac Tyr	tcc Ser	tgt Cys	gcc Ala	tgc Cys	ctg Leu	gcc Ala	tca Ser	ggc Gly	tct Ser	gtc Val	ctc Leu	576
10	agg Arg	ctg Leu	gtg Val	gat Asp	gcg Ala	gtc Val	ctg Leu	ggg Gly	gct Ala	gag Glu	atc Ile	cgg Arg	aat Asn	ggc Gly	atg Met	gcc Ala	624
15	atc Ile	att Ile	agg Arg	cct Pro	cct Pro	gga Gly	cat His	cac His	gcc Ala	cag Gln	cac His	agt Ser	ctt Leu	atg Met	gat Asp	ggc Gly	672
20	tat Tyr	tgc Cys	atg Met	ttc Phe	aac Asn	cac His	gtg Val	gct Ala	gtg Val	gca Ala	gcc Ala	cgc Arg	tat Tyr	gct Ala	caa Gln	cag Gln	720
25	aaa Lys	cac His	cgc Arg	atc Ile	cgg Arg	agg Arg	gtc Val	ctt Leu	atc Ile	gta Val	gat Asp	tgg Trp	gat Asp	gtg Val	cac His	cac His	768
30	ggc Gly	caa Gln	gga Gly	aca Thr	cag Gln	ttc Phe	acc Thr	ttc Phe	gac Asp	cag Gln	gac Asp	ccc Pro	agt Ser	gtc Val	ctc Leu	tat Tyr	816
35	ttc Phe	tcc Ser	atc Ile	cac His	cgc Arg	tac Tyr	gag Glu	cag Gln	ggc Gly	agg Arg	ttc Phe	tgg Trp	ccc Pro	cac His	ctg Leu	aag Lys	864
40	gcc Ala	tct Ser	aac Asn	tgg Trp	tcc Ser	acc Thr	aca Thr	ggc Gly	ttc Phe	ggc Gly	caa Gln	ggc Gly	caa Gln	gga Gly	tat Tyr	acc Thr	912
45	atc Ile	aat Asn	gtg Val	cct Pro	tgg Trp	aac Asn	cag Gln	gtg Val	ggg Gly	atg Met	cgg Arg	gat Asp	gct Ala	gac Asp	tac Tyr	att Ile	960
50	gct Ala	gct Ala	ttc Phe	ctg Leu	cac His	gtc Val	ctg Leu	ctg Leu	cca Pro	gtc Val	gcc Ala	ctc Leu	gag Glu	ttc Phe	cag Gln	cct Pro	1008
55	cag Gln	ctg Leu	gtc Val	ctg Leu	gtg Val	gct Ala	gct Ala	gga Gly	ttt Phe	gat Asp	gcc Ala	ctg Leu	caa Gln	ggg Gly	gac Asp	ccc Pro	1056
60	aag Lys	ggc Gly	gag Glu	atg Met	gcc Ala	gcc Ala	act Thr	ccg Pro	gca Ala	ggg Gly	ttc Phe	gcc Ala	cag Gln	cta Leu	acc Thr	cac His	1104
65	ctg Leu	ctc Leu	atg Met	ggc Gly	ctg Leu	gca Ala	gga Gly	ggc Gly	aag Lys	ctg Leu	atc Ile	ctg Leu	tct Ser	ctg Leu	gag Glu	ggc Gly	1152
70	ggc Gly	tac Tyr	aac Asn	ctc Leu	cgc Arg	gcc Ala	ctg Leu	gct Ala	gaa Glu	ggc Gly	gtc Val	agt Ser	gct Ala	tcg Ser	ctc Leu	cac His	1200
75	acc Thr	ctt Leu	ctg Leu	gga Gly	gac Asp	cct Pro	tgc Cys	ccc Pro	atg Met	ctg Leu	gag Glu	tca Ser	cct Pro	ggc Gly	gcc Ala	ccc Pro	1248
80	tgc Cys	cgg Arg	agt Ser	gcc Ala	cag Gln	gct Ala	tca Ser	ggt Val	tcc Ser	tgt Cys	gct Ala	ctg Leu	gaa Glu	gcc Ala	ctt Leu	gag Glu	1296
85	ccc	ttc	tgg	gag	ggt	ctt	gtg	aga	tca	act	gag	acc	gtg	gag	agg	gac	1344

