

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/75 (2007.10) **C07K 14/47** (2007.10)
C07K 16/08 (2007.10) **C07K 16/18** (2007.10)
C12N 15/12 (2007.10) **C12N 15/34** (2007.10)
C12N 15/63 (2007.10) **A61K 38/16** (2007.10)
A61K 38/17 (2007.10) **A61P 35/00** (2007.10)
G01N 33/68 (2007.10)

(22) Data de pedido: **2003.10.13**

(30) Prioridade(s): **2002.10.16 CA 2408207**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.08.24**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.03.03**
109/2010

(73) Titular(es):

INSTITUT PASTEUR
25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS
CÉDEX 15 FR
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE FR
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)
FR

(72) Inventor(es):

XAVIER CAYLA FR
ANGELITA REBOLLO FR
ALPHONSE GARCIA FR
DESSAUGE, FRÉDÉRIC FR

(74) Mandatário:

ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO
RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS LIGANTES DA FOSFATASE DE PROTEÍNA 2A E POLINUCLEÓTIDOS QUE OS CODIFICAM**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"PÉPTIDOS LIGANTES DA FOSFATASE DE PROTEÍNA 2A E POLINUCLEÓTIDOS QUE OS CODIFICAM"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos péptidos ligantes da fosfatase de proteína 2A, um alvo importante para o controlo da apoptose, nomeadamente nas células cancerosas, assim como para o controlo das infecções virais e parasitárias.

DESCRIÇÃO DE TÉCNICA ANTERIOR

Estando estabelecido o papel dos péptidos da invenção na modulação da actividade da fosfatase de proteína 2A celular, é importante relembrar o estado dos conhecimentos actuais sobre as fosfatases de proteína 2A, o seu papel fisiológico e as suas interacções com determinadas proteínas celulares, virais ou parasitárias.

A fisiologia da célula é controlada, em parte, pela modulação do estado de fosforilação das proteínas. O estado de fosforilação de proteínas celulares depende da acção antagonista das cinases de proteína que as fosforilam e das fosfatases de proteína que as desfosforilam.

As fosfatases de proteína são divididas em dois grupos principais: fosfatases de tirosina e fosfatases de

serina/treonina. As fosfatases de serina/treonina são classificadas em duas categorias de acordo com a especificidade do seu substrato e a sua sensibilidade a determinados inibidores, as fosfatases do tipo 1 (PP1) e as fosfatases do tipo 2 (PP2). As fosfatases do tipo 2 dividem-se ainda em diferentes classes, incluindo a fosfatase 2A (PP2A), a fosfatase 2B (PP2B) ou a calcineurina cuja actividade é controlada pelo cálcio e a fosfatase 2C (PP2C) cuja actividade é dependente do magnésio.

As fosfatases de proteína serina/treonina PP1 e PP2A formam, *in vivo*, duas famílias de várias holoenzimas de expressão ubíqua que são produzidas pela interacção específica entre as suas sub-unidades catalíticas (PP1C e PP2Ac) e uma grande variedade de sub-unidades reguladoras e que estão envolvidas no direccionamento e/ou na regulação da actividade fosfatásica (para uma revisão recente, ver Garcia A. et al., PP1 et PP2A des ser/thr phosphatases au coeur de l'apoptose (2001) *Med/Sci* **17**, 1214-1216).

É presentemente conhecido que as fosfatases do tipo 2A foram muito conservadas ao longo da evolução e são potencialmente activadas na regulação de numerosos processos biológicos. As enzimas PP2A foram claramente associadas à regulação da transcrição, no controlo do ciclo celular e na transformação viral. Além disso, as PP2A são o alvo de diferentes proteínas virais ou parasitárias, sugerindo um papel das PP2A nas interacções hospedeiro-agente patogénico.

As PP2A são complexos oligoméricos (holoenzimas) compreendendo, cada, uma sub-unidade catalítica C e uma ou duas sub-unidades reguladoras, (A) e (B). A estrutura da sub-unidade

(A) consiste em 15 repetições imperfeitas de uma sequência de aminoácidos conservados com 38 a 40 aminoácidos, dos quais alguns interagem com as sub-unidades (B) e (C). As sub-unidades (A) e (C), conservadas ao longo da evolução, formam a estrutura base da enzima e são expressas constitutivamente. Pelo contrário, as sub-unidades (B) constituem uma família de proteínas reguladoras sem estrutura comum e expressas diferencialmente (Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 1989; **58**:453-508). Deste modo, as fosfatases de proteína estão presentes *in vivo* sob duas formas diferentes: uma forma dimérica (AC) e uma forma trimérica (ABC). As sub-unidades (B) controlam a actividade fosfatásica e a especificidade no que respeita ao substrato. A existência de formas múltiplas de PP2A está correlacionada com funções distintas e variadas das PP2A *in vivo*.

Recentemente, foram associadas diferentes proteínas não celulares e, em particular, proteínas virais e parasitárias, à modulação de determinadas actividades específicas das fosfatases de proteína 2A.

Foram adoptadas diferentes estratégias envolvendo a PP2A pelos vírus para facilitar a sua replicação e a sua sobrevivência na célula hospedeira. Por exemplo, o vírus *parainfluenza* incorpora, na sua partícula viral, a proteína PKC ζ , proteína de origem celular sob controlo da PP2A. Isto permite-lhe perturbar a fosforilação das proteínas do seu hospedeiro e facilitar a sua própria replicação (B. P. Gupta *et al.*, Cellular protein kinase C ζ regulates human parainfluenza virus type 3 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; **92**:5204-8).

Vários vírus de ADN tendo uma capacidade transformante, tais como os *papovaviridae* ou os adenovírus, o mesmo como determinados retrovírus, tal como o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (VIH-1), codificam para proteínas que interagem directamente com determinadas PP2A do hospedeiro. Todos estes vírus compreendem proteínas que, embora sejam estruturalmente diferentes, interagem com determinadas holoenzimas e modificam a sua actividade fosfatásica.

Foi demonstrado, em particular, que a proteína E4orf4 do adenovírus se liga a uma PP2A heterotrimérica e, mais precisamente, a uma sub-unidade reguladora (B), o que envolve uma diminuição da transcrição de JunB na célula infectada. Este efeito pode desempenhar um papel significativo durante a infecção viral regulando a resposta apoptótica das células infectadas. De um modo interessante, foi também demonstrado que a interacção da E4orf4 com a PP2A induz a apoptose de células transformadas de um modo independente de p53 (Shtrichman R. *et al.*, Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells. *J. Virol.* 1998; **72**: 2975-82).

