



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 234**

51 Int. Cl.:

C07K 16/42 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03753618 .2**

96 Fecha de presentación : **07.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1558649**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

54 Título: **Péptido modulador de la activación de caspasa.**

30 Prioridad: **09.10.2002 FI 20021798**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2010

73 Titular/es: **Elena Ivanovna Dudich**
Sportivnaya ul. 11-55 Chekhov Dis.
Moskoskaya Obl.
Lyubichany 142380, RU
Eduard Borisovich Tatulov

72 Inventor/es: **Dudich, Elena Ivanova;**
Semenkova, Lidia Nikolaevna;
Dudich, Igor Vyacheslavovich;
Tatulov, Eduard Borisovich;
Zubov, Dmitry Lvovich y
Korpela, Timo Kalevi

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

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

DESCRIPCIÓN

Péptido modulador de la activación de caspasa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la medicina y a mecanismos de muerte de células humanas y animales. En particular, la invención se refiere a péptidos capaces de inhibir la muerte celular apoptótica inducida por diferentes factores. La invención describe péptidos con dichas actividades y métodos de producción y uso de dichos péptidos.

10 **Antecedentes de la invención**

La apoptosis es una forma activa de muerte celular que está implicada en múltiples procesos del desarrollo celular normal, así como en transformaciones de células malignas. El mecanismo de apoptosis está implicado en sucesos biológicos inducidos por diversos tipos de fármacos, citoquinas y factores de crecimiento, estrés oxidativo, radiación, envejecimiento, enfermedades autoinmunes y rechazo inmune en el trasplante de órganos. Estudios recientes sobre apoptosis demuestran que se emplean mecanismos moleculares comunes en diversos tipos de apoptosis, inducidos por hormonas, citoquinas, carencia de factor de crecimiento, agentes quimioterapéuticos, radiación ionizante, trastornos inmunológicos, SIDA, cáncer y envejecimiento (Nagata, (1997) *Cell* 88, 355-365).

La activación similar a una cascada de las proteasas caspasas representa el punto fundamental en la inducción de apoptosis (Cohen, *et al.* (1997) *Biochem. J.* 326: 1-16). Se describen dos tipos diferentes de señalización de apoptosis. La fase inicial del desencadenamiento de apoptosis dependiente de receptor incluye la activación de receptores de muerte apropiados mediante ligandos específicos, tales como TNF o FasL, que son actualmente los inductores de apoptosis más estudiados (Wallach *et al.* (1997) *FEBS Letters*, 410: 96-106). Después de la activación, los receptores de muerte de la superficie celular, Fas (CD95) o TNFR1, se unen a proteínas adaptadoras citosólicas (FADD, MORT, RIP, TRADD), que, a su vez, reclutan caspasa-8 para activar la cascada de proteasas (caspasas) de la familia de la enzima convertidora de interleuquina-1- β ICE/CED-3, seguida de la activación de la subfamilia de CPP32/caspasa-3 de cisteína proteasas, cuyos miembros aparecen en el citoplasma celular en forma de precursores latentes, procaspasas (Enari, *et al.* (1996) *Nature* 380: 723-726). Los tipos de apoptosis independientes de receptor habitualmente incluyen mecanismos inducibles por el citocromo c de importancia crítica que requieren la formación del complejo terciario del citocromo c, dATP, Apaf-1 y procaspasa-9, que conduce a la activación de la última mediante autoproteólisis y homodimerización, y la posterior activación de la cascada de caspasas (Liu *et al.* (1996) *Cell*, 86: 147-157; Pan *et al.*, (1998) *FEBS Letters*, 426: 151-154; Slee *et al.*, (1999) *J Cell Biol.*, 144: 281-292).

Los agentes que afectan al control biológico de la apoptosis tienen, por lo tanto, una potencial utilidad terapéutica en numerosas aplicaciones clínicas. Una serie de inhibidores de apoptosis obtenidos de plantas se emplean para seleccionar trastornos patológicos que a menudo acompañan a la quimioterapia, radiación, trastornos inmunes, o SIDA. Estos suplementos contienen generalmente carbohidratos, grasas e hidrolizados de proteínas vegetales, lectinas, y fosfolípidos (US6004579, Barr *et al.*). Podían emplearse potentes reguladores de apoptosis en el tratamiento de pacientes de cáncer para controlar la terapia con citoquinas, quimioterapia, o radioterapia. Los mecanismos apoptóticos operan en los diversos tipos de trastornos inmunológicos, tales como neoplasias malignas autoinmunes, rechazo inmune en trasplante de órganos o anafilaxis, o infecciones víricas por el virus de inmunodeficiencia humana.

La alfa-fetoproteína (AFP) es una glucoproteína fetal asociada a tumores que muestra una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo regulación del crecimiento celular, diferenciación de células inmaduras, inmunosupresión de células inmunes activadas, inducción de apoptosis específica de tumores y regulación de señales apoptóticas mediadas por otros factores, así como regulación de diversas expresiones génicas (Deutsch, (1991) *Adv. Cancer Res.*, 56: 253-312; Mizejewsky, (1997) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 215: 333-362). Múltiples pruebas de actividades reguladoras del crecimiento celular, incluyendo actividad supresora de tumores, se han descrito para diversas especies de molécula de AFP de longitud completa (Semenkova *et al.*, (1997) *Tumor Biology*, 18: 261-274; Semeniuk *et al.*, (1995) *Ad Exper. Med. Biol.*, 383: 255-269; Sonnenschein *et al.*, (1980) *J Natl Cancer Inst.*, 64: 1141-1146; Soto *et al.*, (1980) *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 77: 2084-2087; Jacobson *et al.*, (1999) *Cancer Research*, 50: 415-420), sus fragmentos proteolíticos (Dudich *et al.*, (1999) *Biochemistry*, 38: 10406-10414) o dominios recombinantes (Festin *et al.*, (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1427: 307-314) y péptidos sintéticos (Mesfin *et al.*, (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, 1501: 33-43; Mizejewsky, *et al.*, (1996) *Mol. Cell. Endocr.*, 118: 15-23 (1996). La búsqueda de la ubicación de sitios activos funcionales de la molécula de AFP que sean responsables de sus múltiples actividades ha sido realizada por diversos investigadores. La ubicación de los sitios de unión de ácido araquidónico y estradiol ha tenido éxito (Deutsch, (1991) *Adv. Cancer Res.*, 56: 253-312; Mizejewski, (1997) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 215: 333-362; Nishi *et al.*, (1993) *Tumor Biol.* 14: 234-243).

Recientemente se demostró, que la AFP realiza su actividad supresora de tumores desencadenando apoptosis mediante la activación de caspasa-3 e independientemente de la señalización de Fas/FasL y TNF/TNFR (Dudich *et al.*, (1999) *Eur. J Biochem.* 266: 1-13; Semenkova *et al.*, (1997) *Tumor Biology*, 18: 261-274; Dudich *et al.* (1998) *Tumor Biology*, 19: 30-40). Se han descrito múltiples pruebas de la supresión del crecimiento de células tumorales mediada por AFP en la última década, pero el sitio activo de la molécula de AFP que es responsable de la señalización de apoptosis no ha sido identificado.

El ADN y las secuencias de aminoácidos de la AFP humana se han descrito (Morinaga, *et al.*, "Primary structures of human alpha-fetoprotein and its mRNA" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4604-4608 (1983). Péptidos sintéticos, correspondientes al sitio de unión a E2 demostraron poseer actividad supresora de tumores (Patentes de Estados Unidos US5674842; 10/1997 Mizejewsky; US5707963.07/1998 Mizejewsky). Diversas proteínas biológicamente activas comparten una homología de secuencia con AFP (Mizejewsky, (1993) BioEssays, 15: 427-432; Mizejewsky, (1997) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 215: 333-362). Se ha identificado una auténtica homología de AFP con diversas proteínas, implicadas en la señalización de apoptosis, tales como Bcl2, TNFR1, Fas, etc. (Mizejewsky, (2001) Proc. Soc. Exp. Biol. Med). El documento WO 9835981 A1 (Economou, J. *et al.*, 1998) describe el uso de 66 secuencias peptídicas de AFP que son útiles para inmunización contra el cáncer. Uno de los péptidos, A20, era CRGDVLDCL, que a propósito incluye una parte del sitio activo de AFP, descubierto por la presente invención. Sin embargo, no se descubrió ningún efecto especial del péptido CRGDVLDCL y la presente invención sigue siendo la primera capaz de identificar uno de los supuestos sitios biológicamente activos de AFP. Además, los péptidos de la presente invención incluyen un resto cisteína adicional que permite la formación de puentes disulfuro intercatenarios y producir una actividad biológica significativamente más alta que la secuencia CRGDVLDCL.

