



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0215213-4 B1

(22) Data do Depósito: 04/12/2002

(45) Data de Concessão: 21/08/2018



(54) Título: PEPTÍDEOS COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO COM O SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO POR CASEÍNA QUINASE II, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DOS PEPTÍDEOS, E, VETOR DE EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

(51) Int.Cl.: C07K 7/64; C07K 7/06; A61K 38/08; A61K 38/12

(30) Prioridade Unionista: 20/12/2001 CU 0309/01

(73) Titular(es): CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

(72) Inventor(es): SILVIO ERNESTO PEREA RODRÍGUEZ; OSVALDO REYES ACOSTA; NELSON FRANCISCO SANTIAGO VISPO; YAQUELÍN PUCHADES IZAGUIRRE; RICARDO SILVA RODRÍGUEZ; ALEJANDRO MORO SORIA; ALICIA SANTOS SAVIO; LUIS JAVIER GONZÁLEZ LÓPEZ; BELKIS GONZÁLEZ BARRIOS

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/06/2004

“PEPTÍDEOS COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO COM O SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO POR CASEÍNA QUINASE II, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

A presente invenção refere-se ao ramo da farmacologia molecular e, em particular, refere-se a peptídeos úteis para o tratamento de tumores de origem epitelial associados a tipos oncogênicos de Vírus Papiloma (HPV), já que permitem o bloqueio do domínio de fosforilação por Caseína Quinase II (CKII) mediante a interação direta com o referido sítio.

A CKII é uma enzima serina/treonina que está envolvida no incremento da proliferação celular e sua localização intracelular é fundamentalmente nuclear durante o processo de transformação maligna (Tawfic S, Yu S, Wang H, Faust R, Davis A, Ahmed K, 2001, *Histol. Histopathol.* 16:573-582).

Devido às verificações que demonstram níveis elevados de CKII em diversos tumores sólidos de origem epitelial, considera-se que a atividade de fosforilação por esta enzima é um evento celular importante na transformação maligna e, além disso, um marcador de progressão do tumor (Seldin DC, Leder P, 1995, *Science* 267:894-897) (Faust RA, Gapany M, Tristani P, Davis A, Adams GL, Ahmed K, 1996, *Cancer Letters* 101:31-35).

Por outro lado, a sobre-expressão de CKII em animais transgênicos leva à tumorigênese das glândulas mamárias através do incremento da cascata de sinalização Wnt/beta-catenina nas células epiteliais mamárias (Landesman-Bollag E, Romien-Mourez R, Song DH, Sonenshein GE, Cardiff RD, Seldin DC, 2001, *Oncogene* 20:3247-3257).

Dentro dos tumores de origem epitelial, aqueles associados ao HPV constituem uma fração consideravelmente grande. Por exemplo, a maior parte de todos os cânceres do trato genitourinário está associada com o HPV, e em 99,7 % dos cânceres de células escamosas do cérvix uterino demonstra-

se a presença de seqüências de DNA viral (Walboormers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N, 1999, J. Pathol 189:12-19). Por seu lado, a OMS tem reportado historicamente a ocorrência de aproximadamente 500.000 novos casos de

5 câncer cérvico-uterino no mundo a cada ano (Parkin DM, Laara E, Muir CS, 1980, Int. J. Cancer 41:184-1972). Em Cuba, morrem aproximadamente 370 mulheres anualmente devido a esta doença (Organização Panamericana da Saúde, 1999, Basic Country Health Profiles for the Americas. Cuba, 206-219). Os HPVs classificam-se em tipos oncogênicos e não oncogênicos de

10 acordo com o fato de se as lesões que se originam podem ou não progredir para a malignidade (Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD, 1987, J. Natl. Cancer Inst. 79:671-677). Os tipos oncogênicos como os HPVs 16 e 18 estão associados a neoplasias intra-epiteliais que, de um modo geral, progridem para malignidade e para mais de 90 % das

15 displasias e carcinomas cervicais (Fujinaga Y, Shimada M, Okasawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K, 1991 J. Gen. Virol 72:1039-1044).

Devido à não-disponibilidade, ainda, de uma vacina terapêutica ou profilática para a erradicação do câncer associado ao HPV, impõe-se o emprego de agentes inibidores tanto da transcrição viral como das

20 oncoproteínas virais. Os biomoduladores, como o IFN [interferon], foram empregados com certa eficácia em algumas doenças associadas com o HPV, como o condiloma acuminado, verrugas plantais e papilomatose respiratória (Koromilas AE, Li S, Matlashewski G, 2001. Cytokine & Growth Factor Reviews 12:157-170). Em experimentos anteriores realizados em células