Os vírus de ADN oncogénicos da família dos *Papovaviridae*, incluindo SV40 e o vírus do políoma, induzem a transformação celular. Foi demonstrado que a PP2A interage com os antigénios "T pequeno" de SV40 e "T pequeno" e "T médio" do vírus do políoma. Estas interacções de proteína virais com a PP2A estavam claramente envolvidas na transformação viral. Finalmente, a regulação da transcrição, um processo normalmente realizado na célula pelos diferentes factores que se fixam especificamente nas sequências promotoras reguladoras, representa, provavelmente, o mecanismo mais significativo envolvido no

controlo da expressão viral pela PP2A. Deste modo, foi demonstrado que a PP2A é um regulador negativo de muitos factores da transcrição envolvidos nomeadamente nos processos de crescimento e de proliferação celular, incluindo AP1/SRE, NF- κ B, Sp1 e CREB (Waszinski, B.E. *et al.*, Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB Transcriptional stimulation. *Mol. Cell Biol.* 1993: **13**, 2822-34). A regulação viral destes factores de transcrição irá permitir modular a transcrição viral.

A proteína viral do VIH-1, *Vpr*, interage *in vitro* com a PP2A e estimula a sua actividade catalítica (Tung L *et al.*, Direct activation of protein phosphatase 2A0 by HIV-1 encoded protein complex Ncp7: vpr. *FEBS Lett* 1997; **401**: 1997-201). A *Vpr* pode induzir a paragem em G2 de células infectadas inibindo a activação do complexo p34cdc2-ciclina B. Por outro lado, a *Vpr* interage com o factor de transcrição Sp1 e é um activador em trans fraco da transcrição do VIH-1 dependente de Sp1. Deste modo, a proteína *Vpr* de VIH-1, que está incorporada no virião, irá estar envolvida, *in vivo*, na iniciação da transcrição viral, uma etapa evidentemente essencial para regular a expressão do factor da transcrição Tat (um regulador principal da transcrição codificado pelo vírus VIH-1).

Pelo contrário, do papel bem estabelecido das cinases de proteína nas infecções parasitárias, foi apenas durante os últimos anos que as fosfatases de serina/treonina começaram a ser reconhecidas como sendo reguladores potenciais significativos no domínio da parasitologia.

A ausência de motivos comuns ao conjunto das proteínas que interagem com a PP2A impede a simples identificação

bioinformática de motivos peptídicos envolvidos directamente na ligação destas proteínas à PP2A.

No entanto, estando estabelecido o papel principal das fosfatases de proteína 2A nas interacções vírus-hospedeiros ou parasitas-hospedeiros, tal como resumido acima, é considerado de interesse identificar os locais da ligação de proteínas virais ou parasitárias às holoenzimas PP2A ou a uma das suas sub-unidades, para identificar novos alvos terapêuticos para estes agentes patogénicos, virais ou parasitários.

As fosfatases de proteína serina/treonina do tipo 1 (PP1) e do tipo 2A (PP2A) representam novos alvos potencialmente importantes para o controlo da apoptose, nomeadamente nas células cancerosas, assim como para o controlo das infecções virais ou parasitárias (para uma revisão ver A. Garcia *et al.*, (2000). Protein Phosphatase 2A: a definite player in Viral and parasitic regulation. *Microbes Inf.* **2**, 401-407; E X. Cayla *et al.*, (2000). La Protéine Phosphatase 2A: une nouvelle piste pour l'étude des virus et des parasites. *Méd/Sci* **16**, 122-127). Mais particularmente, um papel crucial das PP1/PP2A irá ser ao nível da regulação das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e da sobrevivência celular (Garcia A. *et al.*, PP1 et PP2A des ser/thr phosphatases au coeur de l'apoptose. *Med/Sci* **17**, 1214-1216; Ayllón, V. *et al.*, (2000). Protein phosphatase 1- is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates IL-2 deprivation-induced apoptosis. *EMBO J.* **19**, 2237-2246, Ayllón, V, *et al.*, (2001) Bcl-2 targets protein phosphatase 1 alpha to Bad. *J. Immunol.* **15**; 166: 7345-7352).

De um modo geral, a identificação de péptidos que interagem com a PP2A irá permitir a produção de novos medicamentos

susceptíveis de bloquear, por inibição competitiva, os mecanismos celulares induzidos por proteínas virais ou parasitárias através da sua interacção com a PP2A e, em particular, os mecanismos de infecção, proliferação de agentes patogénicos e transformação neoplásica das células.

Em particular, é descrito que a activação da PP2A após interacção com a proteína adenoviral E4orf4, induziu a apoptose em células transformadas (Shtrichman R, *et al.*, (2000) *Oncogene*. **19**, 3757-3765). Este efeito que é específico, requer uma interacção com a sub-unidade B alfa (B α) de PP2A (Marcellus *et al.*, *J Virol.* (2000) **74**:7869-7877)/ Goedert *et al.* *J. Neurochem* (2000) **75**, 2155-2162)). No total, o conjunto destas observações sugere a hipótese de que a interacção dos péptidos mimetizando o local ABC1 e/ou A3 com a PP2A poderá induzir a apoptose das células transformadas.

Os documentos W0901563 e W00104629 A1 descrevem a proteína E4orf4 humana e o seu papel na indução da apoptose das células tumorais, particularmente quando esta é expressa com a ajuda de um vector adenoviral. O documento W00104629 A1 refere-se, por outro lado, a polipéptidos moduladores e miméticos E4orf4 e PP2A permitindo induzir uma morte celular selectiva. Este documento divulga uma invenção que se refere à aptidão da proteína adenoviral E4orf4 para causar a morte de células neoplásicas, mas não a de células não-neoplásicas. Além disso, o documento W09801563 A2 refere-se às proteínas E4orf4 e E4orf6 de adenovírus destinadas a induzir a morte celular. Por fim, o pedido de patente FR 0110139 descreve compostos peptídicos apresentando a propriedade de ligação com a PP2A.

As proteínas da família Bcl-2 que, nos mamíferos, compreende, igualmente, uma vintena de membros, podem ser divididas em três subfamílias compreendendo:

- os membros anti-apoptóticos (do tipo Bcl-2 em si) que possuem, pelo menos, quatro motivos conservados, denominados "BH1 a BH4" para "Bcl-2 Homology domain", são necessários à função de sobrevivência celular. O motivo BH4 contém o domínio de interação com as proteínas Raf e Apaf-1 e com a calcineurina;
- os membros pro-apoptóticos do tipo Bax não contendo um domínio BH4; e
- os membros pro-apoptóticos do tipo Bad possuindo apenas um domínio BH3.

As experiências de mutagênese mostram que a actividade anti-apoptótica de Bcl-2 requer a sua fosforilação ao nível de um resíduo particular, a serina 70, cuja substituição por alanina inibe a sobrevivência. Além disso, os trabalhos de equipa do Dr. May (EUA) (2001, volume 15, N° 4, pp 515-522) sugerem que na presença IL-3, a PP2A poderá associar-se de uma forma transitória à Bcl-2. A utilização de um mutante pontual (em que um resíduo de alanina substitui a serina 70) indica que a ligação da PP2A à Bcl-2 requer a serina 70 que consequentemente, poderá pertencer ao local de ligação. A requerente sugere, consequentemente, um mecanismo de regulação dinâmica em que a PP2A irá ser uma fosfatase da Bcl-2 antagonista das cinases da Bcl-2, por exemplo, PKC (para discussão, ver Garcia A. et al., PP1 et PP2A des ser/thr

phosphatases au coeur de l'apoptose (2001), *Med/Sci* **17**, 1214-1216.

