

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 838**

51 Int. Cl.:

**C07K 4/12** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/03** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2012 PCT/FR2012/052641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 12795560 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2780356**

54 Título: **Péptidos inhibidores de la interacción entre ASF1 y las histonas, y sus usos**

30 Prioridad:

**18.11.2011 FR 1160536**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.10.2017**

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET  
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (50.0%)  
Bâtiment le Ponant D, 25 rue Leblanc  
75015 Paris, FR y  
UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**OCHSENBEIN, FRANÇOISE;  
GUEROIS, RAPHAËL;  
GAUBERT, ALBANE y  
COURBEYRETTE, RÉGIS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 639 838 T3

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

Péptidos inhibidores de la interacción entre ASF1 y las histonas, y sus usos

La presente invención se refiere a una nueva clase de moléculas que presentan un interés terapéutico, en particular en el campo de la oncología.

- 5 Para proteger su genoma, las células han desarrollado diversas estrategias. Por un lado, el ADN está protegido de las agresiones oxidantes a través de una estructura proteica compacta, denominada cromatina. Por otro lado, existe una maquinaria de reparación y señalización que se hace cargo del daño del ADN para restaurar un genoma intacto. La chaperona de histonas Asf1 (factor anti-silenciador 1, del inglés, "Anti-Silencing Factor 1") se sitúa en la encrucijada de la reparación de ADN y las maquinarias moleculares que garantizan el mantenimiento de la cromatina.
- 10 Asf1 participa en el depósito de las histonas H3/H4 sobre el ADN, después de numerosos procesos celulares. La delección de Asf1 en diferentes especies (levadura, ser humano, pollo, *Drosophila*) ralentiza la proliferación, sensibiliza las células frente a agentes genotóxicos utilizados en la quimioterapia convencional e impide el establecimiento de marcas epigenéticas particulares, revelando de este modo el papel crucial de Asf1 en el ensamblaje de la cromatina, las respuestas celulares frente al daño del ADN y el mantenimiento de la información epigenética.
- 15 Estudios muy recientes han mostrado que en las células humanas, la inhibición de Asf1 con ARNsi causa el bloqueo en fase S de las células. Por otra parte, la sobreexpresión de la isoforma Asf1b en las células malignas, constituye un marcador particularmente eficaz para predecir la gravedad del cáncer de mama (Corpet et al., 2011, *EMBO J.* 30(3): 480-93). Este último trabajo pone en evidencia, por primera vez, la implicación de la chaperona de histonas Asf1 en el desarrollo de cánceres.
- 20 El análisis estructural y funcional de la chaperona de histonas Asf1 ha permitido mostrar que se requiere una interacción entre Asf1 y las histonas para el conjunto de sus funciones (Monsoon, et al., 2005, *PNAS USA*, 2005, 102(17): 5975-5980; Agez et al., 2007, *Structure*, 2007, 15(2): 191-199, y Galvani et al., 2008, *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(11): 3672-3685).
- La interacción entre Asf1 y las histonas constituye por lo tanto un objetivo interesante para el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos. Las moléculas capaces de inhibir esta interacción tendrán potencialmente unas propiedades anticancerígenas, no solo por la alteración de la proliferación, sino también de la información epigenética y la sensibilización de las células frente a agentes anticancerígenos convencionales.
- La inhibición de Asf1 por el método de ARNsi es eficaz en células en cultivo, pero en la actualidad quedan algunas dificultades para ponerla en práctica como medicamento *in vivo*.
- 30 Los inventores proporcionan con la presente invención una estrategia alternativa basada en un enfoque peptídico. Una estrategia clásica para diseñar péptidos inhibidores de la interacción de dos proteínas, en particular en un complejo, consiste en el desarrollo de un péptido que interacciona con uno de los ligandos del complejo.
- Los inventores en la presente invención han elegido dirigir múltiples ligandos que interaccionan con Asf1, en particular, tanto la histona H3 como la histona H4. Por lo tanto, en la presente invención, los inventores proporcionan péptidos inhibidores de la formación del complejo entre Asf1 y las histonas H3-H4.
- 35 Una ventaja de la presente invención viene del hecho de que la diana no se corresponde con una enzima o un receptor, como es el caso más frecuente, sino con una interacción proteína-proteína. De hecho, se trata de inhibir una interacción transitoria y lábil entre la chaperona de ensamblaje, Asf1, y una subunidad del complejo de destino, el nucleosoma. Por lo tanto, un péptido que actúa sobre una interacción transitoria será más eficaz que cuando el péptido debe inhibir un complejo final estable. Esta estrategia peptídica presenta además la ventaja de una alta especificidad, evitando de este modo los efectos secundarios. Además, el complejo diana, que es vital, todavía se puede formar espontáneamente en ausencia de la proteína chaperona. Por lo tanto se puede modular la cantidad de complejo formado y de ese modo la magnitud de la acción de las moléculas.
- 40 La presente invención se refiere por tanto a una molécula peptídica capaz de inhibir la formación del complejo entre Asf1 y las histonas H3-H4, que comprende o consiste en los elementos E1-B-E2 (dispuestos en la dirección desde el extremo N-terminal hacia C-terminal). En donde E1 y E2 se corresponden respectivamente con el péptido que se dirige a la región de unión de la histona H3 y la de la histona H4, y B designa el bucle peptídico que une estos dos elementos. Los elementos E1-B-E2 son tal como se definen a continuación:

a) E1 es un péptido de fórmula (I)

50  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-K-X_6-X_7-X_8-L-X_9-X_{10}-R-I-X_{11}$  (I)

en donde

a1) o bien (SEQ ID No 1)

$X_1$  y  $X_2$  están ausentes;

$X_3$  es I, R o L, preferiblemente I o L;

$X_4$  es T o M, preferiblemente T;

$X_5$  es P;

5  $X_6$  es E o D, preferiblemente D;

$X_7$  se selecciona entre el grupo que consiste en R, A, I y E, preferiblemente R, A y E;

$X_8$  se selecciona entre el grupo que consiste en R, Q y E;

$X_9$  es R o A;

$X_{10}$  es R; y

10  $X_{11}$  es R o E;

a2) o (SEQ ID No 2)

$X_1$ ,  $X_7$  y  $X_9$  son A;

$X_2$  es S;

$X_3$  es T;

15  $X_4$ ,  $X_5$  y  $X_8$  son E o R;

$X_6$  es W;

$X_{10}$  es R; y

$X_{11}$  es R o A;

b) B es un péptido de fórmula (II)

20  $G-X_{12}-G-X_{13}-X_{14}$  (II) (SEQ ID No 3)

en donde

$X_{12}$  es A o P;

$X_{13}$  está ausente o se selecciona entre los aminoácidos G, A y S;

$X_{14}$  está ausente o es S;

25 y

c) E2 es un péptido de fórmula (III)

$X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-G-X_{19}-X_{20}$  (III) (SEQ ID No 4)

en donde

$X_{15}$  es R, V o A;

30  $X_{16}$  es T o V;

$X_{17}$  es L;

$X_{18}$  es Y, N o D;

$X_{19}$  es F o M; y

$X_{20}$  se selecciona entre el grupo que consiste en G, Q y N.