ES 2 326 348 A2

	Pro	Phe	Trp	Glu	Val	Leu	Val	Arg	Ser	Thr	Glu	Thr	Val	Glu	Arg	Asp	
			435					440					445				
5	aac	atg	gag	gag	gac	aat	gta	gag	gag	agc	gag	gag	gaa	gga	ccc	tgg	1392
	Asn	Met	Glu	Glu	Asp	Asn	Val	Glu	Glu	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	Pro	Trp	
		450					455					460					
10	gag	ccc	cct	gtg	ctc	cca	atc	ctg	aca	tgg	cca	gtg	cta	cag	tct	cgc	1440
	Glu	Pro	Pro	Val	Leu	Pro	Ile	Leu	Thr	Trp	Pro	Val	Leu	Gln	Ser	Arg	
	465					470					475					480	
15	aca	ggg	ctg	gtc	tat	gac	caa	aat	atg	atg	aat	cac	tgc	aac	ttg	tgg	1488
	Thr	Gly	Leu	Val	Tyr	Asp	Gln	Asn	Met	Met	Asn	His	Cys	Asn	Leu	Trp	
					485					490					495		
20	gac	agc	cac	cac	cct	gag	gta	ccc	cag	cgc	atc	ttg	cgg	atc	atg	tgc	1536
	Asp	Ser	His	His	Pro	Glu	Val	Pro	Gln	Arg	Ile	Leu	Arg	Ile	Met	Cys	
				500					505					510			
25	cg	ctg	gag	gag	ctg	ggc	ctt	gcc	ggg	cg	tgc	ctc	acc	ctg	aca	ccg	1584
	Arg	Leu	Glu	Glu	Leu	Gly	Leu	Ala	Gly	Arg	Cys	Leu	Thr	Leu	Thr	Pro	
			515					520					525				
30	cg	cct	gcc	aca	gag	gct	gag	ctg	ctc	acc	tgt	cac	agt	gct	gag	tac	1632
	Arg	Pro	Ala	Thr	Glu	Ala	Glu	Leu	Leu	Thr	Cys	His	Ser	Ala	Glu	Tyr	
		530					535					540					
35	gtg	ggt	cat	ctc	cgg	gcc	aca	gag	aaa	atg	aaa	acc	cgg	gag	ctg	cac	1680
	Val	Gly	His	Leu	Arg	Ala	Thr	Glu	Lys	Met	Lys	Thr	Arg	Glu	Leu	His	
	545					550					555					560	
40	cg	gag	agt	tcc	aac	ttt	gac	tcc	atc	tat	atc	tgc	ccc	agt	acc	ttc	1728
	Arg	Glu	Ser	Ser	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Tyr	Ile	Cys	Pro	Ser	Thr	Phe	
					565					570					575		
45	gcc	tgt	gca	cag	ctt	gcc	act	ggc	gct	gcc	tgc	cg	ctg	gtg	gag	gct	1776