A presença destes péptidos Bcl-2 no interior da célula poderá, assim, desregular a fosforilação e, assim, a actividade da Bcl-2 o que, conseqüentemente, poderá impedir o desenvolvimento de tumores dependentes da Bcl-2.

Em resumo, verifica-se, assim, uma necessidade ao nível dos tratamentos antitumorais, antivirais e antiparasitários com péptidos derivados das sequências E4orf4 e Bcl-2 ligando a PP2A ou uma das suas sub-unidades.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a péptidos E4orf4 de tamanho reduzido, ligando uma holoenzima PP2A ou uma das suas sub-unidades. Ao contrário das proteínas E4orf4 nativas ou de domínios polipeptídicos de tamanho significativo, os péptidos de tamanho reduzido têm a vantagem de serem facilmente sintetizados, por via química ou em sistemas celulares, com um rendimento importante e um custo reduzido. Os péptidos da invenção apresentam, além disso, a vantagem de serem mais acessíveis e mais facilmente transferíveis para o citoplasma ou para o núcleo das células utilizando vectores adequados, tendo em perspectiva uma utilização terapêutica.

O pedido descreve, igualmente, péptidos Bcl-2 de tamanho reduzido, ligando uma holoenzima PP2A ou uma das suas sub-unidades. Ao contrário das proteínas Bcl-2 nativas ou de domínios polipeptídicos de tamanho significativo, os péptidos do

tamanho reduzido têm a vantagem de serem facilmente sintetizados, por via química ou em sistemas celulares, com um rendimento importante e a um custo reduzido. Os péptidos Bcl-2 descritos no pedido apresentam, além disso, a vantagem de serem mais acessíveis e mais facilmente transferidos para o citoplasma ou para o núcleo das células utilizando vectores adaptados, tendo em perspectiva uma utilização terapêutica.

A invenção decorre da identificação de péptidos E4orf4 com um tamanho inferior a 30 aminoácidos e, nomeadamente, de péptidos com um tamanho inferior a 20 aminoácidos, interagindo, *in vitro*, com uma holoenzima PP2A purificada ou com uma das suas sub-unidades.

O pedido descreve, igualmente, a identificação de péptidos Bcl-2, com um tamanho inferior a 30 aminoácidos e, em particular, de péptidos com um tamanho inferior a 20 aminoácidos, interagindo, *in vitro*, com uma holoenzima PP2A purificada ou com uma das suas sub-unidades.

Em particular, a requerente identificou pela técnica de "SPOT synthesis" descrita por Frank e Overwing (*Methods in Molecular Biology*, 1996, volume **66**:149-169, *Epitope Mapping Protocols*, G. E. Morris Humana Press Inc., Totowa Nova Jérsei) os locais de ligação das proteínas E4orf4 (de adenovírus do tipo 2 de cão) e Bcl-2 interagindo com uma holoenzima PP2A ou com uma das suas sub-unidades.

Por um lado, o pedido descreve péptidos com um tamanho inferior a 30 aminoácidos, interagindo, *in vitro*, com uma holoenzima PP2A purificada ou com uma das suas sub-unidades, sendo os péptidos acima referidos derivados da proteína E4orf4

(de adenovírus do tipo 2 de cão) e Bcl-2. Os antagonistas derivados destes péptidos e seleccionados por estes inibirem a interacção de proteínas virais ou parasitárias com uma holoenzima particular de PP2A, poderão constituir, deste modo novos agentes antitumorais, antivirais ou antiparasitários.

Por outro lado, o pedido descreve, igualmente, um péptido compreendendo, por um lado, uma sequência de 12 aminoácidos derivados de Ck2 α de *Theileria parva* (FD6), capaz de interagir com a sub-unidade A da PP2A e de penetrar na célula da linha HeLa (Garcia, A. et al., (2000) e, por outro, a sequência correspondente ao local de interacção da PP2A com a sub-unidade B α do local 1-B da PP2A (ver tabela 1). Este péptido pode penetrar nas células e, à semelhança da proteína E4orf4 de adenovírus humano, poderá interagir com a PP2A e causar a apoptose nas células cancerosas, sem afectar as células normais.

O método de identificação, descrito no pedido FR N°0110139 apresentado no dia 27 de Julho de 2001 em nome do mesmo requerente, compreende as etapas seguintes, consistindo em:

a) depositar sob a forma de gota, num suporte, péptidos E4orf4 ou Bcl-2 cuja sequência é proveniente, respectivamente, da proteína viral E4orf4 ou celular Bcl-2, correspondendo, cada gota, ao depósito de um péptido de sequência definida,

b) colocar o suporte sólido em contacto com uma solução contendo uma holoenzima de fosfatase de proteína 2A ou uma das suas sub-unidades, sob condições permitindo que os

péptidos presentes no suporte se liguem à holoenzima ou a uma das suas sub-unidades e,

c) identificar no suporte sólido o péptido E4orf4 ou Bcl-2 a que a fosfatase de proteína 2A ou uma das suas sub-unidades se fixa.

De acordo com a etapa a), são depositados diferentes péptidos num suporte sólido em posições definidas ("spot"), correspondendo cada posição a uma sequência peptídica específica e formando, deste modo, o conjunto uma matriz de péptidos ("array") a duas dimensões.

Foram descritos recentemente diferentes métodos de preparação dessas matrizes (para uma revisão, ver Figeys e Pinto, 2001 *Electrophoresis* **22**: 208-216; e Walter et al., 2000 *Curr Opin Microbiol* **3**: 298-302). O conjunto destes métodos compreende, em geral, a fixação covalente de péptidos sobre um suporte, em particular, utilizando elementos de ligação (linkers) químicos. A título de exemplo, o especialista na técnica poderá referir-se, em particular, à técnica de "SPOT syhthesis" consistindo em sintetizar péptidos compreendendo até 20 resíduos directamente numa membrana de celulose, (Frank e Overwing, *Methods in Molecular Biology*, 1996, vol. **66**: 149-169, *Epitope Mapping Protocols*, G. E. Morris Humana Press Inc., Totowa Nova Jérsei).

De um modo geral, pode ser utilizado qualquer método desde que este permita a obtenção de uma matriz de péptidos, E4orf4 ou Bcl-2, depositados num suporte sólido, utilizável para detectar interacções específicas entre os péptidos depositados e a holoenzima PP2A ou uma das suas sub-unidades.