35 Más particularmente, la molécula peptídica también puede comprender los elementos E1-B-E2, en la que o bien

$X_1$  y  $X_2$  están ausentes;

X<sub>3</sub> es I, R o L, preferiblemente I o L;

X<sub>4</sub> es T o M, preferiblemente T;

X<sub>5</sub> es P;

X<sub>6</sub> es E o D, preferiblemente D;

5 X<sub>7</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en R, A, I y E, preferiblemente R, A y E;

X<sub>8</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en R, Q y E;

X<sub>9</sub> es R o A;

X<sub>10</sub> es R; y

X<sub>11</sub> es R o E;

10 o

X<sub>1</sub>, X<sub>7</sub> y X<sub>9</sub> son A;

X<sub>2</sub> es S;

X<sub>3</sub> es T;

X<sub>4</sub> es E o R;

15 X<sub>6</sub> es W;

X<sub>8</sub> es E; y

X<sub>5</sub>, X<sub>10</sub> y X<sub>11</sub> son R;

y

X<sub>12</sub> es A o P;

20 X<sub>13</sub> está ausente o se selecciona entre los aminoácidos G, A y S;

X<sub>14</sub> está ausente o es S;

X<sub>15</sub> es R o V;

X<sub>16</sub> es T o V;

X<sub>17</sub> es L;

25 X<sub>18</sub> es Y, N o D;

X<sub>19</sub> es F o M, incluso más preferiblemente es F; y

X<sub>20</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en G, Q y N.

30 En una realización más particularmente preferida, la presente invención se refiere a una molécula peptídica capaz de inhibir la formación del complejo entre Asf1 y las histonas H3-H4, que comprende o que consiste en los elementos E1-B-E2 tal como se han definido anteriormente, en la que los elementos E1-B-E2 presentan una de las siguientes fórmulas

X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-P-K-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-L-X<sub>9</sub>-R-R-I-X<sub>11</sub>-G-X<sub>12</sub>-G-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-L-X<sub>18</sub>-G-X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub> (VIII) (SEQ ID No 11)

en la que

X<sub>3</sub> es I, R o L, preferiblemente I o L;

35 X<sub>4</sub> es T o M, preferiblemente T;

X<sub>6</sub> es E o D, preferiblemente D;

X<sub>7</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en R, A, I y E, preferiblemente entre R, A y E;

X<sub>8</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en R, Q y E;

- X<sub>9</sub> es R o A;  
X<sub>11</sub> es R o E;  
X<sub>12</sub> es A o P;  
X<sub>13</sub> está ausente o se selecciona entre los aminoácidos G, A y S;
- 5 X<sub>14</sub> está ausente o es S;  
X<sub>15</sub> es R o V;  
X<sub>16</sub> es T o V;  
X<sub>18</sub> es Y, N o D;
- 10 X<sub>19</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en F, M, A y Q, preferiblemente F o M, incluso más preferiblemente F; y  
X<sub>20</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en G, Q y N;  
o  
A-S-T-X<sub>4</sub>-R-K-W-A-E-L-A-R-R-I-R-G-X<sub>12</sub>-G-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-L-X<sub>18</sub>-G-X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub> (IX) (SEQ ID No 12)  
en donde
- 15 X<sub>4</sub> es E o R;  
X<sub>12</sub> es A o P;  
X<sub>13</sub> está ausente o se selecciona entre los aminoácidos G, A y S;  
X<sub>14</sub> está ausente o es S;  
X<sub>15</sub> es R o V;
- 20 X<sub>16</sub> es T o V;  
X<sub>18</sub> es Y, N o D;  
X<sub>19</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en F, M, A y Q, preferiblemente F o M, incluso más preferiblemente F; y  
X<sub>20</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en G, Q y N,
- 25 o  
A-S-T-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-K-W-A-E-L-A-X<sub>8</sub>-R-I-X<sub>11</sub>-G-X<sub>12</sub>-G-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-L-X<sub>18</sub>-G-X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub> (XI) (SEQ ID No 82)  
en donde  
X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>8</sub> son E o R;  
X<sub>11</sub> es R o A;
- 30 X<sub>12</sub> es A o P;  
X<sub>13</sub> está ausente o se selecciona entre los aminoácidos G, A y S;  
X<sub>14</sub> está ausente o es S;  
X<sub>15</sub> es R, V o A;  
X<sub>16</sub> es T o V;
- 35 X<sub>18</sub> es Y, N o D;  
X<sub>19</sub> es F o M, preferiblemente F; y  
X<sub>20</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en G, Q y N.

En una realización particular, la presente invención se refiere a una molécula peptídica que comprende o consiste en los elementos E1-B-E2 tal como se han definido anteriormente, en la que los elementos E1-B-E2 presentan una de las secuencias siguientes

- IMPKDIQLARRIRGAGGRTLYGFG (SEQ ID No 13)
- 5 IMPKDIQLARRIRGAGASRTLYGFG (SEQ ID No 14)
- ITPKEAQLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 15)
- ITPKEAQLARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 16)
- LTPKEAELARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 17)
- LTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 18)
- 10 ITPKEAQLARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 19)
- LTPKEAELARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 20)
- ITPKEEQLRRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 21)
- ITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 22)
- LTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 23)
- 15 LTPKEAELARRIRGAGRTLNGFG (SEQ ID No 24)
- LTPKEAELARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 25)
- LTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 26)
- RTPKERRLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 27)
- RTPKEARLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 28)
- 20 LTPKEAELARRIRGAGGVTYDGFG (SEQ ID No 29)
- LTPKEAELARRIRGAGGVTLNGAN (SEQ ID No 30)
- STERKWA ELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 31)
- ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 32)
- ASTRRKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 33)
- 25 ASTEEKWARLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 75)
- ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNLDGFG (SEQ ID No 76)
- ASTERKWAELARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 77)
- ASTERKWAELARRIRGAGGATLNGFG (SEQ ID No 78)
- ASTERKWAELARRIAGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 79)
- 30 ASTEEKWARLARRIAGAGGVTLNLDGFG (SEQ ID No 80)

así como una secuencia que presenta 90 o 95% de identidad con las mismas.

- Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos se entiende, en el contexto de la presente invención, un porcentaje de residuos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias comparadas, obteniéndose este porcentaje después de llevar a cabo la mejor alineación (alineación óptima) entre las dos secuencias. El experto conoce diversas técnicas que permiten la obtención de un porcentaje de identidad de este tipo e implican algoritmos de homología o programas de ordenador tales como el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch que tiene en cuenta los posibles "huecos", el programa BLAST del NCBI o la herramienta de alineación "EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms" disponible generalmente en el sitio de internet de EMBL-EBI. En particular, el porcentaje de identidad en relación con la secuencia de referencia, se calculará dividiendo (i) el número total de residuos idénticos alineados entre las dos secuencias por (ii) el número total de residuos contenidos en la secuencia de referencia, y después multiplicando por 100 el cociente obtenido.
- 35
- 40

- Preferiblemente, la molécula peptídica de acuerdo con la presente invención comprende además un elemento que facilita la penetración celular de la molécula. En particular, este elemento es un péptido que facilita la penetración celular de la molécula (elemento CPP). Estos péptidos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Vivès et al., Biochimic et Biophysica Acta, 2008, 1786, 126-138). Por ejemplo y a título no limitativo, el péptido que facilita la penetración celular se puede seleccionar entre el grupo constituido por un péptido de Tat, en particular RKKRRQRRR (SEQ ID No 34), un péptido de antennapedia o penetratina, en particular RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID No 35) y un péptido rico en arginina y lisina, preferiblemente rico en arginina, en particular un péptido que comprende al menos 9 residuos de arginina, tales como una poli-arginina RRRRRRRRR (SEQ ID No 36) o RRRRR-RRRRRRRRP (SEQ ID No 37).
- Este péptido que facilita la penetración celular de la molécula puede estar presente en el lado N-terminal o C-terminal de los elementos E1-B-E2, preferiblemente en el lado N-terminal de estos elementos. O bien puede estar unido directamente a los elementos E1-B-E2, o estar unido a través de un péptido.
- Opcionalmente, la molécula peptídica puede comprender además otras secuencias peptídicas, en el lado N-terminal o C-terminal de los elementos E1-B-E2 y/o entre estos elementos y el péptido que facilita la penetración celular y/o en el extremo del péptido que facilita la penetración celular.
- En una realización muy particular, la molécula peptídica comprende o consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en
- GAMGTIMPKDIQLARRIRGAGGRTLYGFG (SEQ ID No 38)
- GAMGTIMPKDIQLARRIRGAGASRTLYGFG (SEQ ID No 39)
- 20 GAMGTITPKEAQLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 40)
- GAMGTITPKEAQLARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 41)
- GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 42)
- GAMGTLTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 43)
- GAMGTITPKEAQLARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 44)
- 25 GAMGTLTPKEAELARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 45)
- GAMGTITPKEEQLRRRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 46)
- GAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 47)
- GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 48)
- GAMGTLTPKEAELARRIRGAGRTLNGFG (SEQ ID No 49)
- 30 GAMGTLTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 51)
- GAMGLTAAEHAKRSTLTPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 52)
- LTAAEHAKRSTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 53)
- LTAAEHAKRSTLTPKEAQLARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 54)
- LTAAEHAKRSTLTPKEAELARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 55)
- 35 GAMGTRTPKERRLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 56)
- GAMGTRTPKEARLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 57)
- GRKKRRQRRRGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 58)
- RRRRRRRRRRRRPGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 59)
- GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTYDGFG (SEQ ID No 61)
- 40 GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFGASTG (SEQ ID No 62)
- GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGANFVSTG (SEQ ID No 63)
- GAMGRVPPAVRKLGNSTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 64)

GAMGRVPPAVRKLGNASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 65)

ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 32)

ASTRRKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 33)

ASTEELWARLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 75)

5 ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 76)

ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 77)

ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 78)

ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 79)

ASTEELWARLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 80)

10 RRPRRRRRRRRRRRPASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFGGCA (SEQ ID No 66)

RRPRRRRRRRRRRRPASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 67)

RRPRRRRRRRRRRRPGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFGCA (SEQ ID No 50)

RRPRRRRRRRRRRRPASTEELWARLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 81)

así como una secuencia que presenta 90 o 95% de identidad con las mismas.

15 En una realización muy particularmente preferida, la molécula peptídica comprende o consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en

RRPRRRRRRRRRRRPGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFGCA (SEQ ID No 50)

RRPRRRRRRRRRRRPGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 59)

RRPRRRRRRRRRRRPASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFGGCA (SEQ ID No 66)

20 RRPRRRRRRRRRRRPASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 67) y

RRPRRRRRRRRRRRPASTEELWARLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 81).

La molécula peptídica de acuerdo con la presente invención puede comprender aminoácidos no naturales. Por "aminoácido no natural" se entiende un análogo o un derivado de un aminoácido natural. Por ejemplo, un aminoácido no natural puede tener una cadena lateral alargada, más corta, o una variante que tiene grupos funcionales apropiados.

25 Por supuesto, se contemplan los isómeros L y D de los aminoácidos. De hecho, los isómeros D no son sensibles a las proteasas y la presente invención también comprende moléculas que comprenden solo o esencialmente aminoácidos D. En una realización particular, se prefieren los aminoácidos L.

Las secuencias peptídicas definidas en el presente documento están representadas con el símbolo de una letra, tal como se muestra a continuación:

A	Ala	(alanina)
R	Arg	(arginina)
N	Asn	(asparagina)
D	Asp	(ácido aspártico)
C	Cys	(cisteína)
Q	Gln	(glutamina)
E	Glu	(ácido glutámico)
G	Gly	(glicina)



H	His	(histidina)
I	Ile	(isoleucina)
L	Leu	(leucina)
K	Lys	(lisina)
M	Met	(metionina)
F	Phe	(fenilalanina)
P	Pro	(prolina)
S	Ser	(serina)
T	Thr	(treonina)
W	Trp	(triptófano)
Y	Tyr	(tirosina)
V	Val	(valina)

Además, los o unos enlaces peptídicos de la molécula peptídica de acuerdo con la presente invención se pueden modificar para hacerlos resistentes a la proteólisis. Por ejemplo, al menos un enlace peptídico (-CO-NH-) se puede reemplazar por un enlace divalente seleccionado entre (-CH<sub>2</sub>-NH-), (-NH-CO-), (-CH<sub>2</sub>-O-), (-CH<sub>2</sub>-S-), (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), (-CO-CH<sub>2</sub>-), (-CHOH-CH<sub>2</sub>-), (-N=N-) y (-CH=CH-). Opcionalmente, todos los enlaces peptídicos se pueden sustituir.