	Ala	Cys	Ala	Gln	Leu	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Cys	Arg	Leu	Val	Glu	Ala	
				580				585						590			
50	gtg	ctc	tca	gga	gag	ggt	ctg	aat	ggt	gct	gct	gtg	gtg	cgt	ccc	cca	1824
	Val	Leu	Ser	Gly	Glu	Val	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala	Val	Val	Arg	Pro	Pro	
			595					600					605				
55	gga	cac	cac	gca	gag	cag	gat	gca	gct	tgc	ggt	ttt	tgc	ttt	ttc	aac	1872
	Gly	His	His	Ala	Glu	Gln	Asp	Ala	Ala	Cys	Gly	Phe	Cys	Phe	Phe	Asn	
		610					615					620					
60	tct	gtg	gct	gtg	gct	gct	cg	cat	gcc	cag	act	atc	agt	ggg	cat	gcc	1920
	Ser	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Arg	His	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Gly	His	Ala	
	625					630					635					640	
65	cta	cgg	atc	ctg	att	gtg	gat	tgg	gat	gtc	cac	cac	ggt	aat	gga	act	1968
	Leu	Arg	Ile	Leu	Ile	Val	Asp	Trp	Asp	Val	His	His	Gly	Asn	Gly	Thr	
					645					650					655		
70	cag	cac	atg	ttt	gag	gat	gac	ccc	agt	gtg	cta	tat	gtg	tcc	ctg	cac	2016
	Gln	His	Met	Phe	Glu	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Leu	Tyr	Val	Ser	Leu	His	
				660					665					670			
75	cg	tat	gat	cat	ggc	acc	ttc	ttc	ccc	atg	ggg	gat	gag	ggt	gcc	agc	2064
	Arg	Tyr	Asp	His	Gly	Thr	Phe	Phe	Pro	Met	Gly	Asp	Glu	Gly	Ala	Ser	
			675				680						685				
80	agc	cag	atc	ggc	cgg	gct	gcg	ggc	aca	ggc	ttc	acc	gtc	aac	gtg	gca	2112
	Ser	Gln	Ile	Gly	Arg	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Val	Asn	Val	Ala	
		690					695					700					
85	tgg	aac	ggg	ccc	cg	atg	ggt	gat	gct	gac	tac	cta	gct	gcc	tgg	cat	2160