O conjunto das sequências de péptidos E4orf4 e Bcl-2 depositadas abrange a sequência completa da proteína viral ou celular de que estas sequências são provenientes. Deste modo, o processo permite testar a sequência completa em apenas uma etapa, estando esta "seccionada" num número definido de péptidos, de sequências geralmente sobrepostas.

Os péptidos depositados sob a forma de gota têm um tamanho inferior a 20 aminoácidos e, de um modo preferido, um tamanho inferior a 15 aminoácidos.

Os péptidos podem ser também depositados numa membrana de celulose.

A matriz obtida deste modo é colocada na etapa b) em contacto com uma holoenzima de fosfatase de proteína do tipo 2A ou com uma das suas sub-unidades.

Por "holoenzima de fosfatase de proteína do tipo 2A", deve-se entender qualquer complexo dimérico (AC) ou heterotrimérico (ABC), purificado a partir de um extracto celular ou reconstituído após purificação das duas sub-unidades (A) e (C) de uma fosfatase de proteína do tipo 2A e, se necessário, de uma sub-unidade (B). As fosfatases de proteína do tipo 2A são provenientes, de um modo preferido, de mamíferos.

Os suportes são incubados, por exemplo, numa solução tampão compreendendo as fosfatases de proteína purificadas ou uma das suas sub-unidades purificadas. Uma solução tampão utilizável é o TBS (TRIS BUFFER SALINE) contendo leite pó desnatado a 5% e BSA a 3%.

O péptido ao qual se fixa a holoenzima de fosfatase de proteína do tipo 2A é identificado, em geral, por marcação directa ou indirecta da fosfatase de proteína e por identificação dos locais ao nível dos quais foi fixa a proteína marcada. A fixação da PP2A ou de uma das suas sub-unidades ao nível desses locais peptídico pode ser deste modo divulgada, em particular, utilizando antissoros, de acordo com as técnicas normalmente utilizadas na transferência de Western ou no teste ELISA em fase sólida, após incubação do suporte contendo a matriz de péptidos com um anticorpo dirigido contra as sub-unidades (A) ou (B) ou (C) ou com uma mistura do anticorpo dirigido contra as sub-unidades (A), (B) ou (C) de PP2A.

A aplicação do método "SPOT synthesis" descrita no documento FR N° 0110139 origina a identificação dos péptidos E4orf4 e Bcl-2, úteis nomeadamente nos tratamentos antitumorais, antivirais e antiparasitários, com um tamanho inferior a 30 aminoácidos, mesmo inferior a 20 aminoácidos, sendo os referidos péptidos acima capazes de se ligarem *in vitro* a uma holoenzima de fosfatase de proteína do tipo 2A ou a uma das suas sub-unidades.

O pedido descreve, conseqüentemente, um péptido E4orf4 ou Bcl-2, natural ou sintético, com um tamanho inferior a 30 aminoácidos, de um modo preferido inferior a 20 aminoácidos, caracterizados por este se ligar *in vitro*, de um modo específico, a uma holoenzima de fosfatase de proteína do tipo 2A ou a uma das suas sub-unidades, (A), (B) ou (C). Por ligação específica, deve ser entendido que o péptido é capaz de inibir de um modo competitivo a ligação de uma proteína de origem viral ou parasitária com as PP2A. O pedido descreve, também, um péptido compreendendo, por um lado, uma sequência de 12

aminoácidos derivados de Ck2 α de *Theileria parva* (FD6) capaz de interagir com a sub-unidade A da PP2A e de penetrar na célula da linha *HeLa* (Garcia, A. *et al.*, (2000) Inhibitions de processus tumoraux ou infectieux par transfert intracellulaire de peptides mimant des sites d'interaction avec la sérine/thréonine phosphatase PP2A e, por outro, a sequência correspondente ao local da interacção da PP2A com a sub-unidade B α do local 1-B da PP2A (ver Tabela 1). Este péptido pode penetrar nas células e, à semelhança da proteína E4orf4 de adenovírus humano, poderá interagir com a PP2A e causar a apoptose nas células cancerosas sem afectar as células normais.

Os péptidos E4orf4 e Bcl-2 identificados e o péptido proposto FD6-E4orf4 são particularmente úteis no tratamento de determinados tumores, determinadas infecções virais ou parasitárias. O especialista na técnica pode seleccionar, utilizando testes de competição da ligação, novos péptidos, derivados das sequências identificadas da invenção, inibindo os referidos péptidos a ligação da proteína nativa da qual estes derivam a uma holoenzima PP2A ou a uma das suas sub-unidades de um modo competitivo.

Deste modo, o pedido descreve, igualmente, um péptido natural ou sintético, tal como definido acima, caracterizado por este inibir de um modo competitivo, a interacção da proteína nativa da qual este deriva com uma holoenzima PP2A ou com uma das suas sub-unidades.

Os péptidos de acordo com a invenção, para serem eficazes *in vivo* no tratamento de determinados tumores ou de determinadas infecções virais ou parasitárias, podem ser ligados a um vector capaz de transferir o referido péptido para uma célula

eucariota. O tamanho reduzido dos péptidos da invenção permite-lhes atravessar a membrana celular mais facilmente. A utilização de vectores adequados permite, ainda, visar péptidos em determinados tecidos, determinadas células, mesmo determinados compartimentos celulares particulares e, nomeadamente, o citoplasma ou o núcleo das células, em função do efeito terapêutico pretendido.

A invenção refere-se, naturalmente, aos meios que permitem a síntese de péptidos da invenção. Em particular a invenção refere-se a polinucléotidos caracterizados por a sua sequência consistir na sequência codificante de um péptido de acordo com a invenção. O pedido presente descreve, igualmente, polinucléotidos cuja sequência é seleccionada de uma das sequências seguintes:

E4 orf4 (375 pb)

```
atggcccacc atcgtctgcc ccgcgtttgt gtaaagggca ttattcattt tgaggaagát 60
tttgtagag agcttgatc aatgctggag ttcctatgg agtttctctt cgacaccatt 120
gatgatgta ctgcttctat attttgtaa agcatgtta aggctgtga taaaacaag 180
cctgggatta cttttaaggt ggtcttttac tctcagctg gttttgagta tgatgatgct 240
cttgacacatt ttaaaggcac ttaataaaa gaaatttctg acgttgtaa taatcacct 300
aatgtaaaca atgcttttag aggaagggag attgtcactg tatctttgtt agaagtgtt 360
agtttttgtt cataa
```