- 5 La molécula peptídica puede comprender o bien un extremo C-terminal carboxílico (-COO<sup>-</sup>) o amidado (-CONH<sub>2</sub>). El péptido también puede estar modificado opcionalmente en su extremo N-terminal, por ejemplo, con un radical aceto-

Además, la molécula peptídica de acuerdo con la presente invención se puede modificar para hacerla más estable, y particularmente más resistente a las proteasas. Por lo tanto, la molécula puede ser portadora de grupos PEG (poli-  
 10 etilenglicol). Los métodos de PEGilación son bien conocidos en la técnica (Olson et al., 2009, Integrative Biology, 1 (5-6): p. 382-393).

Por "aminoácido favorable a una estructura de hélice alfa" se entiende en particular un aminoácido que está adapta-  
 do o es ventajoso para adoptar una estructura secundaria de hélice alfa. En particular, esto excluye los aminoácidos  
 15 desfavorables para esta estructura secundaria como T, V, P e I. Por lo tanto, ese residuo se podrá seleccionar en la lista que consiste en A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W e Y, más preferiblemente entre A, R, D, N, C, Q, E, H, L, K, M, F, S y W, de manera aún más preferible, una combinación de aminoácidos se puede seleccionar con la ayuda de programas informáticos de predicción de la estabilidad de estructuras helicoidales, bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como AGADIR.

Preferiblemente, la molécula peptídica tiene un tamaño máximo de 200, 150 o 100 aminoácidos.

- 20 La presente descripción también describe un ácido nucleico que codifica la molécula peptídica de acuerdo con la invención, así como un casete de expresión o un vector de expresión que comprende este ácido nucleico y es capaz de expresar y producir dicha molécula en condiciones apropiadas. Por lo tanto, la molécula peptídica se puede producir mediante ingeniería genética. Alternativamente, la molécula también se puede producir por un método de síntesis péptica, bien conocido por los expertos en la técnica.

- 25 La presente invención se refiere además a una molécula peptídica de acuerdo con la presente invención como un medicamento. Preferiblemente, la presente invención se refiere a una molécula peptídica de acuerdo con la presente invención como un agente anticancerígeno o un agente que sensibiliza las células cancerosas frente a agentes anticancerígenos.

- 30 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula peptídica de acuerdo con la presente invención y un soporte farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición puede comprender además otro agente terapéutico, en particular un agente anticancerígeno. Preferiblemente, la composición está destinada al tratamiento del cáncer.

5 La presente invención se refiere a una molécula peptídica de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, opcionalmente en combinación con otro agente terapéutico, en particular un agente anticancerígeno, y/o con radioterapia. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un producto o kit que comprende una molécula peptídica de acuerdo con la presente invención y un agente anticancerígeno así como una preparación combinada destinada a un uso simultáneo, por separado o secuencial, especialmente para un uso en el tratamiento del cáncer.

Además, la presente invención se refiere al uso de una molécula peptídica de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o la prevención del cáncer, opcionalmente en combinación con otro agente terapéutico, en particular un agente anticancerígeno y/o radioterapia.

10 Por último, la presente descripción describe un método de tratamiento de un cáncer en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula peptídica de acuerdo con la presente invención. Opcionalmente, el método puede comprender además la administración de otro agente anticancerígeno y/o el tratamiento con radioterapia.

15 En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" o "tratar" incluye el tratamiento preventivo, curativo, paliativo, así como el cuidado de los pacientes (reducción del sufrimiento, mejora de la duración de la vida, ralentización de la progresión de la enfermedad, reducción del crecimiento tumoral, disminución del tamaño del tumor, prevención o disminución de las metástasis y las recaídas, etc.).

20 Los cánceres incluyen cánceres de tumores sólidos o cánceres hematopoyéticos. Los cánceres se pueden seleccionar, de manera no exhaustiva, entre los cánceres de mama, osteocarcinomas, cánceres de la piel, ovario, pulmón, útero, cuello uterino, vagina, próstata, testículo, tiroides, sistema linfático, sangre, hígado, páncreas, riñón, vejiga, cerebro o colon, cánceres gástricos.

La presente solicitud se refiere a la combinación de la molécula de acuerdo con la presente invención con otro agente anticancerígeno que se puede seleccionar entre quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia y terapia génica.

25 Los tratamientos y los medicamentos de la invención están destinados en particular a los seres humanos.

30 Las moléculas o composiciones de acuerdo con la invención se pueden administrar de diferentes maneras y en diferentes formas. Por lo tanto, se pueden administrar de manera sistémica, por vía oral, por inhalación o por inyección, tal como por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intraarterial, etc., prefiriéndose las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral y por inhalación. Para las inyecciones, las moléculas se envasan generalmente en forma de suspensiones líquidas que se pueden inyectar a través de jeringas o por infusión, por ejemplo. A este respecto, las moléculas se disuelven generalmente en soluciones salinas, fisiológicas, isotónicas, tamponadas, etc., compatibles con un uso farmacéutico y conocidas por la persona experta. Por lo tanto, las composiciones pueden contener uno o varios agentes, soportes o vehículos seleccionados entre dispersantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, etc. Los agentes o vehículos utilizables en las formulaciones líquidas y/o inyectables, son en particular metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, polisorbato 80, manitol, gela-  
35 tina, lactosa, aceites vegetales, goma arábica, etc.

40 Las moléculas también se pueden administrar en forma de geles, aceites, comprimidos, supositorios, polvos, grageas, cápsulas, aerosoles, etc., eventualmente por medio de formas farmacéuticas o dispositivos que aseguran una liberación prolongada y/o retardada. Para este tipo de formulación, se emplea ventajosamente un agente tal como la celulosa, carbonatos o almidones.

45 Por "cantidad eficaz" se entiende la cantidad que es necesaria para prevenir, eliminar o reducir los efectos deletéreos del cáncer. Se entiende que el caudal y/o la dosis inyectada pueden estar adaptados por el experto en la técnica, dependiendo del paciente, la patología en cuestión, el modo de administración, etc. Típicamente, las moléculas se administran en dosis que pueden variar entre 1 µg y 1000 mg/kg de peso corporal, más generalmente de 10 µg a 100 mg/kg, típicamente entre 1 mg y 20 mg/kg. Por otra parte, se pueden realizar inyecciones repetidas, en su caso. Por otro lado, para los tratamientos crónicos, pueden ser ventajosos los sistemas de retardo o prolongados.