ES 2 326 348 A2

	Trp 705	Asn	Gly	Pro	Arg	Met 710	Gly	Asp	Ala	Asp	Tyr 715	Leu	Ala	Ala	Trp	His 720	
5	cgc Arg	ctg Leu	gtg Val	ctt Leu	ccc Pro	att Ile	gcc Ala	tac Tyr	gag Glu	ttt Phe	aac Asn	cca Pro	gaa Glu	ctg Leu	gtg Val	ctg Leu	2208
					725					730					735		
10	gtc Val	tca Ser	gct Ala	ggc Gly	ttt Phe	gat Asp	gct Ala	gca Ala	cgg Arg	ggg Gly	gat Asp	ccg Pro	ctg Leu	ggg Gly	ggc Gly	tgc Cys	2256
				740					745					750			
15	cag Gln	gtg Val	tca Ser	cct Pro	gag Glu	ggt Gly	tat Tyr	gcc Ala	cac His	ctc Leu	acc Thr	cac His	ctg Leu	ctg Leu	atg Met	ggc Gly	2304
			755					760					765				
20	ctt Leu	gcc Ala	agt Ser	ggc Gly	cgc Arg	att Ile	atc Ile	ctt Leu	atc Ile	cta Leu	gag Glu	ggg Gly	ggc Gly	tat Tyr	aac Asn	ctg Leu	2352
		770					775					780					
25	aca Thr	tcc Ser	atc Ile	tca Ser	gag Glu	tcc Ser	atg Met	gct Ala	gcc Ala	tgc Cys	act Thr	cgc Arg	tcc Ser	ctc Leu	ctt Leu	gga Gly	2400
						790					795					800	
30	gac Asp	cca Pro	cca Pro	ccc Pro	ctg Leu	ctg Leu	acc Thr	ctg Leu	cca Pro	cgg Arg	ccc Pro	cca Pro	cta Leu	tca Ser	ggg Gly	gcc Ala	2448
				805						810					815		
35	ctg Leu	gcc Ala	tca Ser	atc Ile	act Thr	gag Glu	acc Thr	atc Ile	caa Gln	gtc Val	cat His	cgc Arg	aga Arg	tac Tyr	tgg Trp	cgc Arg	2496
			820						825					830			
40	agc Ser	tta Leu	cgg Arg	gtc Val	atg Met	aag Lys	gta Val	gaa Glu	gac Asp	aga Arg	gaa Glu	gga Gly	ccc Pro	tcc Ser	agt Ser	tct Ser	2544
			835					840					845				
45	aag Lys	ttg Leu	gtc Val	acc Thr	aag Lys	aag Lys	gca Ala	ccc Pro	caa Gln	cca Pro	gcc Ala	aaa Lys	cct Pro	agg Arg	tta Leu	gct Ala	2592
		850					855					860					
50	gag Glu	cgg Arg	atg Met	acc Thr	aca Thr	cga Arg	gaa Glu	aag Lys	aag Lys	gtt Val	ctg Leu	gaa Glu	gca Ala	ggc Gly	atg Met	ggg Gly	2640
						870					875					880	
55	aaa Lys	gtc Val	acc Thr	tcg Ser	gca Ala	tca Ser	ttt Phe	ggg Gly	gaa Glu	gag Glu	tcc Ser	act Thr	cca Pro	ggc Gly	cag Gln	act Thr	2688
					885				890						895		
60	aac Asn	tca Ser	gag Glu	aca Thr	gct Ala	gtg Val	gtg Val	gcc Ala	ctc Leu	act Thr	cag Gln	gac Asp	cag Gln	ccc Pro	tca Ser	gag Glu	2736
				900					905					910			
65	gca Ala	gcc Ala	aca Thr	ggg Gly	gga Gly	gcc Ala	act Thr	ctg Leu	gcc Ala	cag Gln	acc Thr	att Ile	tct Ser	gag Glu	gca Ala	gcc Ala	2784
			915					920					925				
70	att Ile	ggg Gly	gga Gly	gcc Ala	atg Met	ctg Leu	ggc Gly	cag Gln	acc Thr	acc Thr	tca Ser	gag Glu	gag Glu	gct Ala	gtc Val	ggg Gly	2832
		930					935					940					
75	gga Gly	gcc Ala	act Thr	ccg Pro	gac Asp	cag Gln	acc Thr	acc Thr	tca Ser	gag Glu	gag Glu	act Thr	gtg Val	gga Gly	gga Gly	gcc Ala	2880
				945		950					955					960	
80	att Ile	ctg Leu	gac Asp	cag Gln	acc Thr	acc Thr	tca Ser	gag Glu	gat Asp	gct Ala	ggt Val	ggg Gly	gga Gly	gcc Ala	acg Thr	ctg Leu	2928
				965					970					975			
85	ggc	cag	act	acc	tca	gag	gag	gct	gta	gga	gga	gct	aca	ctg	gcc	cag	2976