Bcl-2 (618pb)

```
atggcgcacg ctgggagaac ggggtacgac aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat 60
tataagctgt cgcagagggg ctacgagtgg gatgcgggag atgtgggcgc cgcgcccccg 120
ggggccgccc ccgacccggg catcttctcc tcccagcccg ggcacacgcc ccatccagcc 180
gcatcccgcg acccggctgc caggacctcg ccgctgcaga ccccggctgc ccccggcgcc 240
gcccgggggc ctgcgctcag cccggtgcca cctgtggtcc acctggcctt ccgccaagcc 300
ggcgacgact tctcccgccg ctaccgcggc gacttcgccc agatgtccag ccagctgcac 360
ctgacgccct tcaccgcgcg gggacgctt gccacgggtg tggaggagct cttcagggac 420
ggggtgaact ggggaggat tgtggccttc tttgagttcg gtggggtcat gtgtgtggag 480
agcgtcaacc gggagatgct gccctggtg gacaacatcg ccctgtggat gactgagtac 540
ctgaaccggc acctgcacac ctggatccag gataaccgag gctgggtagg tgcactctgt 600
gatgtgagtc tgggctga
```

Pode ser vantajoso sintetizar um polipéptido compreendendo a repetição dos motivos peptídicos identificados da invenção. Consequentemente, a invenção refere-se a um polinucleótido caracterizado por este consistir num multímero do polinucleótido codificando para um péptido da invenção. A invenção refere-se, igualmente, a um polipéptido caracterizado por consistir na repetição de um péptido de acordo com a invenção.

A invenção refere-se, igualmente, a um vector de expressão celular, caracterizado por este compreender um polinucleótido tal como definido acima e a sequências reguladoras permitindo a expressão de um péptido de acordo com a invenção numa célula hospedeira.

O pedido descreve, igualmente, um método de preparação de um péptido tal como definido no pedido, compreendendo a transformação de um hospedeiro celular utilizando um vector de expressão celular tal como definido acima, seguida pela colocação em cultura do hospedeiro celular deste modo transformado e a recuperação do péptido no meio de cultura.

A invenção refere-se, ainda, a um anticorpo purificado policlonal ou monoclonal caracterizado por ser capaz de se ligar de um modo específico a um péptido de acordo com a invenção.

Os anticorpos especificamente dirigidos contra os péptidos identificados da invenção são obtidos, por exemplo, por imunização de um animal após injeção de um péptido de acordo com a invenção e recuperação dos anticorpos produzidos. Um anticorpo monoclonal pode ser obtido de acordo com as técnicas conhecidas do especialista na técnica, tal como o método dos hibridomas descrito por Kohler e Milstein (1975).

Os anticorpos obtidos, dirigidos especificamente contra os alvos da fosfatase de proteína 2A encontram a sua aplicação, em particular, em imunoterapia. Estes podem ser utilizados, por exemplo, como antagonistas de proteína virais ou parasitárias dirigidos contra a fosfatase de proteína 2A para bloquear o desenvolvimento viral ou parasitário.

De mesmo modo, os polinucleótidos codificando os péptidos da invenção pode ser transferidos directamente para o núcleo de células alvo, se necessário utilizando vectores adequados, para permitir à expressão *in vivo* de péptidos correspondentes, sendo os referidos péptidos acima susceptíveis de bloquear uma interacção específica entre a fosfatase de proteína 2A e a proteína viral ou celular da qual estes derivam, por inibição competitiva.

Deste modo, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um dos elementos seleccionados de um polinucleótido de acordo com a invenção ou um anticorpo de acordo com a invenção.

A invenção refere-se, igualmente, a uma composição farmacêutica compreendendo um péptido da invenção em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

A invenção visa, além disso, uma utilização de um péptido da invenção definido acima, na preparação de um medicamento útil no tratamento de uma infecção viral ou parasitária.

Os péptidos da invenção podem ser vantajosamente seleccionados para estimular a indução da apoptose relacionada com a activação da fosfatase de proteína 2A celular. Deste modo,

a invenção refere-se, igualmente, à utilização de um péptido de acordo com a invenção, tal como definido acima, na preparação de um medicamento apto a induzir a apoptose de células alvo e em particular de células tumorais.

O cancro resulta numa expressão específica de proteínas cuja actividade é regulável pelas sequências peptídicas da invenção. As sequências codificando os péptidos da invenção podem ser conseqüentemente utilizadas como sonda para detectar o desenvolvimento tumoral, de um modo específico, a partir de ARN extraído de uma amostra biológica de um doente.

De mesmo modo, um anticorpo de acordo com a invenção pode ser utilizado especificamente para reconhecer as sequências peptídico contidas nas proteínas virais ou celulares expressas durante a tumorigénese.

Deste modo, a invenção refere-se, conseqüentemente, à utilização de um polinucleótido de acordo com a invenção ou de um anticorpo de acordo com a invenção no diagnóstico *in vitro* de cancros.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Identificação dos locais de ligação da proteína E4orf4 com a PP2A.

Figura 2: Identificação dos locais de ligação da proteína Bcl-2 com a PP2A.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS DA INVENÇÃO

O pedido descreve um péptido caracterizado por este se tratar de um fragmento da proteína adenoviral E4orf4 ou da proteína celular Bcl-2 ou do péptido proposto Ck α 2-E4orf4, ligando-se a referida proteína *in vitro* a uma fosfatase de proteína do tipo 2A ou a uma das suas sub-unidades ou a uma sequência que se distingue do fragmento de proteína anterior por substituição ou eliminação de aminoácidos, conservando, no entanto, a referida sequência distinta, as propriedades de ligação a uma fosfatase de proteína do tipo 2A ou a uma das suas sub-unidades.

Em particular, uma sequência distinta é uma sequência peptídica que aumenta a afinidade da ligação à fosfatase de proteína do tipo 2A ou a uma das suas sub-unidades em comparação com a sequência da qual esta deriva. Uma outra sequência distinta, tal como definida acima, é uma sequência peptídica homóloga a uma sequência peptídica identificada inicialmente, ou seja uma sequência derivada de uma proteína de outra espécie que não a da sequência peptídica identificada inicialmente e cuja sequência primária pode ser alinhada com a sequência peptídica identificada inicialmente utilizando um programa de alinhamento óptimo normalmente utilizado, tal como o programa BESTFIT (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, GCG). Em particular uma sequência A será considerada como homóloga a uma sequência B se as referidas sequências A e B apresentarem uma homologia de, pelo menos, 50%, de um modo preferido, homologia de 75%, após alinhamento das sequências utilizando um programa de alinhamento óptimo tal como o programa BESTFIT. De um modo mais preferido, duas sequências são, também, consideradas homólogas se as sequências forem quase idênticas

com excepção de alguns resíduos, podendo representar 10 a 20% de variabilidade em relação à sequência total. Além disso os aminoácidos semelhantes em termos da sua função química (tais como, por exemplo, Arg e Lys) são considerados como equivalentes.

Um péptido particularmente preferido é um fragmento da proteína E4orf4 de adenovírus, em particular um fragmento da proteína E4orf4 do adenovírus do tipo 2 de cão ou uma sequência que se distingue do fragmento da proteína anterior por substituição ou eliminação de aminoácidos, conservando, no entanto, a referida sequência distinta, as propriedades de ligação à fosfatase de proteína do tipo 2A ou a uma das suas sub-unidades.