Un importante sitio de unión a integrina es un tripéptido Arg-Gly-Asp, que está presente en una serie de ligandos de integrina. Las integrinas son glucoproteínas heterodiméricas que median interacciones célula-matriz y célula-célula y tienen un papel activo en los procesos de diferenciación celular, reconocimiento inmune, desarrollo tumoral y crecimiento metastático. Se han identificado regiones de contacto para la secuencia Arg-Gly-Asp en las subunidades de integrina (véase Pasqualini, *et al.* "A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an Arg-Gly-Asp-binding site on integrins". J Cell Biol. (1995) 130: 1189-1196). Los péptidos sintéticos que contienen el motivo Arg-Gly-Asp se usan como inhibidores de interacciones integrina-ligando (D'Souza *et al.* (1988) Science, 242: 91-93). Se ha descrito que los péptidos sintéticos que contienen el motivo Arg-Gly-Asp son capaces de dirigir la activación de caspasa-3 (Bukley, *et al.* (1999) Nature, 397: 534-539). La AFP contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) en su secuencia que localizó en el dominio II en la posición 253-255. De acuerdo con la presente invención, la secuencia RGD es parte del sitio funcionalmente activo de AFP implicado en la señalización de apoptosis.

La presente invención describe la parte mínima de la molécula de AFP que es responsable de la señalización de apoptosis. Los péptidos pequeños u otros pequeños haptenos son importantes reguladores que se usarán como fármacos, puesto que pueden sintetizarse *in vitro* y no producen anticuerpos neutralizadores. Los péptidos que contienen de 6 a 10 restos se produjeron con ayuda de la química en fase sólida F-MOC. Los péptidos similares que corresponden a secuencias homólogas de albúmina de suero humano (HSA) también se sintetizaron. Se evaluó la capacidad reguladora del crecimiento de todos los péptidos en células completas en cultivo y también se ensayó su capacidad para inducir directamente la activación de caspasa en extractos citosólicos sin células. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de los péptidos para modular la apoptosis inducida por AFP y anticuerpos monoclonales (Mab) CH-11 citotóxicos anti-Fas en células completas y para afectar a la activación de caspasa inducida por el citocromo c en sistemas sin células.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una presentación esquemática de un péptido dimérico biológicamente activo (el monómero denominado en este documento como apociclina-A; *Cys-Cys-Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp-Cys*)

La figura 2 muestra la inhibición de apoptosis inducida por AFP por el péptido 9-mero cíclico multimérico apociclina-A (*Cys-Cys-Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp-Cys*). Células U-937 en pocillos de microvaloración se trataron durante 15 minutos con diversas dosis de apociclina-A y seguidamente se añadieron 3 μ M de AFP humana pura a cada pocillo. La proliferación celular se evaluó mediante un ensayo de incorporación de [^{3} H]-timidina después de 24 h de incubación.

La figura 3 muestra el efecto de el péptido 9-mero multimérico cíclico apociclina-A (*Cys-Cys-Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp-Cys*) sobre la apoptosis inducida en células U-937 mediante anticuerpos monoclonales CH-11 anti-Fas citotóxicos. Las células se trataron durante 15 minutos con 500 μ M de apociclina-A y seguidamente se añadieron diversas dosis de Mab CH-11 anti-Fas citotóxicos (Immunotech Ltd.) a cada pocillo. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de incorporación de [^{3} H]-timidina después de 16 h de incubación.

La figura 4 muestra los efectos de péptidos 6-meros lineales Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp (RGDVLD) e His-Gly-Asp-Leu-Leu-Glu (HGDLLLE) sobre la supresión del crecimiento mediada por AFP de células U-937. Las células se trataron durante 15 minutos con diversas dosis de los péptidos y seguidamente se añadieron 3 μ M de AFP humana pura a cada pocillo. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de incorporación de [^{3} H]-timidina después de 24 h de incubación.

La figura 5 muestra el efecto del péptido 9-mero monomérico cíclico *Cys-Gly-Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp-Cys* (*CGRGDVLDLC*) sobre la supresión del crecimiento mediada por AFP de la línea celular de mieloblastoma humano U-937. Las células se trataron durante 15 minutos con diversas dosis del péptido y seguidamente se añadieron 3 μ M de AFP humana pura a cada pocillo. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de incorporación de [^{3} H]-timidina después de 24 h de incubación.

La figura 6 muestra que el péptido 9-mero cíclico apociclina-A (*CCRGDVLDLC*) potencia la activación de procaspasa-3 dependiente de ATP en un extracto citosólico sin células inducida por bajas dosis de citocromo c (Cyt c). Los

extractos celulares de células U937 se incubaron durante 40 minutos con diversas dosis de apociclina-A y 1 mM de dATP. Los extractos incubados sin adiciones se tomaron como control. La activación de caspasa-3 se evaluó mediante escisión del sustrato fluorogénico DEVD-AFC.

La figura 7 muestra la potenciación sinérgica de la activación de caspasa mediada por el citocromo c en un sistema sin células con AFP humana. (A) la AFP induce la activación de caspasa-3 en extractos citosólicos sin células en presencia de dATP. Alícuotas de extracto citosólico obtenido de HepG2 (25 μ g de proteína) se trataron durante diversos intervalos de tiempo con AFP (7 μ M) o como control con la misma dosis de HSA en presencia de dATP (1 mM) y a continuación se ensayó su actividad DEVDasa. (B) Potenciación sinérgica de la activación de caspasa-3 mediada por AFP en presencia de la dosis subóptima de citocromo c exógeno en extractos citosólicos de células HepG2. Alícuotas del extracto citosólico obtenido de HepG2 (25 μ g de proteína) se trataron durante diversos intervalos de tiempo con AFP (10 μ M), citocromo c (0,2 μ M) o con una combinación de las mismas dosis de ambos compuestos en presencia de dATP (1 mM) y a continuación se ensayó su actividad DEVDasa. (C) la AFP afecta de forma diferente a la activación de caspasa-3 en extractos citosólicos sin células inducidos por diversas dosis de citocromo c. Alícuotas de extracto citosólico S100 (25 μ g de proteína) se trataron durante 30 minutos con AFP (10 μ M) y diversas dosis de citocromo c en presencia de dATP (1 mM) y a continuación se ensayó su actividad DEVDasa. Se muestra la media $\pm$ SD de cuatro determinaciones.

La figura 8 muestra los efectos de péptidos apociclina-A *CCRGDVLDC*, CGRGDVLDC, *CCHGDLLEC*, RGDVLD y HGDLLE sobre la activación de caspasa inducida por el Cyt c dependiente de dATP en extractos citosólicos sin células de células HepG2 a dosis alta (165 nM) de citocromo c endógeno (A) y dosis baja (110 nM) de citocromo c endógeno (B). Se añadieron péptidos a la concentración de 750 μ M a los extractos celulares 15 minutos antes de la adición del citocromo c. La activación de caspasa se supervisó mediante la escisión del sustrato fluorogénico específico de caspasa-3, DEVD-AMC.

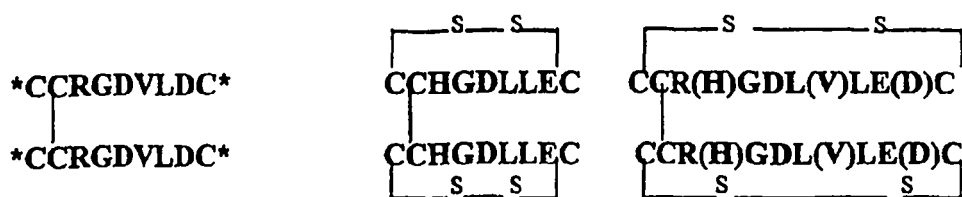
La figura 9 muestra que el péptido 9-mero multimérico cíclico apociclina-A (*CCRGDVLDC*) suprime la activación de caspasa-3 mediada por citocromo c/AFP en un sistema sin células. Alícuotas de extracto citosólico obtenido de HepG2 se pre-trataron durante 15 minutos con 750 μ M de apociclina-A y a continuación se trataron durante 40 minutos con 10 μ M de AFP y/o 110 nM (A) u 80 nM (B) de citocromo c en presencia de 1 mM de dATP. La activación de caspasa se supervisó mediante la escisión del sustrato fluorogénico específico de caspasa-3, DEVD-AMC.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la invención proporciona péptidos, y en particular, péptidos cíclicos multiméricos sintéticos artificiales, capaces de regular la muerte celular apoptótica. Más específicamente, la presente invención se refiere a la secuencia de aminoácidos original en la molécula de alfa-fetoproteína humana (AFP) o albúmina responsable de la regulación de apoptosis en células tumorales.

La AFP es una glucoproteína fetal asociada a tumores que muestra una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo regulación del crecimiento celular, diferenciación de células inmaduras, supresión inmune de células inmunes activadas, inducción de apoptosis específica de tumores y regulación de señales apoptóticas mediadas por otros factores y regulación de la expresión génica. Recientemente se demostró que la AFP puede inducir apoptosis selectiva de tumores mediante activación directa o indirecta de caspasa-3 en células completas y en un sistema sin células (Dudich *et al.*, 1999, J.Eur. Biochem. 266, 750-761). De acuerdo con la presente invención, el sitio activo de dichos efectos se descubrió en AFP así como en albúmina. Los péptidos que forman los sitios activos se modelaron y gran número de péptidos sintéticos naturales y no naturales se cribaron por sus propiedades biológicas.