ES 2 326 348 A2

	Gly	Gln	Thr	Thr	ser	Glu	Glu	Ala	Val	Gly	Gly	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	
				980					985					990			
5	acc Thr	atc Ile	tcg Ser	gag Glu	gca Ala	gcc Ala	atg Met	gag Glu	gga Gly	gcc Ala	aca Thr	ctg Leu	gac Asp	cag Gln	act Thr	acg Thr	3024
			995				1000						1005				
10	tca Ser	gag Glu	gag Glu	gct Ala	cca Pro	ggg Gly	ggc Gly	acc Thr	gag Glu	ctg Leu	atc Ile	caa Gln	act Thr	cct Pro	cta Leu		3069
		1010					1015					1020					
15	gcc Ala	tcg Ser	agc Ser	aca Thr	gac Asp	cac His	cag Gln	acc Thr	ccc Pro	cca Pro	acc Thr	tca Ser	cct Pro	gtg Val	cag Gln		3114
		1025					1030					1035					
20	gga Gly	act Thr	aca Thr	ccc Pro	cag Gln	ata Ile	tct Ser	ccc Pro	agt Ser	aca Thr	ctg Leu	att Ile	ggg Gly	agt Ser	ctc Leu		3159
		1040					1045					1050					
25	agg Arg	acc Thr	ttg Leu	gag Glu	cta Leu	ggc Gly	agc Ser	gaa Glu	tct Ser	cag Gln	ggg Gly	gcc Ala	tca Ser	gaa Glu	tct Ser		3204
		1055					1060					1065					
30	cag Gln	gcc Ala	cca Pro	gga Gly	gag Glu	gag Glu	aac Asn	cta Leu	cta Leu	gga Gly	gag Glu	gca Ala	gct Ala	gga Gly	ggt Gly		3249
		1070					1075					1080					
35	cag Gln	gac Asp	atg Met	gct Ala	gat Asp	tcg Ser	atg Met	ctg Leu	atg Met	cag Gln	gga Gly	tct Ser	agg Arg	ggc Gly	ctc Leu		3294
		1085					1090					1095					
40	act Thr	gat Asp	cag Gln	gcc Ala	ata Ile	ttt Phe	tat Tyr	gct Ala	gtg Val	aca Thr	cca Pro	ctg Leu	ccc Pro	tgg Trp	tgt Cys		3339
		1100					1105					1110					
45	ccc Pro	cat His	ttg Leu	gtg Val	gca Ala	gta Val	tgc Cys	ccc Pro	ata Ile	cct Pro	gca Ala	gca Ala	ggc Gly	cta Leu	gac Asp		3384
		1115					1120					1125					
50	gtg Val	acc Thr	caa Gln	cct Pro	tgt Cys	ggg Gly	gac Asp	tgt Cys	gga Gly	aca Thr	atc Ile	caa Gln	gag Glu	aat Asn	tgg Trp		3429
		1130					1135					1140					
55	gtg Val	tgt Cys	ctc Leu	tct Ser	tgc Cys	tat Tyr	cag Gln	gtc Val	tac Tyr	tgt Cys	ggt Gly	cgt Arg	tac Tyr	atc Ile	aat Asn		3474
		1145					1150					1155					
60	ggc Gly	cac His	atg Met	ctc Leu	caa Gln	cac His	cat His	gga Gly	aat Asn	tct Ser	gga Gly	cac His	ccg Pro	ctg Leu	gtc Val		3519
		1160					1165					1170					
65	ctc Leu	agc Ser	tac Tyr	atc Ile	gac Asp	ctg Leu	tca Ser	gcc Ala	tgg Trp	tgt Cys	tac Tyr	tac Tyr	tgt Cys	cag Gln	gcc Ala		3564
		1175					1180					1185					
70	tat Tyr	gtc Val	cac His	cac His	cag Gln	gct Ala	ctc Leu	cta Leu	gat Asp	gtg Val	aag Lys	aac Asn	atc Ile	gcc Ala	cac His		3609
		1190					1195					1200					
75	cag Gln	aac Asn	aag Lys	ttt Phe	ggg Gly	gag Glu	gat Asp	atg Met	ccc Pro	cac His	cca Pro	cac His	taa				3648
		1205					1210					1215					