A invenção tem, como um objectivo, um péptido caracterizado por ser seleccionado de uma das sequências seguintes:

- a) RELGSMLE SPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 1)
- b) LGSMLE SPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 2)
- c) SMLE SPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 3)
- d) VKKKKIKREIKI SMLE SPMEFLFDTI DDTVTAS (SEQ. ID N°: 6)
- e) GSMLESPMEFLFDTI DDVTAS.

O pedido descreve, igualmente, um péptido caracterizado por este estar incluído numa das sequências seguintes:

- a) RELGSMLESPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 1)
- b) LGSMLE SPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 2)
- c) SMLE SPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 3)
- d) HFKGTLIKEISDVVNN (SEQ. ID N°: 4)
- e) AFRGRE VTVSLLEVFSFC (SEQ. ID N°:5)
- e) V K K K K I K R E I K I SMLE SPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 6)
- g) ARTSPLQTPAAPGAAAGPAL (SEQ. ID N°: 7)
- h) RFATVVEELFRDGVNW (SEQ. ID N°: 8)
- i) RPLDFFSWLSLKTLLSLALVGA (SEQ. ID N°: 9)
- j) PLQTPAAPGAAAGPAL (SEQ. ID N°: 10)
- k) LDFFSWLSLKTLLSLALVGA (SEQ. ID N°: 11)

Entre os péptidos de sequências que se distinguem das SEQ. ID N°: 1, 2, 3,4, 5 ou 6 por substituição ou eliminação de aminoácidos, referem-se, mais particularmente, péptidos cuja sequência está incluída numa das sequências da proteína E4orf4 de diferentes variantes do adenovírus do tipo 2 de cão e humano

e correspondente às sequências homólogas nestas variantes das SEQ ID N°. 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

Os péptidos de sequências que de distinguem das SEQ ID N° 10 ou 11 por substituição ou eliminação de aminoácidos, referem-se, mais particularmente, os péptidos cuja sequência está incluída numa das sequências da proteína celular Bcl-2 e correspondentes às sequências homólogas nas variantes das SEQ ID N° 7, 8, 9, 10 ou 11.

Um péptido preferido é um péptido seleccionado de entre uma das sequências SEQ. ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 e caracterizado por a sua administração induzir a apoptose de células e em particular das células tumorais.

A invenção visa, de um modo preferido, a utilização de um péptido cuja sequência deriva de um fragmento da proteína E4orf4, tal como definida acima, na preparação de um medicamento apto a inibir a infecção viral.

EXEMPLOS

Proteínas PP2A purificadas

Proteína trimérica PP2A1 foi purificada até à homogeneidade a partir de cérebro de porco.

Proteína A (sub-unidade estrutural da PP2A) recombinante expressa na bactéria.

Proteína B55 (sub-unidade reguladora da PP2A) recombinante expressa na bactéria.

Identificação dos locais de ligação de Eorf4 e Bcl-2 a PP2A

A requerente mapeou o local de ligação entre as proteínas E4orf4 (codificada pelo adenovírus do tipo 2 de cão) e a proteína anti-apoptótica Bcl-2 com PP2A utilizando a técnica dos “péptidos em gota” que foi anteriormente descrita (Frank e Overwing. (1996). *Meth. Mol. Biol.* **66**,149-169).

Esta abordagem é baseada na utilização de membranas onde são depositados dodecapéptidos que representam a totalidade da proteína de interesse (neste caso E4orf4 e Bcl-2) com um desfasamento de dois aminoácidos por péptido.

Cada membrana é inicialmente saturada, durante 1 hora, à temperatura ambiente, com TBS contendo com leite em pó desnatado a 5% e BSA a 3%, depois, é incubada durante uma noite no mesmo tampão na presença da proteína purificada 4 µg/mL (sub-unidade A da PP2A e holoenzima PP2A1). Foram sintetizados cinquenta e seis dodecapéptidos abrangendo a totalidade da sequência da proteína E4orf4 e cento e quinze dodecapéptidos abrangendo toda a sequência da proteína Bcl-2 e foram ligados de um modo covalente a membranas de celulose.

E4orf4 :

MAHHRLPRVCVKGIHFEEFDVRELGSMLESPMEFLFDTIDDVTAFTSIFCESMFK
AVDKNKPGITFKVVFYSQLGFEYDDALAHFKGTLIKEISDVVNNHPNVNNFTA
GREIVTVSLLEVFSFCS.

Bcl-2 :

MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAGDVGAAPPGAAPAFTPGIFSS
QPGHTPHPAASRDPVARTSPLQTPAAPGAAAGPALSPPVPPVHLALRQAGDDF
FTSRRYRGDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWGRIVAFFEFGGV
MCVESVNFTREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHTWIQDNGGWVGASGDVSLG.

É divulgada a interação específica de cada proteína purificada (respectivamente a sub-unidade estrutural A, a sub-unidade reguladora B55 (B) ou a holoenzima trimérica ABC (denominada PP2A1) com uma sequência peptídica, sob a forma de uma transferência de Western, após incubação da membrana com um anticorpo dirigido contra a proteína estrutural A (A), com a sub-unidade reguladora B (B) e com uma mistura de anticorpos reconhecendo as proteínas A, B e C da PP2A (ABC) (Figuras 1,2).

EXEMPLO 1

Identificação de sequências peptídicas contendo os locais de ligação da proteína E4orf4 codificada pelo adenovírus do tipo 2 de cão com proteínas da família da PP2A.

O rastreio de uma membrana contendo os péptidos abrangendo as sequências de E4orf4 com as diferentes formas da PP2A purificada (a figura 1) permitiu à requerente identificar cinco sequências de aminoácidos que contêm locais de interação da E4orf4 com a PP2A (ver a tabela 1).

Respectivamente a requerente pode determinar:

- uma sequência peptídica contendo um local de ligação da E4orf4 à sub-unidade estrutural B (“local B1” correspondente aos péptidos 12 a 18).
- Três sequências peptídicas correspondentes a três locais da ligação da E4orf4 à sub-unidade A (“local 1” correspondente aos péptidos 13 a 18 e “local A2” correspondente aos péptidos 41 a 43 e “local A3” correspondente aos péptidos 52 a 55).
- Duas sequências peptídicas correspondentes a dois locais de ligação da E4orf4 à proteína PP2A1 (“local B1” correspondente aos péptidos 14 a 18 e “local A3” correspondente aos péptidos 52 a 55).

É interessante constatar (tabela 1) que os locais B1, A1 e ABC1 se sobrepõem parcialmente o que sugere:

- que as sub-unidades A e B podem interagir com o mesmo local o que nunca foi estabelecido no sistema PP2A. Além disso, a interação da PP2A trimérica com este local requer uma sequência um pouco mais curta o que sugere uma regulação conformacional.