25 humanas transformadas por HPV oncogênicos (HeLa) demonstramos que a exposição contínua com IFNs alfa produz a reversão do fenótipo maligno de referidas células com a paralela inibição da expressão de RNAm viral (López-Ocejo O, Perea SE, Reyes A, Vigoa L, López-Saura P, 1993. J. IFN Res 13:369-375). No mesmo modelo celular verificamos que o IFN- α modula os

níveis de RNAm do HPV mediante a repressão da transcrição viral endógena (Perea SE, López-Ocejo O, García-Milián R, Araña MJ, 1995, J. IFN & Cytokine Res 15:495-501). De acordo com os resultados obtidos em linhas celulares transformadas com HPV, observamos adicionalmente que o tratamento com IFN- α *in vivo* em pacientes com câncer cérvico-uterino era capaz de modular a expressão de RNAm viral em ensaio clínico piloto (García-Milián R, Rios MA, Díaz D, Silveira M, Guilar O, Amigó M, Araña MJ, Perea SE, 1996, J. IFN and Cytokine Res 16:709-713). Apesar das verificações promissórias sobre o emprego do IFN como regulador da expressão do RNAm do HPV, os resultados indicam conjuntamente uma variabilidade na resposta e, por outro lado, o fenômeno de resistência a esta citocina foi reportado na clínica entre 40 e 50 % dos pacientes (Arany I, Tyring SK, Stanley MA, Tomai MA, Miller RL, Smith MH, McDermott, DJ, Slade HB, 1999, Antiviral Res 43:55-63).

Algumas evidências, tanto em nível molecular como em nível clínico, indicam que a oncoproteína E7 desempenha um papel fundamental no fenômeno da resistência ao IFN. Por exemplo, reportou-se que E7 é capaz de unir-se à proteína celular p48, um fator de transcrição induzido por IFN, afetando assim seu papel como ativador transcripcional e, por fim, resposta a IFN (BRNAard P and McMillan NAJ, 1999, Virology 259:305-313). Também no nível molecular descreveu-se a alteração do fator transcripcional induzido por IFN denominado Interferon Regulatory Factor (IRF-1) na presença de E7 (Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ, 2000, J Biol Chem 275:6764-6769) (Perea SE, Massimi P, Banks L, 2000, J Mol Med 5:661-666). No nível clínico observou-se que a resposta ao IFN depende dos níveis de expressão de E7 em lesões que contêm HPV (Frazer IH, McMillan NAJ, 1997, Papillomatose and condyloma acuminata. Clinical Applications of the Interferons (R Stuart Harris and RD Penny, eds) pp. 79-90, Chapman and Hall Medical, London). A oncoproteína E7 do HPV

desempenha um papel essencial no processo de transformação maligna induzido por estes vírus oncogênicos. Assim, demonstrou-se que a imortalização de células primárias pelo gene E7 leva à indução de aberrações cromossômicas e mutações desde o início do processo de imortalização (Mougin C, Humbey O, Gay C, Riethmuller D, 2000, J. Gynecol Obstet. Biol. Reprod 29:13-20). Em ensaios independentes demonstramos que a transfecção estável do gene E7 leva à aquisição de um fenótipo de resistência ao IFN por parte de células tumorais que inicialmente apresentavam alta sensibilidade a esta citocina (Moro A, Calixto A, Suárez E, Araña MJ, Perea SE, 1998, Bioch Bioph Res Comm 245:752-756). Por outro lado, demonstrou-se que a oncoproteína E7 associa-se e bloqueia a função de genes supressores de tumores, como o Retinoblastoma humano (Rb) e o Insulin like Growth Factor Binding Protein-3" (IGFBP-3) através da Cys 24 e da região Carboxila Terminal respectivamente (Nevins JR, 1992, Science 258:424-429) (Zwerschke W and Jansen-Durr P, 2000, Advances in Cancer Res 78:1-29). Ainda assim, o duplete de Ser 31/Ser 32 dentro da proteína E7 mostrou ser substrato para a enzima (CKII) (Hashida T, Yasumoto S, 1990, Biochem. Biophys Res. Comm 172:958-964) e, adicionalmente, é essencial tanto para a capacidade transformadora desta oncoproteína (Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden K, 1990, EMBO J 9:153-160) (Chien W-M, Parker JN, Schmidt-Grimminger D-C, Broker TR, Chow LT, 2000, Cell Growth & Differentiation 11:425-435) como para a capacidade de inibir a cascata de sinalização do interferon (IFN) (Perea SE, López-Ocejo O, García Milián R, Banks L, Araña MJ, 1996, Eur. Cytokine Net 7:503).

Com base no papel do sítio de fosforilação por CKII na resistência do HPV ao IFN, e no desenvolvimento do câncer de forma geral, o desenho de drogas que bloqueiam referido domínio pode converter-se em poderosas ferramentas para a terapêutica do câncer. Até o momento não se descreveram moléculas que bloqueiam o sítio de fosforilação por Caseína

Quinase II dentro da oncoproteína E7 do HPV nem em outros substratos celulares.

Quanto à oncoproteína E7, somente se conhecem soluções técnicas relacionadas com peptídeos inibidores do sítio de ligação com a proteína do Rb (Cys 24) (Webster KR, Koleman KG, 1997, U.S. 5.625.031) (Oliff A1, Riemen MW, EP 0412762 A2 910213) e com o bloqueio de regiões compreendidas na porção C-terminal da oncoproteína (aminoácidos de 39-98) (Pidder J-D, Zwerschke W, 2000, EP0969013).