Los péptidos de acuerdo con la presente invención pueden usarse para la inhibición de diversos tipos de muertes celulares que dependen de la activación de la cascada de caspasas mediada por el citocromo c, por ejemplo, apoptosis inducida por estrés oxidativo, fármacos, citoquinas, Fas-ligando, alfa-fetoproteína. Los péptidos pueden utilizarse para prevenir apoptosis en células en cultivo, para aumentar la conservación de órganos para el trasplante de órganos, para prevenir trastornos autoinmunes inmunológicos y síndrome de inmunodeficiencia inducido por infección vírica, efectos secundarios citotóxicos después de la quimioterapia y radioterapia. También se proporcionan secuencias de aminoácidos de los péptidos y métodos de producción y uso de los péptidos. Las estructuras más activas de los péptidos son péptidos sintéticos no naturales que tienen una forma molecular rígida como:



La presente invención se llevó a cabo para determinar el sitio activo de la molécula de AFP responsable de desencadenar apoptosis en células tumorales usando enfoques teóricos y experimentales. Se formuló una hipótesis de que el péptido activo, que modela el sitio activo, podría inducir directamente apoptosis en células completas y desencadena la activación de caspasa-3 en un sistema sin células o podría modular señales apoptóticas, inducidas por AFP y/o otros factores apoptóticos, tales como anti-Fas o citocromo-c. Curiosamente, un péptido cíclico sintético *Cys-Cys-Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp-Cys* (denominado en este documento apociclina-A), modelaba una parte de la molécula de AFP, compartiendo una auténtica homología con varias caspasas, parecía ser biológicamente activa. Una serie de análisis y sustituciones de aminoácidos en la secuencia de apociclina-A pretendía identificar los aminoácidos funcionalmente importantes. Gran número de péptidos relacionados con apociclina-A también se sintetizaron. Se ensayó la capacidad de todos los péptidos para afectar a la supervivencia de células tumorales en cultivo y para afectar a la activación de caspasa en lisados citosólicos sin células. La siguiente etapa del ensayo de péptidos era estudiar la capacidad de péptidos para afectar a la apoptosis inducida por AFP, anti-Fas en células completas y para modular la activación de caspasa mediada por el Cyt c en un sistema sin células. Se demostró que el péptido 9-mero apociclina-A correspondiente a la secuencia de AFP 251-259 suprimía completamente la apoptosis mediada por AFP en células tumorales *in vitro* y modula significativamente la activación de caspasa mediada por Cyt-c y AFP en extractos citosólicos sin células. Más específicamente, en un sistema sin células, la apociclina-A potenciaba significativamente la activación de caspasa mediada por citocromo c a dosis baja y reducía los efectos inducidos por citocromo c a dosis alta.

Un péptido 6-mero más corto p25, conservaba parcialmente esta actividad en un sistema sin células, pero no en las células completas. También se demostró que los péptidos obtenidos de AFP mostraban un antagonismo mutuo en la regulación de la activación de caspasa mediada por el Cyt c en extractos celulares. Se observó que el péptido 9-mero apociclina-A apoyaba moderadamente los efectos mediados por Cyt c a dosis bajas e inhibía significativamente la activación de caspasa desencadenada por altas dosis de citocromo c exógeno o endógeno. Estos datos muestran que el péptido 9-mero obtenido de AFP apociclina-A es la parte mínima de AFP que es responsable de la unión específica con moléculas citosólicas desconocidas implicadas en la señalización de apoptosis. La estructura definida de este péptido y su naturaleza artificial implican que puede ser el componente activo de un nuevo fármaco que se opone a la acción de diversos factores apoptóticos *in vitro* e *in vivo*. Las aplicaciones de este péptido incluyen prevenir la apoptosis en células cultivadas, métodos para prevenir el rechazo inmunológico de trasplantes alogénicos y rechazos autoinmunes, métodos para evitar choque séptico hematológico y apoptosis inducida por terapia de citoquinas, etc.

Las abreviaturas para aminoácidos como se usan en este documento se dan en la siguiente tabla:

Ala	A	Alanina
Asp	D	Ácido aspártico
Glu	E	Glutamina
Arg	R	Arginina
Cys	C	Cisteína
Val	V	Valina
Leu	L	Leucina
Gly	G	Glicina
Xaa	X	Cualquier aminoácido

Para descubrir la parte mínima de la molécula de AFP que es responsable de la señalización de apoptosis, se produjeron péptidos que contenían de 6 a 10 restos mediante química en fase sólida F-MOC. También se sintetizaron péptidos similares correspondientes a la secuencia homóloga de albúmina de suero humano (HSA). Se evaluó la capacidad reguladora del crecimiento de todos los péptidos en células completas en cultivo y también se ensayó su capacidad para afectar directamente a la activación de caspasa en extractos citosólicos sin células. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de los péptidos para modular apoptosis inducida por AFP y Mab CH-11 citotóxicos anti-Fas en células completas y también para afectar a la activación de caspasa inducida por el cyt c en un sistema sin células. El péptido cíclico artificial *CCRGDVLDC* (los asteriscos indican un potencial puente disulfuro) que contiene el motivo Arg-Gly-Asp (RGD) correspondiente a la secuencia 251-259 de α -fetoproteína humana (AFP), péptido cíclico homólogo con sustitución de Cys₂₅₂ por Gly *CGRGDVLDC* y el péptido lineal RGDVLD correspondiente a los restos 253-258 se produjeron mediante química en fase sólida F-MOC. Los péptidos cíclicos homólogos obtenidos a partir de la secuencia de albúmina de suero humano *CCHGDLLEC*, *CGHGDLLEC* y el péptido lineal HGD LLE también se sintetizaron y se usaron como controles funcionales. Debe admitirse que los péptidos que solamente contienen la secuencia RCD difieren drásticamente de los de la presente invención.

El péptido que contiene RGD cíclico multimérico obtenido a partir de AFP *CCRGDVLDC* (en este documento apociclina-A) es capaz de suprimir la apoptosis en células tumorales *in vitro*. Se demostró que la apociclina-A cancelaba completamente la apoptosis inducida por AFP en células de mieloblastoma humano U937 e inhibe significativamente la muerte celular mediada por anti-Fas. Además, se ha evaluado la capacidad de los péptidos obtenidos de AFP apociclina-A y el péptido 6-mero lineal RGDVLD para afectar a la activación de caspasa inducida por el Cyt c y AFP en un sistema sin células. Se descubrió que la apociclina-A potenciaba notablemente la activación de caspasa dependiente de dATP inducida por bajas dosis de Cyt c endógeno o exógeno y prácticamente suprimía completamente la activación de caspasa inducida por dosis activas de forma altamente apoptótica de Cyt c. También se demostró que la apociclina-A cancelaba la activación de caspasa-3 dependiente de Cyt c/dATP inducida por AFP en un extracto citosólico sin células de células HepG2. El péptido 6-mero obtenido de AFP lineal, RGDVLD no mostraba ninguna actividad reguladora de apoptosis en las células completas, pero era capaz de suprimir la activación de caspasa mediada por Cyt c/AFP en un sistema sin células.

Se conoce bien y se emplea habitualmente un enfoque para generar anticuerpos contra ciertos sitios funcionales de proteínas biológicamente activas como receptores para bloquearlas. Dichos anticuerpos crean en sus unidades Fab estructuras que encajan exactamente en el sitio del receptor. Por otro lado, pueden prepararse anticuerpos anti-idiotípicos para encajar con las primeras unidades Fab preparadas. El anticuerpo anti-idiotípico recuerda entonces al sitio activo del receptor. De acuerdo con la presente invención, AFP y albúmina contienen un sitio activo especial, que encaja con los receptores que desencadenan el ciclo de muerte celular, y los bloquea. Por lo tanto, cierta parte de AFP/albúmina, descubierta en la presente invención, tiene la estructura que bloquea el sitio desencadenador. El anticuerpo anti-idiotípico contra el sitio activo de AFP y/o albúmina contiene, por lo tanto, la información estructural esencial de la molécula capaz de bloquear al receptor de muerte celular. Dicha estructura en 3-D puede mostrarse mediante cristalografía de rayos X rutinaria y/o modelado molecular por ordenador a partir de los datos de una secuencia.

La realización básica de la presente invención es que se descubrieron sitios apoptóticamente activos en dos proteínas importantes y abundantes en mamíferos, a saber AFP y albúmina. En base a este descubrimiento, se desarrollaron una serie de estructuras moleculares para bloquear el receptor que desencadena la muerte celular en células de mamífero. Las moléculas ensayadas eran péptidos debido a su fácil síntesis pero se entiende que pueden diseñarse otras moléculas en base a compuestos sintéticos o naturales. Del mismo modo, las estructuras moleculares pueden construirse sobre otras, especialmente no inmunogénicas, moléculas portadoras.