Tabela 1: Locais de ligações da E4orf4 com diferentes PP2A

Local B1	23-RELGSMLE SPMEFLFDTI DDVTAS-46
Local A1	25- LGSMLE SPMEFLFDTI DDVTAS-46
Local ABC1	28 -SMLE SPMEFLFDTI DDVTAS-4
Local A2	83- HFKGTLIKEISDWN-98
Local A3	106- AFRGRE VTVSLLEVFSFC-124

EXEMPLO 2 (Exemplo comparativo)

Identificação de sequências peptídicas contendo locais de ligação da proteína Bcl-2 a proteínas da família da PP2A.

O rastreamento de uma membrana contendo peptídeos abrangendo as sequências da Bcl-2 com as diferentes formas da PP2A purificada (figura 2) permitiu à requerente identificar cinco sequências de aminoácidos que contêm locais de interação da Bel-2 com a PP2A (ver a tabela 2).

Respectivamente, a requerente pode determinar:

- uma sequência peptídica contendo um local de ligação da Bcl-2 à sub-unidade reguladora B (local 1-B correspondente aos peptídeos 33-37).
- duas sequências peptídicas contendo dois locais de ligação da Bcl-2 à sub-unidade estrutural A (local A1 correspondente aos peptídeos 64-67 e o local A2 correspondente aos peptídeos 104-109).

- duas sequências peptídicas contendo um local da ligação da Bcl-2 à holoenzima PP2A1 (local 1-ABC correspondente aos péptidos 35 a 37 e local 2-ABC correspondente aos péptidos 105-109). É interessante observar que os locais 1-ABC e 2-ABC correspondem, respectivamente, aos locais 1-B e A2 com desfasamentos de dois e quatro aminoácidos respectivamente, provavelmente relacionados com uma conformação diferente resultante da interacção das proteínas A ou B na holoenzima.

Além disso, é notável que o local 1-B/1-ABC se situa ao nível da ser-70 cuja fosforilação regula a actividade da PP2A enquanto o local 2-abc/a2 se situa na extremidade do terminal C da proteína. Na totalidade e contrariamente aos locais de interacção com a PP1 estes dois locais não interferem com os domínios BH da proteína PP2A (ver Garcia A. *et al.*, PP1 et PP2A des ser/thr phosphatases au coeur de l'apoptose (2001). *Med/Sci* **17**, 1214-1216 para uma discussão geral).

Tabela 2: Locais de ligação da Bcl-2 com diferentes PP2A

Local 1-B	67-ARTSPLQTPAAPGAAAGPAL-86
Local A1	129- RFATWEELFRDGVNW-144
Local A2	207- RPLDFSWLSLKTLLSLALVGA-228
Local 1-ABC (local 1 B)	71- PLQTPAAPGAAAGPAL -86
Local 2-ABC (local A2)	209- LDFDFSWLSLKTLLSLALVGA-228

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> INSTITUT PASTEUR

<120> Péptidos ligantes da fosfatase de proteína 2A e polinucléotidos que os codificam

<130> B5776-AD/CAL

<140>

<141>

<150> CA 2.408.207 <151> 2002-10-16

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 1

Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Met	Leu	Glu	Ser	Pro	Met	Glu	Phe	Leu	Phe
				5					10					15
Asp	Thr	Ile	Asp	Asp	Val	Thr	Ala	Ser						
				20										

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 2

Leu	Gly	Ser	Met	Leu	Glu	Ser	Pro	Met	Glu	Phe	Leu	Phe	Asp	Thr
				5					10					15
Ile	Asp	Asp	Val	Thr	Ala	Ser								
				20										

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 3

Ser	Met	Leu	Glu	Ser	Pro	Met	Glu	Phe	Leu	Phe	Asp	Thr	Ile	Asp
				5					10					15
Asp	Val	Thr	Ala	Ser										
				20										

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 4

His	Phe	Lys	Gly	Thr	Leu	Ile	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Val	Val	Asn
				5					10					15
Asn														

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 5

Ala	Phe	Arg	Gly	Arg	Glu	Val	Thr	Val	Ser	Leu	Leu	Glu	Val	Phe
				5					10					15
Ser	Phe	Cys												

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 6

Val	Lys	Lys	Lys	Lys	Ile	Lys	Arg	Glu	Ile	Lys	Ile	Ser	Met	Leu
				5					10					15
Glu	Ser	Pro	Met	Glu	Phe	Leu	Phe	Asp	Thr	Ile	Asp	Asp	Val	Thr
				20					25					30
Ala	Ser													

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 7

Ala	Arg	Thr	Ser	Pro	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Gly	Ala	Ala
				5					10					15
Ala	Gly	Pro	Ala	Leu										
				20										

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 8

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn
5 10 15
Trp

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 9

Arg Pro Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu
5 10 15
Ser Leu Ala Leu Val Gly Ala
20

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 10

Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Pro Ala
5 10 15
Leu

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<400> 11

Leu	Phe	Asp	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu
				5					10					15
Ala	Leu	Val	Gly	Ala										
				20										

Lisboa, 31 de Maio de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido caracterizado por este se ligar *in vitro*, de um modo específico, a uma holoenzima de fosfatase de proteína de tipo 2A ou a uma das suas sub-unidades e por este ser seleccionado de uma das sequências seguintes:

a) sequência RELGSMLESPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N° 1), proveniente da proteína E4orf4 do adenovírus do tipo 2 de cão;

b) sequência LGSMLESPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 2), proveniente da proteína E4orf4 do adenovírus do tipo 2 de cão;

c) sequência GSMLESPMEFLFDTI DDVTAS, proveniente da proteína E4orf4 do adenovírus do tipo 2 de cão;

d) sequência SMLESPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 3), proveniente da proteína E4orf4 do adenovírus do tipo 2 de cão; e

e) sequência VKKKKIKREIKISMLESPMEFLFDTI DDVTAS (SEQ. ID N°: 6), proveniente da proteína Ck α 2 de *Theileria parva* e da proteína E4orf4 do adenovírus do tipo 2 de cão.

2. Péptido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por este estar ligado a um vector capaz de transferir o referido péptido para uma célula eucariota.

3. Polipéptido caracterizado por este ser constituído pela repetição de um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2.
4. Polinucleótido caracterizado por a sua sequência consistir na sequência codificante de um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2.
5. Polinucleótidos caracterizados por estes consistirem num multímero do polinucleótido de acordo com a reivindicação 4.
6. Vector de expressão celular, caracterizado por este conter um polinucleótido de acordo com a reivindicação 4 ou 5 e sequências reguladoras permitindo a expressão de um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2 numa célula hospedeira.
7. Anticorpo purificado policlonal ou monoclonal caracterizado por ser capaz de se ligar, de um modo específico, a qualquer um dos péptidos de acordo com a reivindicação 1 ou 2.
8. Composição farmacêutica compreendendo um péptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.
9. Composição farmacêutica compreendendo um dos elementos seleccionados de um polinucleótido de acordo com a reivindicação 4 ou 5, um vector de expressão de acordo com a reivindicação 6 ou um anticorpo de acordo com a reivindicação 7.