<210> 2

<211> 1215

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 326 348 A2

<400> 2

1 Met Thr Ser Thr Gly Gln Asp Ser Thr Thr Thr Arg Gln Arg Arg Ser
 5 Arg Gln Asn Pro Gln Ser Pro Pro Gln Asp Ser Ser Val Thr Ser Lys
 10 Arg Asn Ile Lys Lys Gly Ala Val Pro Arg Ser Ile Pro Asn Leu Ala
 15 Glu Val Lys Lys Lys Gly Lys Met Lys Lys Leu Gly Gln Ala Met Glu
 20 Glu Asp Leu Ile Val Gly Leu Gln Gly Met Asp Leu Asn Leu Glu Ala
 25 Glu Ala Leu Ala Gly Thr Gly Leu Val Leu Asp Glu Gln Leu Asn Glu
 30 Phe His Cys Leu Trp Asp Asp Ser Phe Pro Glu Gly Pro Glu Arg Leu
 35 His Ala Ile Lys Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Leu Leu Asp Arg Cys
 40 Val Ser Phe Gln Ala Arg Phe Ala Glu Lys Glu Glu Leu Met Leu Val
 45 His Ser Leu Glu Tyr Ile Asp Leu Met Glu Thr Thr Gln Tyr Met Asn
 50 Glu Gly Glu Leu Arg Val Leu Ala Asp Thr Tyr Asp Ser Val Tyr Leu
 55 His Pro Asn Ser Tyr Ser Cys Ala Cys Leu Ala Ser Gly Ser Val Leu
 60 Arg Leu Val Asp Ala Val Leu Gly Ala Glu Ile Arg Asn Gly Met Ala
 65 Ile Ile Arg Pro Pro Gly His His Ala Gln His Ser Leu Met Asp Gly
 Tyr Cys Met Phe Asn His Val Ala Val Ala Ala Arg Tyr Ala Gln Gln
 Lys His Arg Ile Arg Arg Val Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His
 Gly Gln Gly Thr Gln Phe Thr Phe Asp Gln Asp Pro Ser Val Leu Tyr

ES 2 326 348 A2

			260					265					270			
5	Phe	Ser	Ile 275	His	Arg	Tyr	Glu	Gln 280	Gly	Arg	Phe	Trp	Pro 285	His	Leu	Lys
10	Ala	Ser 290	Asn	Trp	Ser	Thr	Thr 295	Gly	Phe	Gly	Gln	Gly 300	Gln	Gly	Tyr	Thr
15	Ile 305	Asn	Val	Pro	Trp	Asn 310	Gln	Val	Gly	Met	Arg 315	Asp	Ala	Asp	Tyr	Ile 320
20	Ala	Ala	Phe	Leu	His 325	Val	Leu	Leu	Pro	Val 330	Ala	Leu	Glu	Phe	Gln 335	Pro
25	Gln	Leu	Val	Leu 340	Val	Ala	Ala	Gly	Phe 345	Asp	Ala	Leu	Gln	Gly 350	Asp	Pro
30	Lys	Gly	Glu 355	Met	Ala	Ala	Thr	Pro 360	Ala	Gly	Phe	Ala	Gln 365	Leu	Thr	His
35	Leu	Leu 370	Met	Gly	Leu	Ala	Gly 375	Gly	Lys	Leu	Ile	Leu 380	Ser	Leu	Glu	Gly
40	Gly 385	Tyr	Asn	Leu	Arg	Ala 390	Leu	Ala	Glu	Gly	Val 395	Ser	Ala	Ser	Leu	His 400
45	Thr	Leu	Leu	Gly	Asp 405	Pro	Cys	Pro	Met	Leu 410	Glu	Ser	Pro	Gly	Ala 415	Pro
50	Cys	Arg	Ser	Ala 420	Gln	Ala	Ser	Val	Ser 425	Cys	Ala	Leu	Glu	Ala 430	Leu	Glu
55	Pro	Phe	Trp 435	Glu	Val	Leu	Val	Arg 440	Ser	Thr	Glu	Thr	Val 445	Glu	Arg	Asp
60	Asn	Met 450	Glu	Glu	Asp	Asn	Val 455	Glu	Glu	Ser	Glu	Glu 460	Glu	Gly	Pro	Trp
65	Glu 465	Pro	Pro	Val	Leu	Pro 470	Ile	Leu	Thr	Trp	Pro 475	Val	Leu	Gln	Ser	Arg 480
70	Thr	Gly	Leu	Val	Tyr 485	Asp	Gln	Asn	Met	Met 490	Asn	His	Cys	Asn	Leu 495	Trp
75	Asp	Ser	His	His 500	Pro	Glu	Val	Pro	Gln 505	Arg	Ile	Leu	Arg	Ile 510	Met	Cys
80	Arg	Leu	Glu 515	Glu	Leu	Gly	Leu	Ala 520	Gly	Arg	Cys	Leu	Thr 525	Leu	Thr	Pro
85	Arg	Pro	Ala	Thr	Glu	Ala	Glu	Leu	Leu	Thr	Cys	His	Ser	Ala	Glu	Tyr