Los ejemplos ilustran la presente invención y no están destinados a ser limitantes de la misma.

### Descripción de las figuras

50 Figura 1: Curvas ITC de interacción Asf1 1-156 (30 µM en A, 10 µM en B y C) con el péptido i1 (A), i4 (B) e i5 (C). La concentración de i1 utilizada para este experimento es de 0,5 mM y 0,16 mM para i4 e i5.

Figura 2: Estructura RMN (A) y cristalográfica (B y C) de Asf1 en interacción con el péptido i1 (A), i4 (B) e i5 (C).

Figura 3: Análisis por transferencia Western de la prueba de competencia en la columna GST de la interacción Asf1-H3-H4 por i5 (o i5mut), revelada por un anticuerpos anti-Asf1 (hAsf1a) y anti-histona H3.

Figura 4: Figura 4A: Visualización por microscopía de fluorescencia (arriba) y óptica (abajo) del péptido i5, i5mut y

las histonas H3 completas, marcadas con GFP (proteína fluorescente verde) en células humanas U2OS, Figura 4B: coimmunoprecipitación de Asf1 con la histona H3 completa, mutada (H3-R3A) y con el péptido i5 e i5mut, revelada por un anticuerpo anti-Asf1 (hAsf1a) y anti-GFP. El asterisco indica la presencia de productos de degradación (GFP sola).

5 Figura 5: Análisis de la penetración de los péptidos (que son portadores de FITC) en células U2OS por citometría de flujo.

Figura 6: Resultados de la toxicidad a 24 h en las células U2OS transducidas con diferentes péptidos sin péptido (T WT) sin péptido en presencia de butirato de pireno (T PyBu), en presencia de butirato de pireno y el péptido indicado a la concentración indicada.

10 Figura 7: Interrupción de la progresión del ciclo celular por la acción del péptido i5 o i5mut.

Figura 8: Análisis por transferencia Western de la prueba de competencia en columna GST de la interacción Asf1-H3-H4 por i5, i5mut, i6, revelada por un anticuerpo anti-GST (GST-Asf1a) y anti-histona H3. E0: sin péptido, E5: 5 µM, E10: 10 µM, E50: 50 µM, E100: 100 µM.

15 Figura 9: Medición de la toxicidad celular (prueba MTT) de los péptidos i5mut, i5 e i6, 48 h después de la transfección en células U2OS en forma de plásmido que codifica una proteína de fusión GFP-péptido.

Figura 10: Medición de la toxicidad celular (prueba MTT) de los péptidos i5mut, i5, i6, 48 h después de la transfección en células HeLa en forma de péptido fusionado con la secuencia (RRP)<sub>5</sub>.

## EJEMPLOS

Resultados

20 Estrategia de diseño

La estrategia que los inventores han adoptado consistía en imitar no solo un ligando, sino varios ligandos y optimizar con un enlace lo más rígido posible el acoplamiento de los epítomos de unión de cada uno de los ligandos, con el fin de aumentar la afinidad de la molécula quimérica generada de este modo. Este diseño racional se ha realizado *in silico*, después se ha validado por varios métodos biofísicos complementarios. Por último, la caracterización de la actividad biológica se ha realizado en células humanas en cultivo.

25

Optimización del diseño del péptido inhibidor de la interacción H3H4:

El objetivo de la invención es el diseño de un péptido inhibidor de la interacción entre la chaperona Asf1 y las histonas H3 y H4. Para ello, los inventores han acoplado los epítomos de unión de las histonas H3 y H4 a Asf1 entre ellos. Para esto, la hélice α3 de la histona H3 (péptido i1, SEQ ID No 70) se conectó con la hebra β C-terminal de la histona H4 a través de un bucle peptídico, en donde la longitud y la composición se han optimizado. Varios aminoácidos de los epítomos H3 y H4 se han modificado con el fin de estabilizar la forma unida del péptido, para que sea más soluble y más resistente a las proteasas, con el fin de mejorar su vida útil en las células humanas. Los inventores han obtenido entonces una serie de péptidos indicados como i4, i4\_1, i4\_2, i4V, i42V. Finalmente, ciertas modificaciones de la secuencia han permitido optimizar la interacción del péptido con Asf1 (péptido i5, SEQ ID No 32).

30

35 Esquema de diseño del péptido

*Péptido de partida:* fragmento de la histona H3

SEQ ID No 70 (i1)	GAMGTIMPKDIQLARRIRG	Kd=8,7 µM
-------------------	---------------------	-----------

en donde la presencia de los residuos GAMG son el resultado del vector de clonación empleado.

*Estabilización del péptido*

SEQ ID No 71	GAMGTITPKEAQLARRIRG	Kd=1,4 µM
--------------	---------------------	-----------

SEQ ID No 72	GAMGTLTPKEAELARRIRG	Kd=2,23 µM
--------------	---------------------	------------

*Péptidos que acoplan el dominio H3 con el dominio H4 a través de un bucle*

SEQ ID No 38 (i4_1)	GAMGTIMPKDIQLARRIRGAGGRTLYGFG	Kd=0,56 µM
---------------------	-------------------------------	------------

SEQ ID No 39	GAMGTIMPKDIQLARRIRGAGASRTLYGFG	Kd=0,35 µM
--------------	--------------------------------	------------

## ES 2 639 838 T3

SEQ ID No 40 (i4_2)	GAMGTITPKEAQLARRIRGAGGRTLNGFG	Kd=0,22 µM
SEQ ID No 41	GAMGTITPKEAQLARRIRGAGASRTLNGFG	Kd=0,80 µM
SEQ ID No 42 (i4)	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGRTLNGFG	Kd=0,18 µM
SEQ ID No 43	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG	Kd=0,35 µM

*Péptidos más resistentes a las proteasas*

SEQ ID No 44	GAMGTITPKEAQLARRIEGAGASVTLNGFG	Kd=0,66 µM
SEQ ID No 45	GAMGTLTPKEAELARRIEGAGASVTLNGFG	Kd=2,00 µM
SEQ ID No 46	GAMGTITPKEEQLRRRIEGAGASVTLNGFG	Kd=0,42 µM
SEQ ID No 47 (i42V)	GAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,35 µM
SEQ ID No 48 (i4V)	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,06 µM

*Prueba de las longitudes del bucle*

SEQ ID No 73	GAMGTLTPKEAELARRIRGARTLNGFG	Kd=3,89 µM
SEQ ID No 49	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGRTLNGFG	Kd=0,95 µM
SEQ ID No 42	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGRTLNGFG	Kd=0,18 µM
SEQ ID No 51	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG	Kd=0,35 µM
SEQ ID No 74	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGASGRTLNGFG	Kd=1,89 µM