Até o momento existem em fase experimental candidatos a vacina voltados para o desenvolvimento de resposta celular tipo "CTL" específica contra a oncoproteína E7 do HPV (Chen C, Wang CC, Hung C, Pardoll DM, Wu T, 2000, Vaccine 18:2015-2022) (Chen CH, Ji H, Suh KW, Choti MA, Pardoll DM, Wu TC, 1999, Gene Ther 12:1972-1981). No entanto, as abordagens empreendidas para incrementar este tipo de resposta passam por diferentes debilidades relacionadas com a Biologia dos HPVs. Por exemplo, os tipos oncogênicos destes vírus regulam negativamente os antígenos MHC de classe I que são essenciais na resposta CTL (Connor ME, Stern PL, 1990, Int J Cancer 46:1029-1034). Adicionalmente, a expressão de E7 está associada com imunossupressão local no ambiente do tumor que também pode afetar o desencadeamento ótimo de uma resposta CTL (Le Buanec H, D'Anna R, Lachgar A, Zagury JF, Bernard J, Ittlele D, d'Alessio P, Hallez S, Giannouli C, Burny A, Bizzini B, Gallo RC, Zagury D, 1999, Biomed Pharmacother 53:424-431) (Lee SJ, Cho YS, Shim JH, Lee KA, Ko KK, Choe YK, Park SN, Hoshino T, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY, 2001, J Immunol 167:497-504). De acordo com os aspectos indicados poderia parecer que o futuro das vacinas de tipo CTL para a infecção por HPV está combinado com fármacos que bloqueiam diretamente a oncoproteína E7. Por seu lado, as variantes experimentais de vacina preventiva da infecção pelo HPV enfrentam o risco da relação custo-benefício que pode ser afetada por

diferentes aspectos de caráter biológico e social entre os quais encontram-se: O grande período de latência depois da infecção primária, [pois] não se conhece exatamente o mecanismo com que se produz a infecção primária, não existem modelos animais de propagação do HPV ligado à sua especificidade de espécie, e o tempo para avaliar o impacto social da vacina profilática pode ser muito prolongado. Por estas razões a variante de utilizar fármacos inibidores específicos diretos contra as oncoproteínas virais pode oferecer vantagens relativamente às abordagens empreendidas para manipular o sistema imunológico.

10 Essência da invenção

A essência e novidade da presente invenção reside na descrição, pela primeira vez, de peptídeos com estrutura cíclica que permitem a inibição direta do sítio de fosforilação por CKII *in vitro*, bem como a produção *in vivo* de citotoxicidade em células de carcinoma de colo uterino transformadas por HPV-16. Adicionalmente, estes peptídeos incrementam a sensibilidade destas células com efeito citostático do IFN.

Descrição detalhada da invenção:

A invenção refere-se particularmente a peptídeos com capacidade de ligação ao sítio de fosforilação por CKII que apresentam as seqüências:

- (a) CSVRQGPVQKC (SEQ ID NO. 1)
- (b) CSSCQNSPALC (SEQ ID NO. 2)
- (c) CQIPQRTATRC (SEQ ID NO. 3)
- (d) CAKQRTDPGYC (SEQ ID NO. 4)
- (e) CWMSPRHLGTC (SEQ ID NO. 5)
- (f) CRNCTVIQFSC (SEQ ID NO. 6)
- (g) CHYIAGTVQGC (SEQ ID NO. 7)
- (h) CPLVSLRDHSC (SEQ ID NO. 8)
- (i) CKQSYLHLLC (SEQ ID NO. 9)

(j) CFQPLTPLCRC (SEQ ID NO. 10)

(k) CQSYHELLLQC (SEQ ID NO. 11)

A invenção também inclui qualquer variante homóloga ou mimética dos peptídeos anteriores, que tenha sido obtida por via sintética ou recombinante, assim como qualquer peptídeo de fusão que os contenha. Compreende-se por variante homóloga qualquer peptídeo cuja estrutura permita bloquear o sítio de fosforilação por CKII nos substratos respectivos. Compreende-se também por variante mimética qualquer molécula de origem química (não protéica) cuja estrutura permita bloquear referido sítio de fosforilação.

Outro objeto da invenção é uma composição farmacêutica que compreende um ou mais dos peptídeos da invenção, bem como um excipiente apropriado.

A invenção também contempla o uso dos peptídeos indicados, sozinhos ou em combinação com alguma outra molécula apropriada, como por exemplo um uma citocina, e, mais especificamente, um interferon, para a inibição da proliferação de células tumorais; para o tratamento do câncer associado com o Vírus Papiloma Humano, bem como de outros tumores não originados por estes oncovírus; e, mais particularmente, para o tratamento de lesões originadas pelo Vírus Papiloma Humano em estágios pré-malignos.