El principal resultado práctico de la presente invención es el péptido cíclico obtenido a partir de AFP, *CCRGDVLDC* (apociclina-A), que contiene dos sitios activos funcionales: RGD y DVLD. Ambas secuencias están directamente implicadas en la regulación de la actividad de caspasa y apoptosis. Se sabe que las proteínas o péptidos que contienen RGD están implicadas en la interacción con moléculas de integrina y podrían emplearse para la inhibición de contactos intracelulares que afecten de este modo a la proliferación celular y a la apoptosis. La apociclina-A difiere de otros péptidos que contienen RGD mediante la representación multimérica de este sitio en forma ciclada. Esto permite potenciar el efecto total mediante la presentación multimérica de la secuencia RGD.

La secuencia DVLD está ubicada en la apociclina-A justo después de RGD y representa el sitio de escisión bien conocido de caspasa-3, -7, y -2. Por lo tanto, tiene una estructura típica para sustratos de caspasa, DXXD (Thornberry, N. A., *et al.* (2000) *Methods in Enzymology*, v. 322, pág. 100). En apociclina-A, este sitio podía unirse al sitio activo de caspasa-3 como sustrato peptídico. La actividad similar podría atribuirse también a toda la molécula de AFP, pero esto requerirá un cambio conformacional que permita la exposición del sitio correspondiente para revelar actividad moduladora de apoptosis (Semenkova *et al.*, (2003) *Eur. J. Biochem.* 270, en prensa).

La capacidad de la apociclina-A para inhibir la actividad de caspasa-3 en un sistema sin células podría explicarse mediante la presencia de la secuencia de aminoácidos similar a un sustrato, que es capaz de unirse a y bloquear los sitios activos de caspasas correspondientes. Adicionalmente, el sitio DVLD de apociclina-A podría facilitar selectivamente la liberación de caspasa-3 a partir del complejo del apoptosoma alterando una interacción entre XIAP y caspasa-3 procesada de forma similar al tetrapéptido típico inhibidor de caspasa-3, DEVD-cho (Bratton, S. B., *et al.*, (2001) *EMBO J.* 5, 998).

La naturaleza única de la apociclina-A es su estructura cíclica, que permite la presentación multimérica de la secuencia del sustrato y la potenciación del efecto total mediante la interacción simultánea con diferentes moléculas implicadas en la señalización de apoptosis.

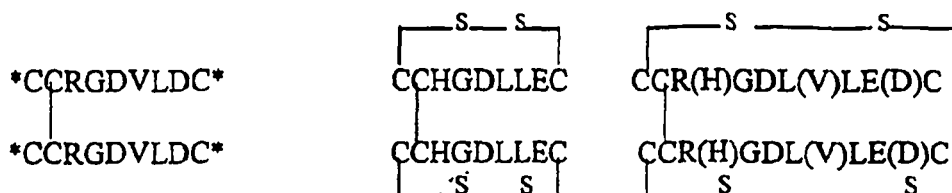
La invención se ilustra adicionalmente a continuación mediante los ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Síntesis peptídica

Los péptidos se sintetizaron con un sintetizador Modelo 430A; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, de acuerdo con los métodos habituales de la síntesis peptídica. Los péptidos cíclicos se forman principalmente de forma espontánea a partir de péptidos lineales en soluciones acuosas sometidas a oxígeno atmosférico y se purificaron de la solución mediante HPLC con procedimientos habituales usados para péptidos.

1. Péptido 9-mero multimérico cíclico correspondiente a la secuencia de 251-259 aminoácidos de la AFP humana *Cys-*Cys-Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp-Cys*, *CCRGDVLDC* (los asteriscos indican un potencial puente disulfuro), que se denominará en este documento como apociclina-A. La segunda cisteína, Cys252, es capaz de formar el puente S-S entre dos péptidos monoméricos cíclicos adyacentes. El peso molecular del péptido cíclico monomérico era de 983 Da. El péptido de apociclina-A está compuesto por dos o más (menos de 5) estructuras peptídicas 9-meras similares a un anillo correspondientes a la secuencia *Cys-*Cys-Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp-Cys*.



2. Péptido monomérico cíclico *Cys-Gly-Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp-Cys* (los asteriscos indican un potencial puente disulfuro), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 251-259 de la AFP humana con una única sustitución de aminoácidos de la Cys252 por Gly para evitar la multimerización peptídica mediante formación de los puentes S-S entre los monómeros. El peso molecular del péptido 9-mero monomérico cíclico era de 937 Da.
3. Péptido lineal obtenido a partir de AFP correspondiente a la secuencia 253-259, Arg-Gly-Asp-Val-Leu-Asp (253-259), el peso molecular del péptido cíclico monomérico era de 674 Da.
4. Péptido cíclico obtenido a partir de HSA (albúmina de suero humano) *Cys-Cys-His-Gly-Asp-Leu-Leu-Glu-Cys*, *CCHGDLLEC* (Pm: 992);
5. Péptido cíclico obtenido a partir de HSA *Cys-Gly-His-Gly-Asp-Leu-Leu-Glu-Cys*, CGHGDLLEC (Pm: 946). En este péptido Cys252 se sustituye por Gly.
6. Péptido lineal obtenido a partir de HSA p26: His-Gly-Asp-Leu-Leu-Glu, HGDLLE (Pm: 683).

Reactivos

Los sustratos peptídicos fluorogénicos DEVD-AMC y LEHD-AFC eran de Alexis Biochemicals (San Diego, USA). El citocromo c de corazón bovino (Cyt c), el nucleótido de desoxiadenosin trifosfato (dATP) y otros reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. La AFP humana se aisló a partir de suero del cordón usando cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de filtración en gel como se describe en (Dudich *et al.*, (1999) Biochemistry, 38: 10406-10414). La pureza de AFP se estableció mediante PAGE y electroforesis "Rocket" (electroinmunodifusión monodimensional) con anticuerpos mono-específicos contra AFP humana y proteínas del suero de adulto y se demostró que no era inferior al 99,8%.

Preparación de extractos sin células

HepG2, células de hepatocarcinoma humano y la línea celular de monoblastoma humano U937 se originaron a partir de la *American Type Culture Collection* (Colección Americana de Cultivos Tipo). Los extractos celulares se prepararon lisando células en un tampón de extracción hipotónico. Para obtener la fracción citosólica S-100, el lisado celular se centrifugó durante 1 h a 100.000 x g. Los extractos se usaron inmediatamente o se congelaron a -70°C para un uso posterior.

Reacciones sin células

Las reacciones sin células se realizaron típicamente en volúmenes de reacción de 13 µl. La apoptosis se indujo mediante la adición de diversas dosis de citocromo c de corazón bovino y/o AFP humana purificada en presencia de dATP 1 mM. Para reacciones a escala de 13 µl, 10 µl de extracto celular (~2-4 mg/ml, según lo determinado por el ensayo de Bradford) se suplementaron con 1 µl de dATP, 1 µl de soluciones de Cyt c y/o AFP en tampón de reacción para recibir la concentración final necesaria de reactivos. Para evaluar la actividad de los péptidos, diversas dosis de péptidos que se están disolviendo en el tampón de reacción junto con dATP 1 mM se añadieron a los extractos celulares. Para determinar la capacidad de los péptidos para modular los efectos apoptóticos de Cyt c y AFP, se añadieron péptidos a los extractos 10 minutos antes que el citocromo c o AFP. Se incubaron muestras de control con el mismo volumen del tampón (3 µl) sin adición de reactivos. Para iniciar la apoptosis, los extractos se incubaron a 37°C durante 40 minutos.

Determinación de la actividad de caspasa

Al final de una reacción de activación de caspasa, alícuotas de extracto (5 μ l) se suplementaron con el sustrato fluorogénico DEVD-AMC (3 mM) y a continuación se incubaron durante intervalos de tiempo definidos (0,5-1 h) a 37°C. Las reacciones se terminaron mediante dilución con adición de 2,0 ml de tampón fosfato sódico 0,2 mM enfriado con hielo, pH 7,5, seguido de una medición de fluorescencia con un fluorómetro de Perkin Elmer MPF-44A (λ_{exc} = 365 nm y λ_{em} = 440 nm). Para cada muestra, la intensidad de fluorescencia se normalizó con respecto a la concentración de proteína citosólica. La activación de caspasa se presentó como la proporción entre la intensidad de fluorescencia normalizada de la muestra y el valor correspondiente medido con una muestra de control.

Inducción de apoptosis

Se sembraron en placas células U937 a una densidad de 4×10^3 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar) en el medio completo y se incubaron durante 2 h antes de las adiciones de reactivo. A continuación, las células se trataron durante 24 h con diversas dosis de AFP disuelta en PBS y a continuación se evaluó la proliferación. El tratamiento de células con el anticuerpo IgM anti-Fas citotóxico CH-11 se realizó como se ha descrito. Las células U937 se trataron con 50 ng/ml de anticuerpos CH-11 durante 18 h. Las células se dejaron sin tratamiento o se trataron con reactivos durante intervalos de tiempo adecuados y durante las últimas 4 h de cultivo se sometieron a su incorporación de [^{3} H]-timidina (1 Ci/mmol/pocillo). Los datos experimentales se expresaron como un porcentaje de incorporación de [^{3} H]-timidina en cultivos por triplicado con respecto al medio de control. Células, cultivadas sin adiciones, se tomaron como control.