ES 2 326 348 A2

	530					535						540					
5	Val 545	Gly	His	Leu	Arg	Ala 550	Thr	Glu	Lys	Met	Lys 555	Thr	Arg	Glu	Leu	His 560	
10	Arg	Glu	Ser	Ser	Asn 565	Phe	Asp	Ser	Ile	Tyr 570	Ile	Cys	Pro	Ser	Thr 575	Phe	
15	Ala	Cys	Ala	Gln 580	Leu	Ala	Thr	Gly	Ala 585	Ala	Cys	Arg	Leu	Val 590	Glu	Ala	
20	Val	Leu	Ser 595	Gly	Glu	Val	Leu	Asn 600	Gly	Ala	Ala	Val	Val 605	Arg	Pro	Pro	
25	Gly	His 610	His	Ala	Glu	Gln	Asp 615	Ala	Ala	Cys	Gly	Phe 620	Cys	Phe	Phe	Asn	
30	Ser 625	Val	Ala	Val	Ala	Ala 630	Arg	His	Ala	Gln	Thr 635	Ile	Ser	Gly	His	Ala 640	
35	Leu	Arg	Ile	Leu	Ile 645	Val	Asp	Trp	Asp	Val 650	His	His	Gly	Asn	Gly 655	Thr	
40	Gln	His	Met	Phe 660	Glu	Asp	Asp	Pro	Ser 665	Val	Leu	Tyr	Val	Ser 670	Leu	His	
45	Arg	Tyr	Asp 675	His	Gly	Thr	Phe	Phe 680	Pro	Met	Gly	Asp	Glu 685	Gly	Ala	Ser	
50	Ser	Gln	Ile	Gly	Arg	Ala	Ala 695	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr 700	Val	Asn	Val	Ala	
55	Trp 705	Asn	Gly	Pro	Arg	Met 710	Gly	Asp	Ala	Asp	Tyr 715	Leu	Ala	Ala	Trp	His 720	
60	Arg	Leu	Val	Leu	Pro 725	Ile	Ala	Tyr	Glu	Phe 730	Asn	Pro	Glu	Leu	Val 735	Leu	
65	Val	Ser	Ala	Gly 740	Phe	Asp	Ala	Ala	Arg 745	Gly	Asp	Pro	Leu	Gly 750	Gly	Cys	
70	Gln	Val	Ser 755	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala 760	His	Leu	Thr	His	Leu 765	Leu	Met	Gly	
75	Leu	Ala 770	Ser	Gly	Arg	Ile	Ile 775	Leu	Ile	Leu	Glu	Gly 780	Gly	Tyr	Asn	Leu	
80	Thr 785	Ser	Ile	Ser	Glu	Ser 790	Met	Ala	Ala	Cys	Thr 795	Arg	Ser	Leu	Leu	Gly 800	
85	Asp	Pro	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Leu	Pro	Arg	Pro	Pro	Leu	Ser	Gly	Ala	