Os peptídeos da invenção também podem ser empregados para o tratamento de pacientes infectados com Vírus Papiloma Humano resistentes ao tratamento com IFN. Em outra concretização da invenção, esta compreende um vetor de expressão em células de mamíferos que compreende uma seqüência de DNA que codifica para qualquer dos peptídeos referidos previamente.

Os peptídeos da invenção apresentam uma estrutura cíclica e caracterizam-se fundamentalmente por sua capacidade de ligação com o domínio de fosforilação por CKII, e, conseqüentemente, inibição de referido

evento bioquímico. Os peptídeos são descritos na listagem de seqüências anexa. Por outro lado, demonstram-se os efeitos *in vivo* que os peptídeos objeto da presente invenção produzem em células de carcinoma cérvico-uterino transformadas com HPV-16.

5 Os peptídeos descritos foram definidos por sua capacidade de inibir a fosforilação da seqüência RRREEETEEE previamente descrita como domínio consenso ótimo para a fosforilação por CKII (Promega Cat:V5661) e, adicionalmente, por sua capacidade de inibição do sítio de fosforilação contido na região de 28-38 da oncoproteína E7 do HPV-16 (Ser31/Ser32).

10 Para a definição dos peptídeos descritos na invenção construiu-se uma biblioteca de peptídeos cíclicos de 11 aminoácidos expressos na região P8 de fagos filamentosos e realizou-se a pesquisa da mesma usando como alvo a região de 28-38 da E7 sintetizada quimicamente e conjugada à biotina para facilitar sua fixação a um suporte sólido. A seleção
15 dos fagos que se ligaram especificamente à região 28-38 da oncoproteína E7 foi realizada através da imunoidentificação destes com um anticorpo contra a região P8 do fago. Finalmente, o DNA correspondente aos peptídeos dos onze fagos com grande capacidade de ligação com a região 28-38 de E7 foi seqüenciado e os peptídeos correspondentes foram sintetizados quimicamente
20 pelo método de fase sólida. Os peptídeos sintéticos foram purificados posteriormente por meio de HPLC, analisados por meio de espectrometria de massas e finalmente avaliados quanto a sua efetividade *in vitro* e *in vivo*.

De acordo com esta invenção, os peptídeos cíclicos descritos também são eficazes quanto à sua capacidade de inibir o evento de
25 fosforilação por CKII, apesar das diferenças nas seqüências de aminoácidos de cada um. Este aspecto indica que a interação dos peptídeos com o sítio de fosforilação por CKII baseia-se essencialmente na estrutura dos mesmos e não na seqüência como tal. Nesta invenção, demonstra-se adicionalmente que os peptídeos descritos em forma linear apresentam menor efetividade quanto a

sua capacidade de inibição do sítio de fosforilação por CKII. Esta verificação enfatiza a importância da estrutura na capacidade de ligação dos peptídeos com referido domínio e sugere adicionalmente a efetividade de outros peptídeos e moléculas miméticas com capacidade de ligação com o sítio de fosforilação por CKII.

Com o objetivo de obter a ação intracelular sobre os substratos endógenos de CKII, os peptídeos descritos nesta invenção podem ser conjugados quimicamente ou fundidos geneticamente com os conhecidos na arte como "peptídeos de penetração intracelular", pertencentes a proteínas como Tat 1 do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (Schwarze SR, Dowdy SF, 2000, Trends Pharmacol 21:45-48), o fator transcricional codificado pelo gene da Antennapedia de Drosophila (Derossi D, *et al*, 1996, J. Biol Chem 271:18188-18193), o VP22 do Vírus Herpes Simples (Lindgreen M, *et al*. (2000) Cell-penetrating peptides. Trends Pharmacol Sci 21:99-103), penetratin e o Transportan (Gariépy J, Kawamura K, 2001, Trends Biotech 19:21-28) entre outros. Para a prova do conceito *in vivo* nesta invenção, os peptídeos cíclicos de interesse foram sintetizados de maneira fusionada com o peptídeo de penetração intracelular correspondente ao Tat1 do VIH (GRKKRRQRRRPPQC) e com uma sinal de localização nuclear correspondente ao antígeno T grande do SV40 (KKKRKVE).

Os resultados mostrados na presente invenção indicam claramente que os peptídeos cíclicos produzem citotoxicidade de uma maneira dependente da dose em células de carcinoma cérvico-uterino transformadas por HPV-16 (CaSki) o que sugere um emprego como ferramenta terapêutica no tratamento de tumores de origem histológica semelhante, bem como de estágios pré-malignos como a neoplasia intraepitelial cervical. Da mesma forma, os dados experimentais *in vivo* demonstraram uma efetividade maior dos peptídeos em forma cíclica relativamente a sua contraparte em forma linear, o que corrobora a

importância da estrutura no efeitos dos mesmos.