Ensayo para actividad peptídica

Para evaluar la actividad reguladora del crecimiento de péptidos, se añadieron diversas dosis de péptidos a las células durante 24 h y a continuación se evaluó la proliferación de las células, la viabilidad celular y la fragmentación del ADN. Para determinar la capacidad de los péptidos de modular apoptosis inducida por otros factores se trataron células Jurkat con 20 ng/ml de anticuerpos CH-11 sin ActD, se trataron células Raji con CH-11 en las células Jurkat se trataron con 20 ng/ml de anticuerpos CH-11 sin ActD, se trataron células Raji con CH-11 en presencia de 0,5 μ g/ml de ActD durante 18 h. Para la inducción de apoptosis con TNF- α , se trataron células (Jurkat, MCF7 o U937) durante 24 h con 25 ng/ml de la citoquina y a continuación se ensayó su proliferación o viabilidad como se ha descrito anteriormente. Se pre-lavaron células HepG2 antes de la adición de TNF con medio recién preparado para retirar factores de crecimiento endógenos.

Ejemplo 2

Identificación del sitio activo que contiene RGD específico de caspasa-3 en AFP humana responsable de señalización de apoptosis

Para determinar aminoácidos funcionalmente importantes en la molécula de AFP determinamos la homología de aminoácidos de la secuencia de AFP humana y caspasas-3 y -1 y construimos las estructuras de análogos peptídicos del sitio activo propuesto. Las siguientes secuencias se estudiaron alineadas:

```

casp-2 QNKPKMFFIQACRGDETDRGV
      : : : :
casp-1 KDKPKVYIIQACRGDSPGVVW
      : : : :
casp-3 TGKPKLFIIQACRGTELDCCI
      : : : :
HuAFP  VLDVAHVHEHCRCGDVLDCLQDGEKIMSYICSQQDTLSNKITECKLTTLERGQCIIHAE 299
: . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HSA    VTDLTQVHTECHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVE 294

```

Se observa a partir del alineamiento que AFP tiene cierta homología con sitios activos enzimáticos de caspasas 1 y 3. Los sitios enzimáticamente activos de caspasas 1 y 2 contienen el motivo RGD que está ubicado antes del resto Cys catalíticamente activo. Las caspasas 3 y 7 efectoras tienen en este lugar el motivo RGD, pero las posiciones de los restos Cys coinciden de forma exacta en la molécula de AFP y en casp-3 y casp-7. Teniendo en cuenta que AFP tiene puentes disulfuro intercatenarios entre Cys₂₅₂ y Cys₂₅₉ (Morinaga, *et al.*, (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4604-4608), formulamos una hipótesis de ubicación del sitio activo similar a caspasa en la molécula de AFP en algún punto entre los restos Cys₂₅₁-Cys₂₅₉. Debe mencionarse que casp-3, -7, y -8 también tienen motivos RGD, pero están ubicadas en posición diferentes a las posiciones catalíticamente activas (Bukley, *et al.* (1999) Nature, 397: 534-539). Las cisteínas libres Cys₂₅₈ en el contenido de la estructura peptídica podrían formar evidentemente puentes disulfuro intercatenarios entre dos péptidos adyacentes (figura 1). Para demostrar la existencia de aminoácidos funcionalmente importantes en el bucle Cys₂₅₁-Cys₂₅₉ en la molécula de AFP, construimos las estructuras de análogos peptídicos del sitio activo propuesto. Como control, también se sintetizaron péptidos homólogos a partir de HSA.

Ejemplo 3

El péptido cíclico obtenido a partir de AFP, apociclina-A, cancela la apoptosis inducida por AFP en células U937

Los datos publicados anteriores demuestran que AFP de diferentes orígenes (embrionario u obtenido del medio de cultivo de la línea celular de hepatoma HepG2) pueden inducir supresión del crecimiento dependiente de la dosis y muerte celular programada en diversas líneas celulares tumorales, caracterizada por características convencionales de apoptosis, tales como significativa supresión del crecimiento, citotoxicidad y fragmentación del ADN (Dudich *et al.*, (1998) Tumor Biol. 19: 30-40). Para determinar la posible ubicación del sitio activo en la molécula de AFP que es responsable de la señalización de apoptosis, ensayamos la capacidad de diversos péptidos obtenidos de AFP para bloquear este efecto. La figura 2 demuestra que el péptido obtenido de AFP, apociclina-A, suprime completamente la apoptosis inducida por AFP en células U-937. Además, el pre-tratamiento de 15 minutos de células U-937 con apociclina-A (1 mM) inducía una estimulación al 15% de proliferación con respecto al medio de control. Esto significa que la apociclina-A suprime también la apoptosis espontánea de las células durante el cultivo de 24 h.

Ejemplo 4

La Apociclina-A inhibe significativamente la apoptosis inducida por anti-Fas en células U 937

Para ensayar la especificidad por AFP, ensayamos si la apociclina-A podía afectar a la apoptosis inducida por otros factores. La apoptosis se inducía en células U-937 mediante diversas dosis de anticuerpos monoclonales IgM anti-Fas citotóxicos CH-11. La figura 3 demuestra que la apociclina-A 0,5 mM inhibía significativamente la apoptosis mediada por anti-Fas mediante la supresión de aproximadamente el 50% del efecto total. La potenciación de la concentración de apociclina-A hasta 1 mM inducía una inhibición más significativa de la apoptosis inducida por anti-Fas. Se sabe que las rutas intracelulares implicadas en diversos tipos de apoptosis son comunes para la mayoría de factores apoptóticos. Nuestros datos indicaban que la apociclina-A contrarresta las rutas dependientes de AFP y Fas de la señalización de apoptosis mediante interacción con cierto receptor común que está implicado mediante ambos factores para señalar apoptosis.

Ejemplo 5

Determinación de los aminoácidos funcionalmente importantes en el sitio activo de la molécula de AFP

a) *Péptidos obtenidos de AFP*

El péptido cíclico *CGRGDVLDC* con sustitución de Cys₂₅₂ por Gly y el péptido 6-mero RGDVLD se diseñaron para determinar aminoácidos funcionalmente importantes en la secuencia del sitio activo funcional que es responsable de la señalización de apoptosis. La figura 4 demuestra el efecto de *CGRGDVLDC* sobre la apoptosis mediada por AFP en células U-937. Este péptido no conseguía suprimir la citotoxicidad mediada por AFP. Los mismos resultados se obtuvieron para RGDVLD (figura 4). Estos datos indican que Cys₂₅₂ es un aminoácido funcionalmente importante y su sustitución por Gly suprime completamente la capacidad del péptido para interactuar con la actividad apoptótica de la molécula de AFP completa. El péptido más corto, RGDVLD, también era incapaz de regular la apoptosis mediada por AFP, mostrando la necesidad de una estructura cíclica para la formación del sitio activo apoptótico.

b) *Péptidos derivados de HSA*

Se sabe que la albúmina comparte una auténtica homología con AFP (Morinaga, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4604-4608). También se descubrió una homología en la región del sitio activo propuesto que era modelada por el péptido apociclina-A. Diseñamos los siguientes péptidos obtenidos a partir de la secuencia de HSA: péptidos cíclicos *CCHGDLLEC*, *CGHGDLLC* (con una única sustitución de Cys por Gly) y el péptido 6-mero lineal HGDLLE. También ensayamos la capacidad de estos péptidos para afectar a la apoptosis inducida por AFP en células completas de forma similar a como se ha descrito anteriormente (Tabla 1). La figura 5 demuestra que *CCHGDLLEC* tiene actividad similar a apociclina-A para suprimir la apoptosis mediada por AFP en células U-937. HGDLLE y *CGHGDLLC* no afectaron a la respuesta celular a AFP.

TABLA 1

Efectos de péptidos obtenidos de AFP y obtenidos de HSA sobre el crecimiento celular y apoptosis inducida por AFP en células U-937

Origen	Secuencia	¹⁾ Efecto sobre el crecimiento celular (%) del control)	Capacidad de afectar a la apoptosis inducida por AFP
AFP (apociclina-A)	*CCRGDVLDC*	+12	Supresión completa
AFP	CGRGDVLDC	-12	Sin efecto
AFP	RGDVLDC	+10	Sin efecto
HSA	*CCHGDLLEC*	+18	Supresión completa
HSA	HGDILLE	+20	Sin efecto
* Péptidos cíclicos			
¹⁾ Efecto directo de péptidos en dosis 1 mM sobre la proliferación de células U-937 en % de control sin adiciones.			