10. Utilização dos péptidos definidos de acordo com a reivindicação 1 ou 2, na preparação de um medicamento útil no tratamento de tumores.
11. Utilização de um péptido definido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, na preparação de um medicamento apto a induzir a apoptose de células alvo e, em particular, de células tumorais.
12. Utilização de um péptido definido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, na preparação de um medicamento útil no tratamento do cancro.
13. Utilização de um polinucleótido de acordo com a reivindicação 4 ou 5 ou de um anticorpo de acordo com a reivindicação 7, no diagnóstico *in vitro* do cancro.

Lisboa, 31 de Maio de 2010

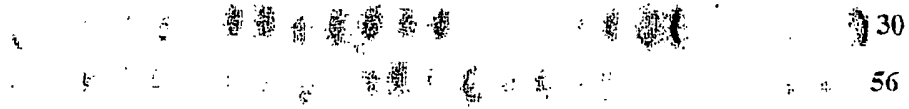
B

Local B1

12 13 14 15 16 17 18

1

4



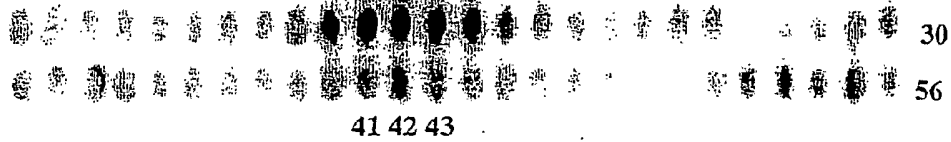
A

Local A1

13 14 15 16 17 18

1

4



Local A2

Local A3

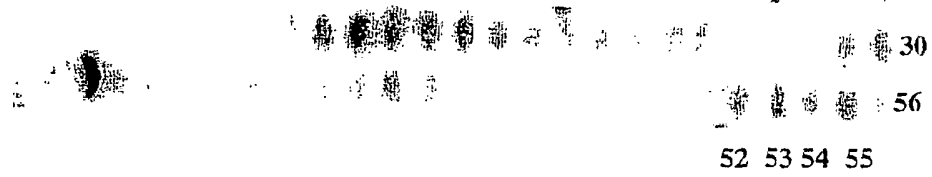
ABC

Local ABC1

14 15 16 17 18

1

4



Local A3

FIG. 1

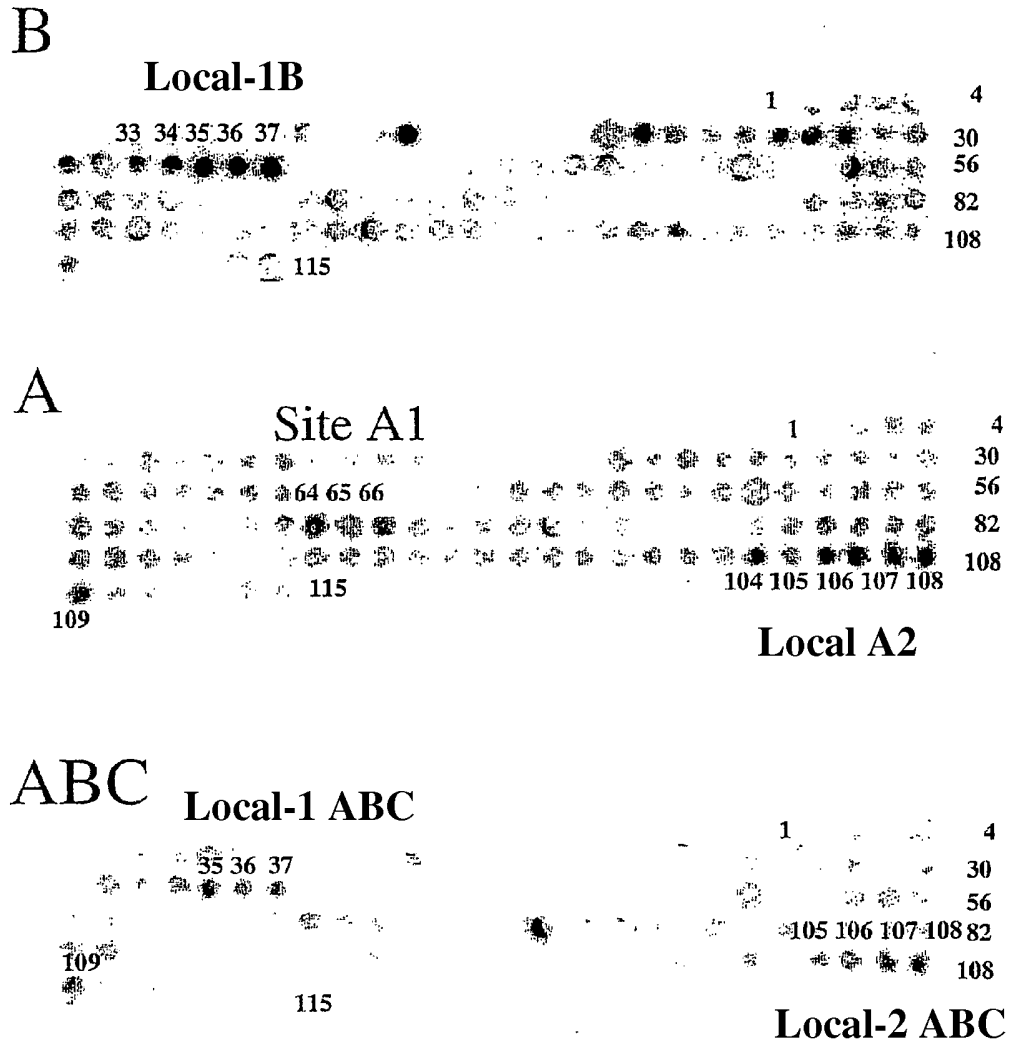


FIG. 2

RESUMO

"PÉPTIDOS LIGANTES DA FOSFATASE DE PROTEÍNA 2A E POLINUCLEÓTIDOS QUE OS CODIFICAM"

A invenção refere-se a novos péptidos E4orf4 ou Bcl-2 sintéticos ou naturais úteis, em particular, nos tratamentos antitumorais, antivirais e antiparasitários, sendo os referidos péptidos de tamanho inferior a 33 aminoácidos e caracterizados por estes se ligarem *in vitro* a uma holoenzima da fosfatase de proteína 2A ou a uma das suas subunidades. A invenção refere-se, também, aos polinucleótidos codificando os novos péptidos, aos vectores que os expressam, assim como aos anticorpos que os reconhecem e às sondas que reconhecem os seus transcritos.