Os peptídeos cíclicos descritos nesta invenção também são efetivos em células HeLa que contêm o HPV-18, bem como em células H-82 que provêm de um câncer do pulmão de células pequenas que não contêm HPV. Estas verificações correlacionam-se com os resultados obtidos *in vitro* nesta invenção que indicam que os peptídeos bloqueiam o sítio de fosforilação por CKII não apenas na E7 do HPV-16 mas também em outras proteínas que contenham referidos sítios. O fato de que os peptídeos descritos são efetivos em células tumorais que não contêm HPV constitui um argumento para seu uso possível em outros tumores de origem epitelial.

Outros resultados na presente invenção indicam que o tratamento das células CaSki com os peptídeos cíclicos descritos, incrementa a sensibilidade de referidas células ao efeito citostático do IFN alfa. Considerando que existem evidências prévias de que o sítio de fosforilação de E7 do HPV-16 é necessário para o bloqueio da cascata de sinalização do IFN que esta oncoproteína exerce (Perea SE, López-Ocejo O, García Milián R, Banks L, Araña MJ, 1996, Eur. Cytokine Net 7:503), os peptídeos descritos na presente invenção podem ser úteis para sobrepassar o fenômeno de resistência ao IFN que comumente se observa na infecção por HPV.

O objeto desta invenção pode ser extensivo também ao DNA que codifica para cada peptídeo aqui descrito. Este DNA poderia ser introduzido em um vetor de expressão em células de mamíferos e posteriormente transfectado em células transformadas por HPV-16 e outros tipos. O vetor que contém o oligonucleotídeo que codifica para cada peptídeo da presente invenção também pode ser usado como alternativa na terapia gênica do câncer associado com o HPV.

Em princípio, os peptídeos descritos podem ser utilizados em combinação com outros agentes nas doenças associadas com o HPV assim como com vacinas terapêuticas baseadas em resposta celular contra o HPV.

Vantagens da invenção:

1. Proporciona fármacos com amplo espectro de aplicação que não apenas são úteis em doenças associadas com o HPV, mas também podem ser aplicados em tumores sólidos em que existe grande atividade endógena de CKII.

2. O fato de que a região de 28-38 é conservada nos HPVs, proporciona a este fármaco a possibilidade de seu emprego em todas as doenças associadas com diferentes tipos de HPV.

3. Os peptídeos, como moléculas terapêuticas, apresentam baixa antigenicidade quando são administrados a humanos.

4. É um fármaco de fácil obtenção e baixo custo de produção.

Breve Descrição das Figuras:

Figura 1: Efeito dos peptídeos sobre a fosforilação por CKII

Figura 2: Efeito dos peptídeos sobre a fosforilação da E7 do

HPV

Figura 3 A: Efeito dos peptídeos sobre a proliferação de células CaSki

Figura 3 B: Efeito dos peptídeos sobre a proliferação de células HeLa

Figura 4: Efeito dos peptídeos sobre a proliferação de células tumorais de pulmão

Figura 5: Efeito dos peptídeos na resposta a IFN de células transformadas por 5 HPV-16 (CaSki)

Figura 6: Efeito antitumoral do peptídeo inibidor da fosforilação por CKII em modelos de tumores humanos implantados em camundongos atímicos

EXEMPLOS

Exemplo 1: Efeito dos peptídeos descritos sobre o sítio de fosforilação por CKII.

Este ensaio consiste de uma reação de fosforilação *in vitro* em que se usou como substrato a seqüência RRREEETEEE que representa o domínio consenso otimizado para a fosforilação por CKII. A mistura de reação é realizada em 50 µl de tamponador Tris:HCL 25 mM pH 7,5, 1 µCi de ³²P- γATP, 100 µM de ATP, 2 mg/ml do peptídeo de substrato, 0,2 M de NaCl, 10 mM de MgCl e 1 unidade da enzima CKII (Promega). A reação é incubada a 37°C durante 10 minutos. Em seguida aplica-se 5 µl da reação em papel de filtro Whatmann PE-81 e realiza-se quatro lavagens com 10 mM de H₃PO₄. Finalmente lê-se a radioatividade associada com o papel de filtro e a quantidade de cpm por amostra reflete diretamente a atividade enzimática de CKII. Paralelamente inclui-se como controle no ensaio a heparina, que é um inibidor específico de referida enzima. Os resultados deste exemplo representados na Figura 1, demonstraram que os peptídeos em sua forma cíclica inibem a fosforilação por CKII em um 80 %. A variante dos peptídeos em sua forma linear também inibiram a fosforilação da região de 28-38 da E7 por CKII embora em menor grau, se comparado com a variante cíclica. Estas evidências indicam que os peptídeos descritos nesta invenção são efetivos na inibição do sítio de fosforilação por CKII e que a estrutura é essencial para sua interação com a seqüência-alvo.

Exemplo 2: Efeito dos peptídeos descritos sobre a fosforilação de E7 (HPV-16) por CKII.