25 Ejemplo 6

La Apociclina-A es sinérgica con dosis bajas subóptimas de citocromo c endógeno para inducir la activación de caspasa en un sistema sin células

30 Para determinar si la apociclina-A podía funcionar de forma similar a la molécula de AFP completa para apoyar la activación de caspasa en un sistema sin células, establecimos el mismo sistema sin células, como se ha descrito anteriormente, pero en lugar de AFP, se usó el péptido cíclico apociclina-A. La figura 8 demuestra que la apociclina-A potenciaba de forma sinérgica la actividad de caspasa-3 total en un sistema sin células en presencia de la dosis bajas subóptimas de citocromo c endógeno y dATP. Sin la adición de dATP la apociclina-A era incapaz de inducir actividad 35 de DEVD-asa en las mismas condiciones experimentales. El mismo efecto se observó para la AFP completa en los extractos sin células “silenciosos”. Estos datos muestran que fuimos capaces de identificar el sitio activo de AFP y albúmina responsable de su actividad promotora de la apoptosis.

40 Ejemplo 7

La AFP es sinérgica con dosis subóptimas de citocromo c y dATP para inducir la activación de caspasa-3 en extractos celulares citosólicos

45 Hemos ensayado además la capacidad de AFP para inducir actividad de caspasa en un sistema sin células. La adición de AFP al extracto citosólico S100 desencadenó la inducción dependiente de dATP de actividad DEVDasa específica de caspasa-3, que aumentaba progresivamente durante al menos 2 h (figura 7A). Como control, la cantidad equivalente de albúmina de suero humano (HSA) se añadió al mismo sistema sin células y no mostraba ningún efecto al nivel de la actividad DEVDasa. Un bajo grado de actividad DEVDasa también era causado por dATP en solitario y 50 se debía evidentemente a la presencia de una pequeña cantidad de cyt-c endógeno en las preparaciones. En ausencia de dATP, la AFP no inducía ninguna activación de caspasa en absoluto. Para determinar si la AFP puede inducir directamente la activación de caspasa en extractos celulares citosólicos, o si requiere la presencia de un nivel basal de cyt-c, examinamos la actividad de escisión de DEVDasa después de la adición de cyt-c exógeno a los extractos citosólicos “silenciosos” con un nivel indetectable de citocromo c endógeno. La figura 7B muestra que no se detectó 55 ninguna actividad DEVDasa en este tipo de lisados citosólicos ni siquiera después de dos horas de tratamiento en presencia de dATP y una dosis baja subóptima de cyt-c. Sin embargo, la adición de AFP (7 μ M) en el mismo sistema de reacción desencadenaba el proceso de activación de caspasa, que aumentaba progresivamente de manera dependiente del tiempo (figura 7B).

60 Ejemplo 8

Supresión por apociclina-A de la activación de caspasa mediada por Cyt c/AFP en un sistema sin células

65 La figura 8 muestra que los efectos de apociclina-A sobre la activación de caspasa-3 estaban mediados por diversas dosis de citocromo c y AFP. La dosis alta del péptido (750 μ M) inhibía significativamente (50-70%) la activación de caspasa inducida por altas dosis de citocromo c endógeno (figura 8A). El tratamiento combinado de la fracción citosólica con citocromo c/AFP dio como resultado una significativa potenciación de la actividad DEVDasa total

(figura 8, A y B). La adición de apociclina-A inhibía la activación de caspasa mediada por Cyt c/AFP en un 60-80%. Estos datos indican que la apociclina-A funciona en un sistema sin células de manera opuesta a la molécula de AFP completa, mediante la supresión del efecto total de activación de caspasa inducido por el cyt c en solitario o en una composición con AFP. Por lo tanto, la apociclina-A representa la secuencia en la molécula de AFP que es responsable de su actividad apoptótica y de la interacción con los miembros del conjunto del apoptosoma.

Ejemplo 9

Efectos de péptidos obtenidos de AFP y obtenidos de HSA sobre la activación de caspasa mediada por Cyt c dependiente de dATP, en extractos citosólicos sin células

Para ensayar la capacidad de diversos péptidos para afectar a la activación de caspasa inducida por el citocromo c exógeno en un sistema sin células, usamos extractos celulares citosólicos de células HepG2. Se pretrataron alícuotas de extractos celulares con 750 μ M de péptidos durante 15 minutos y seguidamente diversas dosis de citocromo c se introdujeron en la mezcla de reacción para inducir la activación de caspasa. Se incubaron extractos de control con dATP sin péptidos y citocromo c, pero no revelaron ninguna actividad caspasa. Se observa, a partir de la figura 9A, que los péptidos obtenidos a partir de AFP, el péptido 9-mero apociclina-A y el péptido 6-mero RGDVLD así como el péptido 6-mero obtenido a partir de HSA, HGDLLLE, inducían una inhibición significativa de la activación de caspasa mediada por dosis alta de citocromo c. Por otro lado, el péptido 9-mero monomérico cíclico con una única sustitución de aminoácido *CGRGDVLDC*, así como el péptido multimérico cíclico obtenido a partir de HSA *CCHGDLLEC*, no mostraban actividad de inhibición de apoptosis en células completas o en un sistema sin células. Por lo tanto, el péptido más potente, apociclina-A, imita el sitio activo de AFP, que es responsable de la señalización de apoptosis. Un efecto claramente diferente se obtuvo a partir de la activación de caspasa inducida por la dosis baja de citocromo c. La figura 9B muestra que la apociclina-A producía la misma estimulación que la molécula de AFP de longitud completa en la activación de caspasa inducida por dosis baja de citocromo c. Los péptidos *CGRGDVLDC* y *CCHGDLLEC* no tenían ningún efecto sobre la actividad del citocromo c a dosis baja, pero los péptidos RGDVLD y HGDLLLE demostraron una significativa supresión de la activación de caspasa inducida por el citocromo c.

La Tabla 2 resume datos experimentales que caracterizan la actividad de péptidos en extractos citosólicos sin células.

TABLA 2

Modulación de la actividad DEVDasa mediada por Cyt c mediante diversos péptidos en un sistema sin células

Secuencia	Efecto sobre la activación de caspasa inducida por dosis alta de Cyt c	Capacidad de afectar a la activación de caspasa dependiente de Cyt c inducida por AFP	Efecto sobre la activación de caspasa inducida por dosis baja de Cyt c
CCRGDVLDC	50-80% de supresión	70-80% de supresión	30% de estimulación
CGRGDVLDC	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
RGDVLD	80% de supresión	Sin efecto	30-50% de supresión
CCHGDLLEC	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
HGDLLLE	90% de supresión	Sin efecto	70 de supresión
AFP completa	80% de supresión	-	50% de estimulación
* Péptidos cíclicos			

REIVINDICACIONES

1. Un péptido correspondiente al sitio apoptóticamente activo de alfa-fetoproteína humana ubicado en los restos
5 de aminoácidos 251-259 de dicha proteína, que tiene la secuencia de aminoácidos C*C*RGDVLDC*, en la que los
restos marcados como asterisco indican posiciones de posibles puentes disulfuro.

2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura lineal.

10 3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura polimerizada o cíclica.

4. El uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para preparar una preparación para
prevenir *in vitro* la apoptosis de células cultivadas preparadas para fines científicos o técnicos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