ES 2 326 348 A2

				805					810					815			
5	Leu	Ala	Ser	Ile 820	Thr	Glu	Thr	Ile	Gln 825	Val	His	Arg	Arg	Tyr 830	Trp	Arg	
10	Ser	Leu	Arg 835	Val	Met	Lys	Val	Glu 840	Asp	Arg	Glu	Gly	Pro 845	Ser	Ser	Ser	
15	Lys	Leu 850	Val	Thr	Lys	Lys	Ala 855	Pro	Gln	Pro	Ala	Lys 860	Pro	Arg	Leu	Ala	
20	Glu 865	Arg	Met	Thr	Thr	Arg 870	Glu	Lys	Lys	Val	Leu 875	Glu	Ala	Gly	Met	Gly 880	
25	Lys	Val	Thr	Ser	Ala 885	Ser	Phe	Gly	Glu	Glu 890	Ser	Thr	Pro	Gly	Gln 895	Thr	
30	Asn	Ser	Glu	Thr 900	Ala	Val	Val	Ala	Leu 905	Thr	Gln	Asp	Gln	Pro 910	Ser	Glu	
35	Ala	Ala	Thr 915	Gly	Gly	Ala	Thr	Leu 920	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser 925	Glu	Ala	Ala	
40	Ile	Gly 930	Gly	Ala	Met	Leu	Gly 935	Gln	Thr	Thr	Ser	Glu 940	Glu	Ala	Val	Gly	
45	Gly 945	Ala	Thr	Pro	Asp	Gln 950	Thr	Thr	Ser	Glu	Glu 955	Thr	Val	Gly	Gly	Ala 960	
50	Ile	Leu	Asp	Gln 965	Thr	Thr	Ser	Glu	Asp	Ala 970	Val	Gly	Gly	Ala	Thr 975	Leu	
55	Gly	Gln	Thr	Thr 980	Ser	Glu	Glu	Ala	Val 985	Gly	Gly	Ala	Thr	Leu 990	Ala	Gln	
60	Thr	Ile	Ser 995	Glu	Ala	Ala	Met	Glu 1000	Gly	Ala	Thr	Leu	Asp 1005	Gln	Thr	Thr	
65	Ser	Glu 1010	Glu	Ala	Pro	Gly	Gly 1015	Thr	Glu	Leu	Ile	Gln 1020	Thr	Pro	Leu		
70	Ala	Ser 1025	Ser	Thr	Asp	His	Gln 1030	Thr	Pro	Pro	Thr	Ser 1035	Pro	Val	Gln		
75	Gly	Thr 1040	Thr	Pro	Gln	Ile	Ser 1045	Pro	Ser	Thr	Leu	Ile 1050	Gly	Ser	Leu		
80	Arg	Thr 1055	Leu	Glu	Leu	Gly	Ser 1060	Glu	Ser	Gln	Gly	Ala 1065	Ser	Glu	Ser		
85	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu	Asn	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly		

ES 2 326 348 A2

	1070					1075						1080			
5	Gln	Asp	Met	Ala	Asp	Ser	Met	Leu	Met	Gln	Gly	Ser	Arg	Gly	Leu
		1085					1090					1095			
10	Thr	Asp	Gln	Ala	Ile	Phe	Tyr	Ala	Val	Thr	Pro	Leu	Pro	Trp	Cys
		1100					1105					1110			
15	Pro	His	Leu	Val	Ala	Val	Cys	Pro	Ile	Pro	Ala	Ala	Gly	Leu	Asp
		1115					1120					1125			
20	Val	Thr	Gln	Pro	Cys	Gly	Asp	Cys	Gly	Thr	Ile	Gln	Glu	Asn	Trp
		1130					1135					1140			
25	Val	Cys	Leu	Ser	Cys	Tyr	Gln	Val	Tyr	Cys	Gly	Arg	Tyr	Ile	Asn
		1145					1150					1155			
30	Gly	His	Met	Leu	Gln	His	His	Gly	Asn	Ser	Gly	His	Pro	Leu	Val
		1160					1165					1170			
35	Leu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Leu	Ser	Ala	Trp	Cys	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala
		1175					1180					1185			
40	Tyr	Val	His	His	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp	Val	Lys	Asn	Ile	Ala	His
		1190					1195					1200			
45	Gln	Asn	Lys	Phe	Gly	Glu	Asp	Met	Pro	His	Pro	His			
		1205					1210					1215			