*Prueba de la extensión en el extremo N-terminal*

SEQ ID No 52	GAMGLTAAEHAKRSTLTPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,03 µM
SEQ ID No 53	LTAAEHAKRSTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,06 µM
SEQ ID No 54	LTAAEHAKRSTLTPKEAQLARRIEGAGASVTLNGFG	Kd=0,12 µM
SEQ ID No 55	LTAAEHAKRSTLTPKEAELARRIEGAGASVTLNGFG	Kd=0,88 µM

*Prueba para transformar el péptido en péptido que penetra en las células (CPP)*

SEQ ID No 56	GAMGTRTPKERRLARRIRGAGGRTLNGFG	Kd=0,03 µM
SEQ ID No 57	GAMGTRTPKEARLARRIRGAGGRTLNGFG	Kd=0,26 µM

5 *Prueba para añadir péptidos que penetran en las células (CPP)*

SEQ ID No 58 (TAT-i42V)	GRKKRRQRRRGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,62 µM
SEQ ID No 59 (RRP5-i42V)	RRPRRRRRPRRRPRRGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,59 µM
SEQ ID No 60 (RRP5-i1)	RPRRRRRRRPRRRPRRGAMGTIMPDIQLARRIRGGCA	Kd=0,46 µM
SEQ ID No 50 (RRP5-i42V-CA)	RRPRRRRRRRPRRRPRRGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNG- FGCA	Kd=0,42 µM

*Prueba de la extensión en el extremo C-terminal*

SEQ ID No 61	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTYDGFG	Kd=0,10 $\mu$ M
SEQ ID No 62	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFGASTG	Kd=0,32 $\mu$ M
SEQ ID No 63	GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGANFVSTG	Kd=1,68 $\mu$ M
<i>Optimización de la unión con Asf1</i>		
SEQ ID No 64	GAMGRVPPAVRKLGNSTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,08 $\mu$ M
SEQ ID No 65	GAMGRVPPAVRKLGNASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,06 $\mu$ M
SEQ ID No 32 (i5)	ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,04 $\mu$ M
SEQ ID No 33	ASTRRKWAELARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=1,33 $\mu$ M
SEQ ID No 66 (RRP5-i5)	RRPRRRRRPRRRPRRPAsterKWAELARRIRGAGGVTLNGFGGCA	Kd=0,67 $\mu$ M
SEQ ID No 75 (i5_s3)	ASTEELKWARLARRIRGAGGVTLNGFG	Kd=0,02 $\mu$ M
SEQ ID No 76 (i5_D)	ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNDFGFG	Kd=0,009 $\mu$ M
SEQ ID No 77 (i5_loopR)	ASTERKWAELARRIRGAGGRTLNGFG	Kd= 0,029 $\mu$ M
SEQ ID No 78 (i5_loopA)	ASTERKWAELARRIRGAGGATLNGFG	Kd=0,063 $\mu$ M
SEQ ID No 79 (i5_Aloop)	ASTERKWAELARRIAGAGGVTLNGFG	Kd=0,027 $\mu$ M
SEQ ID No 80 (i6)	ASTEELKWARLARRIAGAGGVTLNDFGFG	Kd=0,003 $\mu$ M
SEQ ID No 81 (RRP5-i6)	RRPRRRRRPRRRPRRPAsteELKWARLARRIAGAGGVTLNDFGFG	

5 Estas diversas etapas de diseño han permitido aumentar la afinidad de los péptidos hacia Asf1 en un factor 200: a partir de un fragmento de histona H3 aislado (el péptido i1) que muestra una afinidad de 8  $\mu$ M, se obtiene un inhibidor i4 (SEQ ID No 42), que muestra una afinidad de 180 nM  $\pm$  40 nM, para lo cual los inventores han resuelto la estructura del complejo con Asf1 con alta resolución (Figura 2). Otro péptido, i5 (SEQ ID No 32), se ha podido diseñar entonces, presentando una afinidad de 40 nM  $\pm$  13 nM (Figura 1). A partir de este péptido, se ha diseñado un péptido de control (i5 mutado, SEQ ID No 68). Tiene 90% de identidad con el péptido i5, pero está mutado en tres residuos clave de alanina y ya no se une a Asf1. Este péptido se ha sintetizado para servir de control negativo en los experimentos de competencia, así como la prueba de interacción. A continuación, la secuencia del péptido i5 se ha optimizado con el fin de obtener los péptidos i5\_s3 (SEQ ID No 75), i5\_D (SEQ ID No 76), i5\_loopR (SEQ ID No 77), i5\_loopA (SEQ ID No 78), i5\_Aloop (SEC ID No. 79) e i6 (SEQ ID No 80), en los cuales la afinidad es al menos tan buena como la del péptido i5.

Caracterización biofísica y estructural:

15 El diseño de los péptidos se ha realizado gracias a un ir y venir entre la caracterización biofísica de las propiedades de unión del péptido y el modelado molecular. El impacto de las mutaciones sobre la estructura ha sido verificado sistemáticamente por dicroísmo circular y RMN. Las estructuras tridimensionales de los péptidos i4 e i5 en interacción con Asf1 (1-156), se han resuelto mediante cristalografía de rayos X (Figura 2).

Competencia péptido/histonas *in vitro*:

20 Los inventores han controlado que el péptido inhibidor es capaz de competir con las histonas para unirse a Asf1 por medio de pruebas de competencia en una columna GST. Para ello, perlas de GST unidas a Asf1 se incubaron con un exceso de histonas H3-H4, después se lavaron y se incubaron con concentraciones crecientes de péptido. Las histonas eluidas se analizaron por transferencia Western. Cuando las perlas se incubaban solamente con tampón (i5 0 mM en la Figura 3) o con el péptido i5 mutado (i5 mutado 0,1 y 1 mM en la Figura 3), las histonas permanecieron asociadas a Asf1. Por contra, cuando las perlas se incubaban con 0,1 mM y después 1 mM de péptido i5, se observaba que las histonas se separaban de las perlas (pocillos de i5 0,1 mM e i5 1 mM en la Figura 3). Este resultado muestra que, *in vitro*, el péptido es capaz de disociar la interacción entre Asf1 y las histonas.

25 Cuando el mismo experimento se lleva a cabo con diferentes cantidades de péptidos i5 e i6, así como el péptido

control i5mut (Figura 8), se observa que una menor cantidad de péptido i6 es suficiente para disociar el complejo Asf1-histonas.