Este ensaio consiste de uma reação de fosforilação *in vitro* em que se usou como substrato a oncoproteína E7 do HPV-16 expressa em *E. coli* como proteína de fusão com Glutathione S-Transferase (GST). Antes da reação enzimática, a E7-GST foi purificada por cromatografia de afinidade usando Glutathione-Sefarose (Pharmacia). A mistura de reação é realizada em 50 µl de tamponador Tris:HCl 25 mM pH 7,5, 1 µCi de ³²P-γATP, 100 µM de ATP, 40 µl da resina que contém E7-GST, 0,2 M de NaCl, 10 mM de MgCl e 1 unidade da enzima CKII (Promega). A reação é incubada a 37°C durante 40

minutos. Em seguida realiza-se três lavagens da resina com 0,5 ml do tamponador de reação e finalmente o nível de fosforilação da E7-GST é analisado numa eletroforese PAGE a 10 %. A visualização da proteína fosforilada foi realizada mediante a revelação de placas de raios X previamente expostas no gel seco. A quantificação da fosforilação de E7 foi realizada por meio de análise de densitometria das respectivas placas. Os resultados observados na Figura 2 indicam que os peptídeos descritos nesta invenção também são efetivos na inibição do sítio de fosforilação da CKII na E7 do HPV-16.

10 Exemplo 3: Efeito do peptídeo da presente invenção sobre o crescimento de células transformadas pelo HPV-16 (células CaSki) e pelo HPV-18 (células Hela).

Para este ensaio as células CaSki foram semeadas em placas de 96 poços (Costar) a uma densidade de 2×10^4 células/ml em meio Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado com Soro Fetal Bovino (Gibco).
15 Ao final de 24 horas, os peptídeos foram adicionados no meio de cultivo numa faixa de dosagem compreendida entre 15 μ M e 500 μ M. A incubação foi realizada durante um período de 96 horas na presença de CO_2 a 5 % e ao final da mesma adicionou-se 20 μ l de uma solução de MTS a 1,90 mg/ml. As
20 placas foram mantidas durante mais 1 hora nas mesmas condições de incubação e finalmente realizou-se a leitura de absorbância a 490 nm. Os resultados são mostrados como percentual de crescimento dos controles sem peptídeo. Para este ensaio, cada peptídeo descrito, tanto em sua forma linear como cíclica, foi sintetizado fundido quimicamente ao peptídeo de penetração
25 intracelular correspondente ao Tat1 do VIH que demonstrou sua capacidade de transporte até o núcleo e o citoplasma (Schwarze SR, Dowdy SF, 2000, Trends Pharmacol 21:45-48). Os resultados obtidos neste ensaio demonstraram que os peptídeos descritos nesta invenção são capazes de produzir um efeito dependente da dose sobre a proliferação tanto das células

CaSki (HPV-16) (Figura 3 A) como das células HeLa (HPV-18) (Figura 3B). Este exemplo demonstra que os peptídeos descritos nesta invenção são efetivos não apenas o HPV-16 mas também para o HPV-18.

Exemplo 4: Efeito dos peptídeos sobre o crescimento de células tumorais não associadas com o HPV.

Para este ensaio as células H-82 (carcinoma de células pequenas do pulmón) foram semeadas em placas de 96 poços (Costar) a uma densidade de 2×10^4 células/ml em meio Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado com Soro Fetal Bovino (Gibco). Ao cabo de 24 horas, cada peptídeo foi adicionado ao meio de cultivo numa faixa de dosagem entre 15 μ M e 500 μ M. A incubação foi realizada durante 96 horas na presença de CO₂ a 5 % e ao final da mesma adicionou-se 20 μ l de uma solução de MTS a 1,90 mg/ml. As placas foram mantidas durante mais 1 hora nas mesmas condições de incubação e finalmente realizou-se a leitura da absorbância a 490 nm. Os resultados são mostrados como percentual de crescimento dos controles sem peptídeo. Para este ensaio empregou-se os peptídeos da presente invenção em sua forma cíclica fundidos ao peptídeo de penetração intracelular correspondente ao Tat1 do VIH referido antes. Os resultados obtidos neste ensaio demonstram que os peptídeos desta invenção produzem um efeito dependente da dose sobre a proliferação das células H-82. Na Figura 4 demonstra-se que os peptídeos descritos nesta invenção são efetivos não só para células transformadas mas também para células tumorais de outras localizações e tipos histológicos como as do carcinoma do pulmão de células pequenas.

Exemplo 5: Efeito dos peptídeos sobre a resposta do HPV-16 a IFN em células CaSki.

Para este ensaio as células CaSki foram semeadas em placas de 96 poços (Costar) a uma densidade de 2×10^4 células/ml em meio Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado com Soro Fetal Bovino (Gibco).