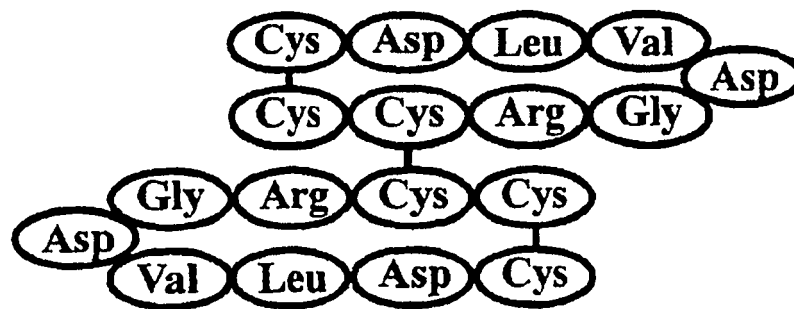


Fig. 1

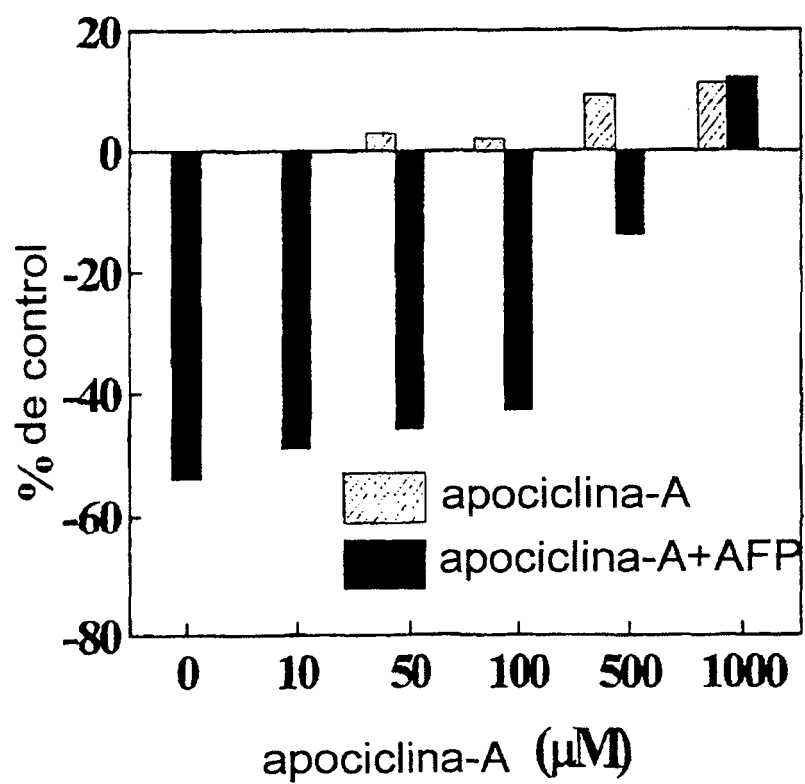


Fig.2

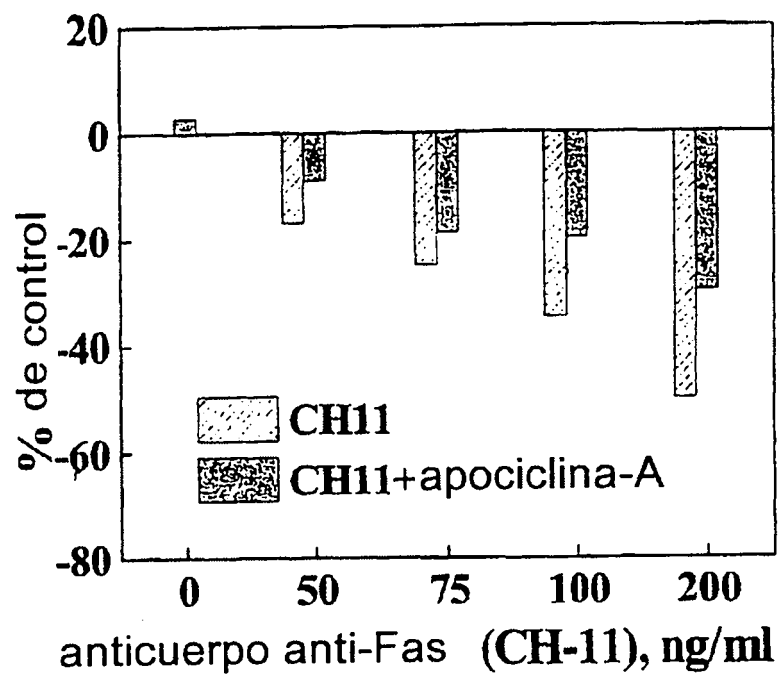


Fig.3

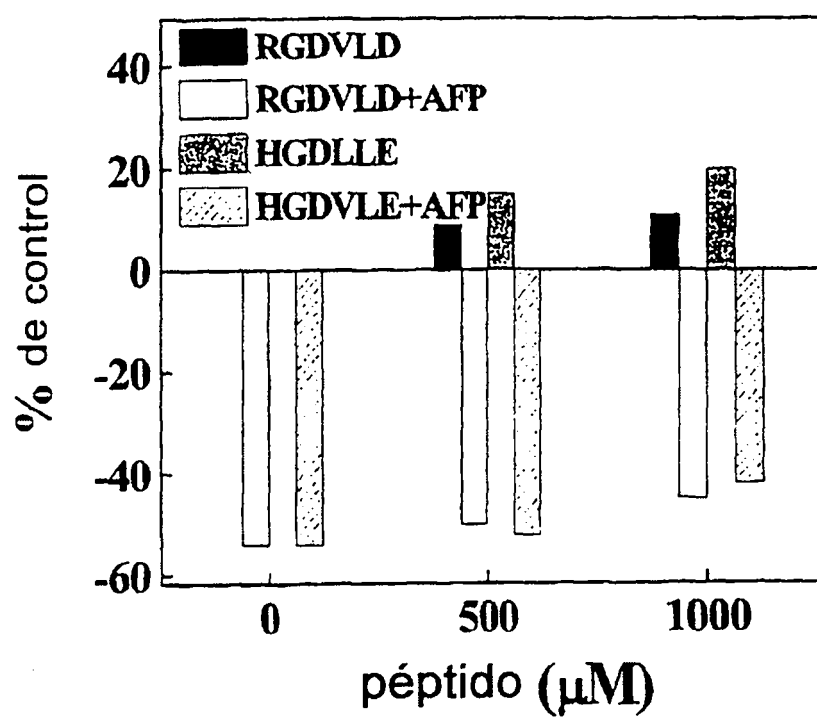


Fig. 4

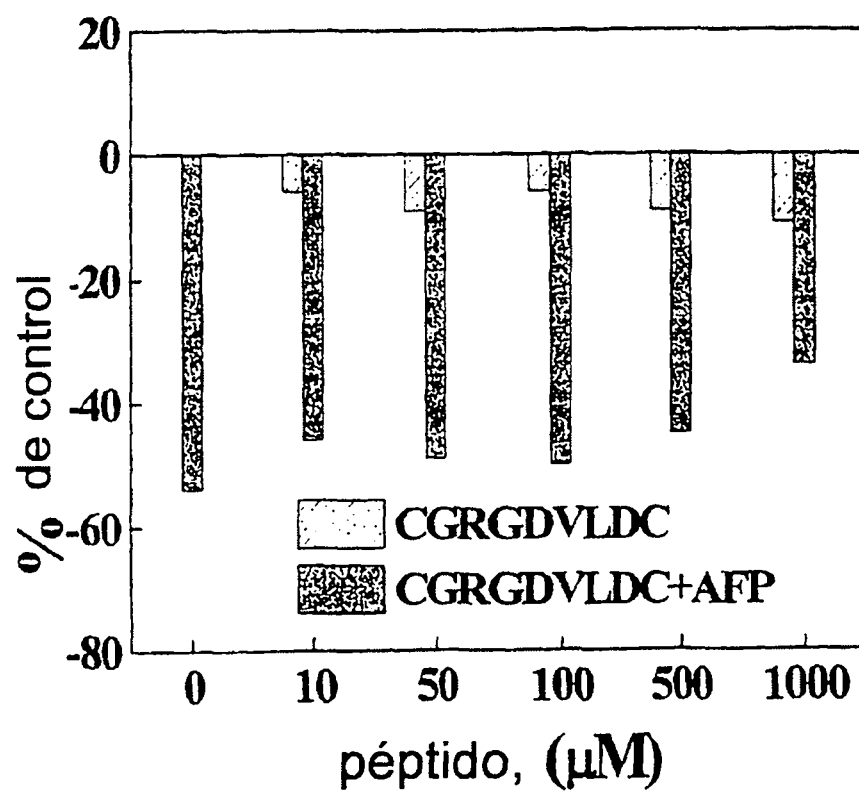