#### Caracterización de la interacción Asf1-péptido *in vivo*:

5 Los inventores han controlado que la interacción entre Asf1 y los péptidos se puede establecer en las células humanas mediante coimmunoprecipitación (Figura 4). Para esto, células U2OS se transfectaron gracias a Lipofectamina (Invitrogen) con plásmidos que contenían el gen de los péptidos i5 e i5mut, capaces (o no, respectivamente) de unirse a Asf1 en forma de una proteína de fusión con la proteína fluorescente eGFP, con el fin de controlar la localización del péptido por microscopía de fluorescencia. La localización de las proteínas de fusión se analizó mediante microscopía de fluorescencia (Figura 4A). El control positivo está constituido por células transfectadas con la histona H3 completa, también fusionada a eGFP, mientras que un segundo control negativo está constituido por células transfectadas con la histona H3 mutada en 3 residuos clave para no interactuar con Asf1 (H3-R3A). En este sistema, se observa tal y como se esperaba una coimmunoprecipitación con Asf1 (Figura 4B).

#### Caracterización del fenotipo unido a la adición del péptido en las células humanas:

15 Con el fin de analizar el efecto biológico del péptido sobre las células cultivadas, los inventores sometieron a ensayo al mismo tiempo su capacidad para penetrar en las células. El péptido se había vectorizado usando una secuencia corta de aproximadamente 10 aminoácidos en el extremo N-terminal que confiere al péptido una propiedad de "Cell Penetrating Peptide", es decir, la capacidad de ser internalizado en las células por un mecanismo denominado de transducción. Esta secuencia (RRP)<sub>5</sub> ha sido publicada por el grupo de Schepartz en 2007 (Journal of The American Chemical Society 129(47): 14578).

20 La capacidad del péptido i42V (SEQ ID No 47) acoplado o bien a la secuencia de TAT (péptido TAT-i42V, SEQ ID No 58) o a la secuencia (RRP)<sub>5</sub> (péptido RRP5-i42V, SEQ ID No 59), se ha medido gracias a estos péptidos acoplados con un marcador FITC. La fluorescencia media de las células se ha analizado por citometría de flujo (Figura 5). Curiosamente, los péptidos acoplados a las secuencias de penetración, penetran más eficazmente que las secuencias de penetración solas.

25 Con el fin de optimizar la internalización del péptido, la transducción se lleva a cabo en presencia de butirato de pireno, de acuerdo con el protocolo propuesto por Takeuchi et al. (2006, ACS Chemical Biology, 2006. 1(5): p. 299-303). Los péptidos que presentan diferentes afinidades hacia Asf1, fueron transducidos, así como un péptido de control que no se unía a Asf1, gracias a tres mutaciones en los residuos clave para la interacción con Asf1 (i5mut, SEQ ID No 68) en células U2OS. De forma remarcable, 24 horas después de la transducción del péptido más afín, con una concentración de 10  $\mu$ M, se observa una mortalidad del 30%, mientras que no se observa ninguna toxicidad para las células de control tratadas o bien con butirato de pireno solo o con el péptido RRP5-i5mut que no se une a Asf1. Además, esta toxicidad se correlaciona con la afinidad de los péptidos medidos inicialmente por microcalorimetría, lo que sugiere firmemente que la toxicidad observada está bien relacionada con la inhibición de la proteína chaperona Asf1 (Figura 6). RRP5-i1 se corresponde con el péptido de SEQ ID No 60. RRP5-i5 se corresponde con el péptido de SEQ ID No 66. Esta correlación entre la afinidad del péptido hacia Asf1 y la toxicidad celular inducida, se ha confirmado para otro tipo celular (células HeLa) y usando un protocolo diferente para medir la supervivencia celular, la prueba MTT (Figura 10).

40 Con el fin de verificar que esta toxicidad no era un artefacto relacionado con la manera de introducir el péptido en la célula, los inventores han introducido el péptido en forma de un plásmido mediante transfección (nucleofección). También han observado una correlación entre la afinidad del péptido hacia Asf1 *in vitro* y la toxicidad celular (Figura 9).

45 La toxicidad celular puede ser el resultado de un conjunto de razones muy diversas, los inventores han intentado poner en evidencia un fenotipo ligado más específicamente a la inhibición de la chaperona de histonas Asf1. Para ello, han analizado el efecto de la transducción de los péptidos sobre la progresión del ciclo celular. Las células U2OS se han sincronizado en la fase G1. Después del reinicio del ciclo y la transducción de los péptidos RRP5-i5 (SEQ ID No 66) o RRP5-i5mut (SEQ ID No 69), se constata que la transición de las fases G1 y S se ralentiza para la versión activa del péptido y no su versión mutada (Figura 7), lo que demuestra la especificidad de la acción del péptido inhibidor, de la interacción Asf1-histona.

#### Materiales y Métodos

#### 50 Expresión y clonación

55 Las proteínas humanas Asf1a y b, así como el dominio N-terminal conservado (1-156) de cada una de las isoformas, se clonaron en el vector pETM30. Las proteínas recombinantes, sin marcar, marcadas en <sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N se purificaron de acuerdo con el protocolo de Mousson et al., (2004, Journal of Biomolecular Nmr, 29(3): 413-414). Los péptidos se produjeron por síntesis química (Genecust) o bien se clonaron después de una síntesis de gen (GENECUST) en el vector Gateway pDest 17 (Invitrogen) y luego se purificaron de acuerdo con el protocolo de Mousson et al., (2005, Proc. Natl. Sci. USA, 102(17): p. 5975-5980).

Diseño

El diseño de los péptidos se realizó utilizando el programa informático Rosetta (Das et al., 2008, Annual Review of Biochemistry, 77: p. 363-382), Fold-X (Guerois et al., 2002, J Mol Biol 320(2): 369-387) y AGADIR (Lacroix et al., 1998 J Mol Biol 284(1): 173-191).

5 Dicroísmo circular:

Los experimentos de dicroísmo circular se realizaron gracias a un aparato Jasco utilizando una concentración de péptidos de 50  $\mu$ M, en H<sub>2</sub>O a pH 5,5, a 5°C.

Calorimetría:

10 Todos los experimentos de calorimetría se realizaron en un tampón Tris 50 mM pH 7,4 a 5°C, a menos que se indique lo contrario. Los péptidos se introdujeron en la jeringa a una concentración de 0,5 mM o 0,16 mM, y Asf1 se introdujo en la cubeta a una concentración de 30  $\mu$ M o 10  $\mu$ M. Las pruebas de calorimetría también se llevaron a cabo a 25°C o en tampón Tris 50 mM pH 7,4 NaCl 150 mM para obtener informaciones más precisas sobre las características de las interacciones estudiadas.