Ao final de 24 horas, cada peptídeo foi adicionado ao meio de cultivo a uma concentração de 120 μ M. Ao final de 24 horas adicionou-se o IFN alfa numa faixa de dosagem entre 1000 e 31,5 U/ml. A incubação foi realizada durante 96 horas na presença de CO₂ a 5 % e ao término da mesma adicionou-se 20 μ l de uma solução de MTS a 1,90 mg/ml. As placas foram mantidas durante mais 1 hora nas mesmas condições de incubação e finalmente realizou-se a leitura da absorbância a 490 nm. Os resultados são mostrados como percentual de crescimento do controle. Para este ensaio empregou-se os peptídeos da presente invenção em sua forma cíclica fundidos ao peptídeo de penetração intracelular correspondente ao Tat1 do VIH referido previamente. Os resultados observados na Figura 5 demonstraram que a incubação prévia das células CaSki com os peptídeos da presente invenção são capazes de sensibilizar as mesmas ao efeito antiproliferativo do IFN alfa o que sugere a utilidade destes no tratamento de pacientes infectados com HPV que mostram resistência ao tratamento com referida citocina.

Exemplo 6: Efeito antitumoral do peptídeo inibidor da fosforilação por CKII em modelos de tumores humanos implantados em camundongos atímicos.

Nestes ensaios utilizou-se camundongos BalbC de sexo feminino e entre 6 e 8 semanas de nascidos. Para a implantação do tumor neste modelo, utilizou-se as células H-125 procedentes de um carcinoma do pulmão de células não pequenas que foram ressuspensas em solução salina (PBS) a uma concentração de 1.000.000 células por mililitro. A suspensão celular foi inoculada por via subcutânea na cavidade abdominal. A administração do peptídeo (seq. 1 na lista) foi realizada paralelamente à das células e, depois, foi continuada em dias alternados até completar um mês de tratamento. Nestes ensaios avaliou-se doses compreendidas numa faixa entre 1 e 10 mg de peptídeo por kg de peso. Os parâmetros avaliados para medir o efeito antitumoral do peptídeo de interesse foram a massa tumoral e a sobrevida dos animais. Como se pode observar na figura 6, as três doses de

peptídeo empregadas foram efetivas no que se refere à capacidade de inibir a progressão do tumor. Estes resultados evidenciam a eficácia antitumoral do peptídeo inibidor da fosforilação por CKII em um modelo de tumores humanos implantados em animais experimentais.

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeos com capacidade de ligação com o sítio de fosforilação por Caseína Quinase II (CKII), caracterizados pelo fato de que apresentam as sequências:

- (a) CSVRQGPVQKC (SEQ ID NO. 1)
- (b) CSSCQNSPALC (SEQ ID NO. 2)
- (c) CQIPQRTATRC (SEQ ID NO. 3)
- (d) CAKQRTDPGYC (SEQ ID NO. 4)
- (e) CWMSPRHLGTC (SEQ ID NO. 5)
- (f) CRNCTVIQFSC (SEQ ID NO. 6)
- (g) CHYIAGTVQGC (SEQ ID NO. 7)
- (h) CPLVSLRDHSC (SEQ ID NO. 8)
- (i) CKQSYLHLLC (SEQ ID NO. 9)
- (j) CFQPLTPLCRC (SEQ ID NO. 10)
- (k) CQSYHELLLQC (SEQ ID NO. 11).

2. Peptídeos de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo fato de que apresentam, de preferência, uma estrutura cíclica.

3. Peptídeos de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizados pelo fato de que fazem parte de um peptídeo de fusão com o peptídeo Tat-1, que apresenta a sequência GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO. 12).

4. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais dos peptídeos das reivindicações de 1 a 3, e também um veículo apropriado.

5. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente uma citocina.

6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a referida citocina é um interferon.

.