Fig. 5

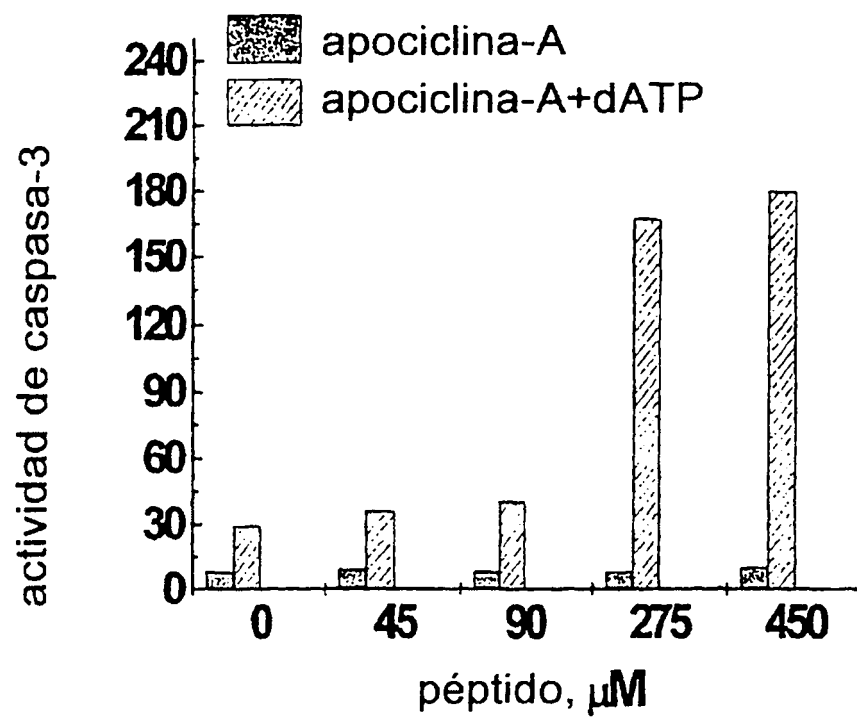


Fig. 6

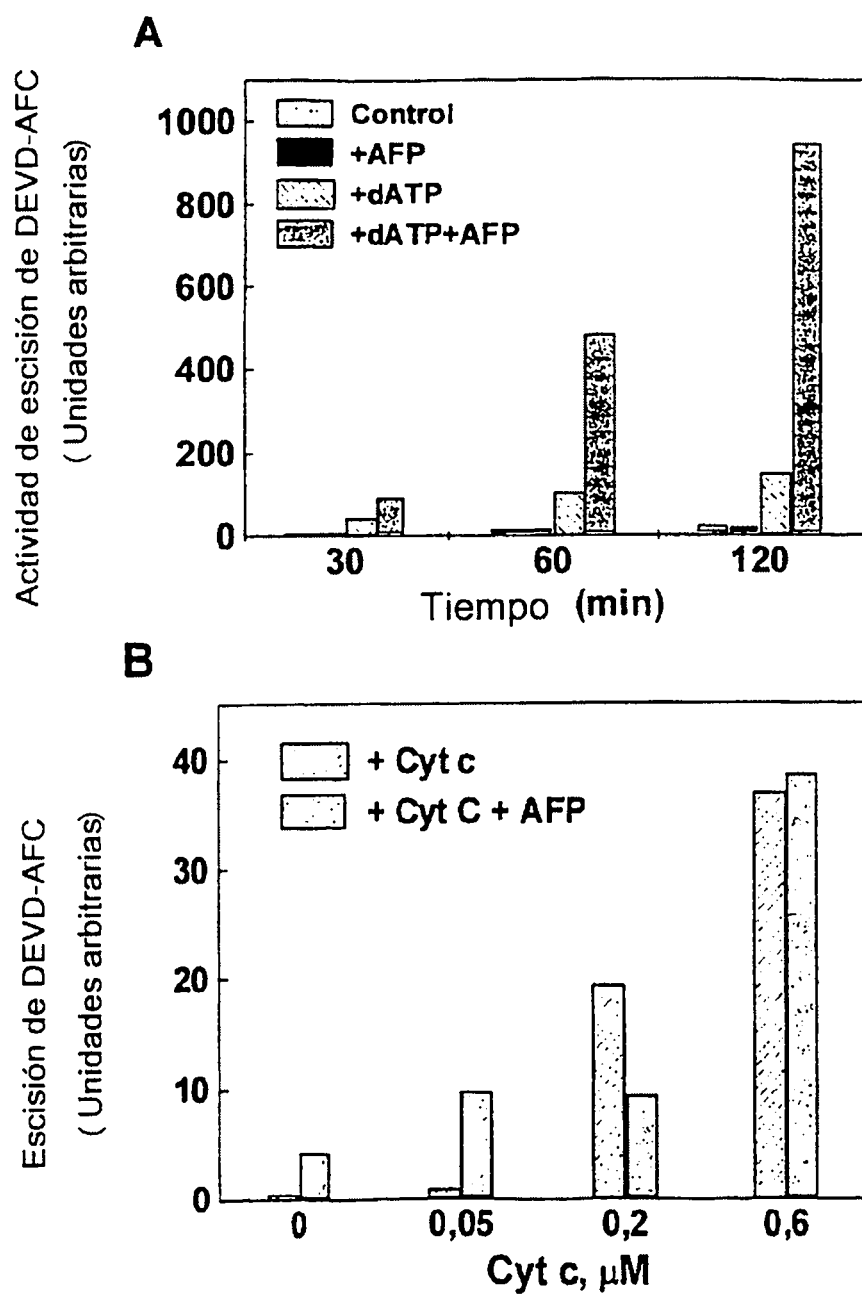


Fig.7 A y B

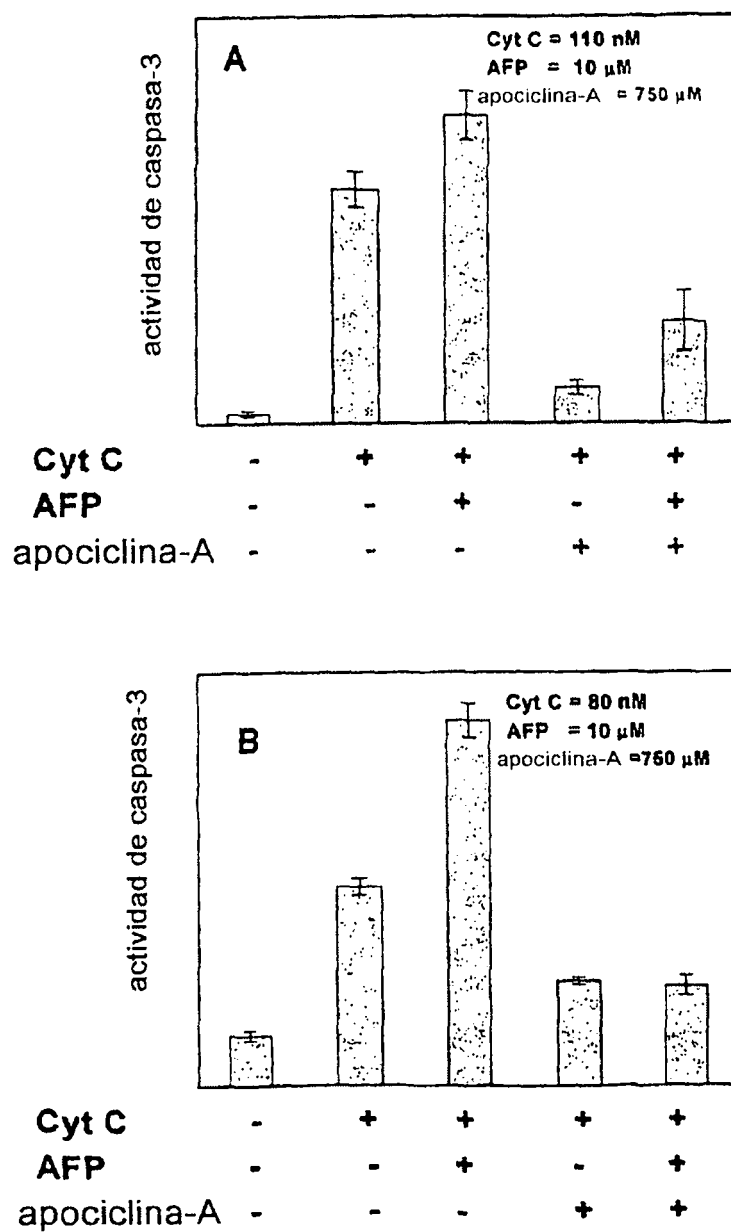


Fig 8

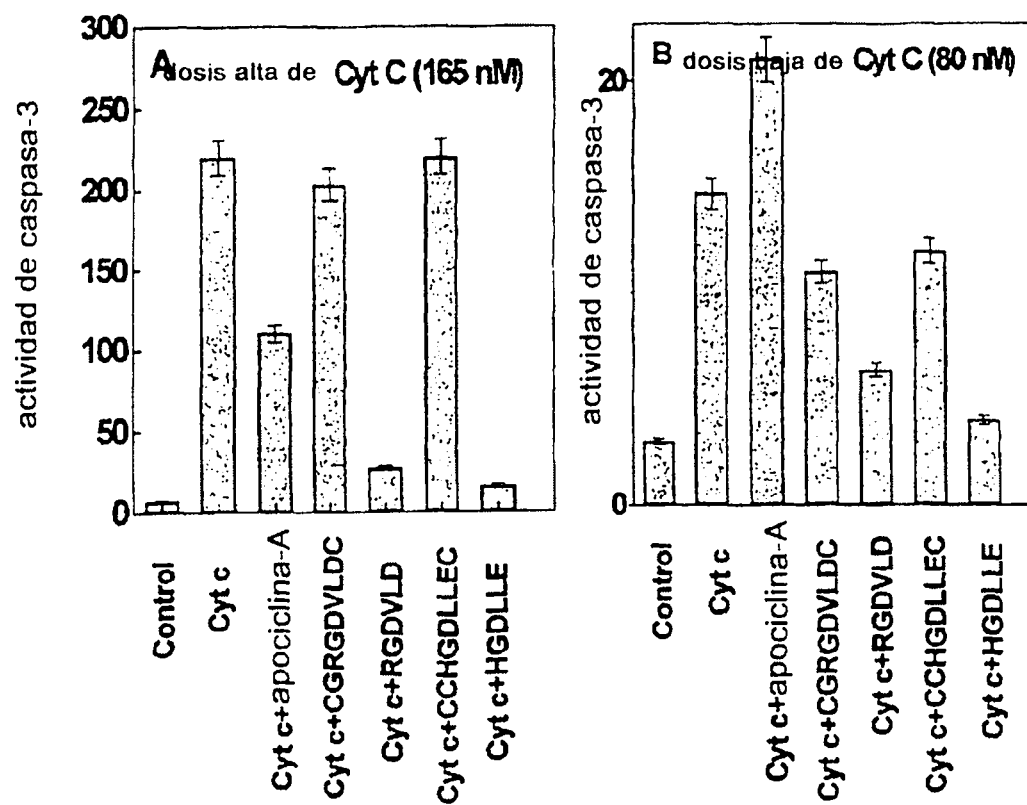


Fig. 9