FIGURA 1

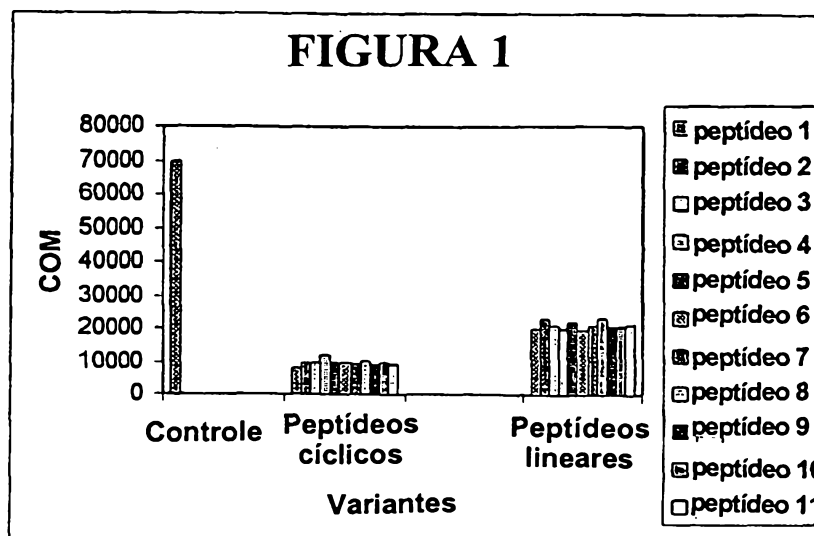


FIGURA 2

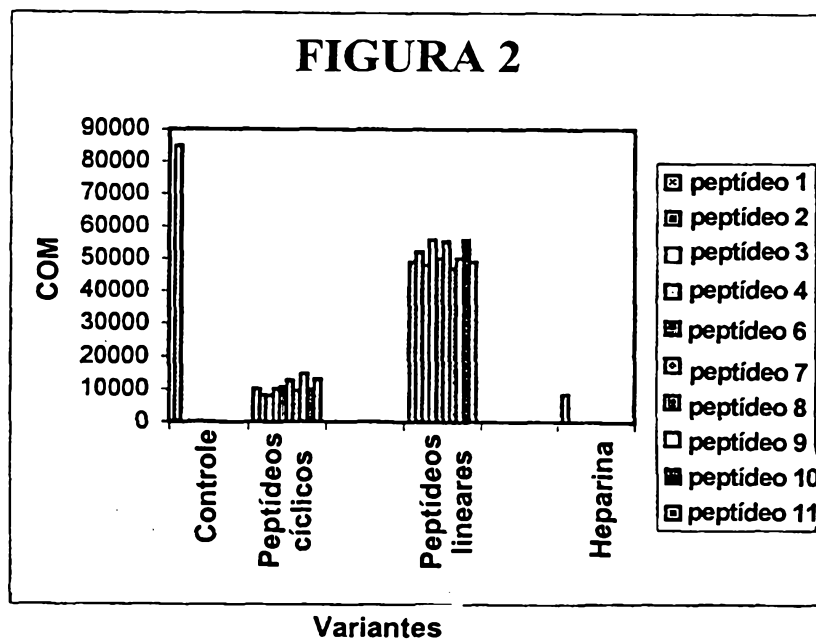


FIGURA 3A

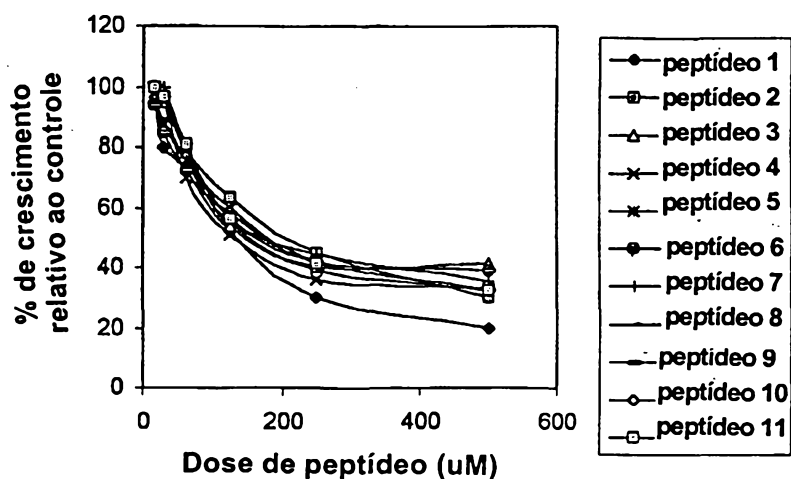
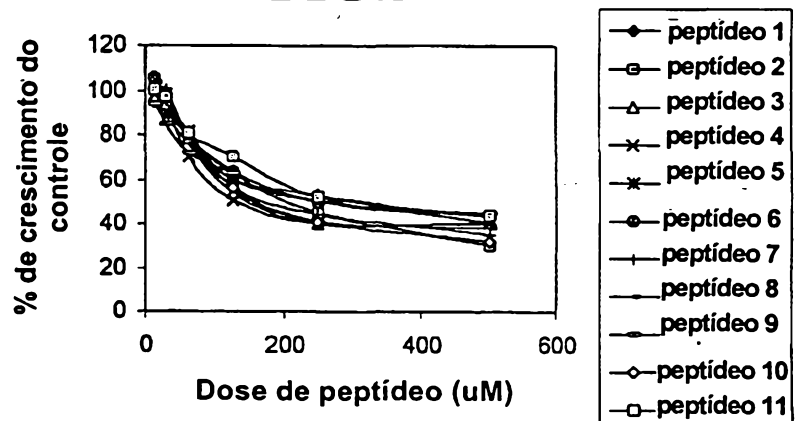


FIG.3B



[illegible]

FIGURA 5

Gráfico de linhas mostrando o percento de crescimento do controle (Y-axis, 0 a 120) versus a Dose de IFN (U/ml) (X-axis, 0 a 1500). O gráfico ilustra o efeito de diferentes combinações de IFN e peptídeos no crescimento celular.

Legenda:

- IFN
- IFN + pept.1
- IFN + pept.2
- IFN + pept.3
- IFN + pept.4
- IFN + pept.5
- IFN + pept.6
- IFN + pept.7
- IFN + pept.8
- IFN + pept.9
- IFN + pept.10
- IFN + pept.11

Observações: A combinação IFN + pept.5 apresenta o maior crescimento em todas as doses testadas. As combinações IFN + pept.10 e IFN + pept.11 apresentam o menor crescimento em todas as doses testadas.