RMN:

15 Todas las muestras de RMN se prepararon ya sea en un tampón H<sub>2</sub>O, 10% de D<sub>2</sub>O, 0,1% de NaN<sub>3</sub>, EDTA 1 mM 0,1% de NaN<sub>3</sub>, 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato 0,1 mM, pH 5,5 para los espectros RMN de los péptidos solos, o bien en un tampón Tris D<sub>11</sub> 10 mM, 0,1% de NaN<sub>3</sub>, EDTA 1 mM, 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato 0,1 mM, 10% de D<sub>2</sub>O, pH 7,4. Se utilizaron varios tipos de muestras: Asf1a 1-156 marcada uniformemente en <sup>15</sup>N o <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N, formando un complejo con péptidos sin marcar. Para estos experimentos, la concentración de las muestras era de 0,1 mM. Los experimentos de RMN se realizaron en espectrómetros Bruker de 600 o 700 MHz equipados con criosondas.

Cristalografía:

Los cristales de Asf1 que forman un complejo con el péptido inhibidor i4 (SEQ ID No 60) se obtuvieron por difusión de vapor en una solución de Tris/HCl 100 mM pH 7,5, 5% de PEG 8000, 30% de glicerol.

25 Aquellos del complejo con el péptido inhibidor i5 (SEQ ID No 66) se obtuvieron en condiciones de LiSO<sub>4</sub> 250 mM, 7% de PEG 8000, ácido cítrico 100 mM pH 2,5, 22,5% de xilitol.

La estructura de los complejos se resolvió por reemplazamiento molecular con ayuda de la estructura cristalográfica de Asf1a (código Pdb 2io5)

Pruebas de competencia en columna GST:

30 La proteína humana GST-Asf1 1-156 se produjo y después se incubó con perlas GST (glutación S transferasa, Sigma). Para cada experimento, se incubaron 40  $\mu$ g de Asf1 recombinante, fijados en perlas de agarosa con 400  $\mu$ g de histonas. Después de lavar con el tampón Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, 0,5% de NP40, las perlas se incubaron con diferentes concentraciones de péptido (0 a 1 mM) disueltas en el mismo tampón. La cantidad de histonas disociadas se reveló por transferencia Western y anticuerpos anti-GST y anti-H3 (AbCam).

35 Coinmunoprecipitaciones:

Las células U2OS se transfectaron con plásmidos que contenían histonas o el péptido, marcado en EYFP. Veinticuatro horas más tarde, las células se lisaron y después se incubaron sobre perlas que comprendían un anticuerpo anti-GFP (Miltenyi Biotec). Después de lavar en tampón acetato de potasio 100 mM, KCl 30 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Triton X-100 al 0,2%, NaCl 200 mM, las proteínas asociadas a las perlas se analizaron por transferencia Western con anticuerpos anti-GFP (AbCam) y anti-Asf1 (producido por el equipo de Carl Mann).

Prueba de penetración de las células

Las células U2OS se incubaron con medio de cultivo complementado con el péptido fluorescente a una concentración final de 1  $\mu$ M, durante una hora y después se lavaron con PBS y se separaron mediante la adición de tripsina, se lavaron con un tampón PBS y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS)

45 Pruebas de toxicidad y fenotipos:

Para someter a ensayo los fenotipos inducidos por el péptido, se usó un protocolo desarrollado recientemente para el "Cell Penetrating TAT". Los péptidos se disolvieron en tampón PBS que contenía butirato de pireno 50  $\mu$ M y se incubaron con las células U2OS (o Hela) durante 4 minutos. Después, las células se lavaron después 3 veces con tampón PBS y luego se recogieron en medio de cultivo que contenía suero de ternera fetal. La mortalidad celular se analizó mediante FACS, 24 a 48 horas más tarde mediante la incorporación de yoduro de propidio o por una prueba

50

MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio). (Mosmann, T. J. Immunol. Methods. 65: 55-63, 1983).

Nucleofección

- 5 Las células U2OS se transfectaron con un vector que era portador del gen de los péptidos inhibidores en forma de proteína de fusión con GFP, utilizando un protocolo de nucleofección (Nucleofector<sup>®</sup> Solution V, Lonza) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el proveedor.

Prueba de perturbación del ciclo

- 10 Las células U2OS se sincronizaron en fase G1 mediante incubación durante una noche con mimosina (200 µM). El reinicio del ciclo se desencadena por un lavado con PBS. Los péptidos solubilizados en tampón PBS que contenía butirato de pireno de 50 µM, se incubaron a continuación con las células durante 4 minutos, las células se lavaron 3 veces con tampón PBS y después se recogieron en un medio de cultivo que contenía suero de ternera fetal. Se recogieron 1 h, 4 h, 7 h y 10 h más tarde. El medio se retiró y el sedimento celular se recogió en 500 µL de PBS + 40 µg/mL de IP (yoduro de propidio) + 40 µg/mL de ARNasa. Después de una incubación durante 20 minutos a 4°C, la fluorescencia de las células se analizó por citometría de flujo (FACS).

- 15 Tabla del listado de secuencias

SEQ ID No	Descripción
1	E1 de fórmula (I), modo a1)
2	E1 de fórmula (I), modo a2)
3	B de fórmula (II)
4	E2 de fórmula (III)
5	E1-B-E2 de fórmula (IV)
6	E1-B-E2 de fórmula (V)
7	E1 de fórmula (I), modo a1)
8	E1 de fórmula (I), modo a2)
9	E1-B-E2 de fórmula (VI)
10	E1-B-E2 de fórmula (VII)
11	E1-B-E2 de fórmula (VIII)
12	E1-B-E2 de fórmula (IX)
13	elemento E1-B-E2
14	elemento E1-B-E2
15	elemento E1-B-E2
16	elemento E1-B-E2
17	elemento E1-B-E2
18	elemento E1-B-E2



ES 2 639 838 T3

19	elemento E1-B-E2
20	elemento E1-B-E2
21	elemento E1-B-E2
22	elemento E1-B-E2
23	elemento E1-B-E2
24	elemento E1-B-E2
25	elemento E1-B-E2
26	elemento E1-B-E2
27	elemento E1-B-E2
28	elemento E1-B-E2
29	elemento E1-B-E2
30	elemento E1-B-E2
31	elemento E1-B-E2
32	elemento B-E1-E2 - péptido i5
33	elemento E1-B-E2
34	péptido de Tat
35	penetratina
36	poli-arginina
37	(RRP) <sub>5</sub>
38	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4-péptido i4_1
39	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
40	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4-péptido i4_2
41	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
42	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4- péptido i4
43	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
44	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
45	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4

## ES 2 639 838 T3

46	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
47	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4-péptido i42V
48	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4-péptido i4V
49	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
50	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4-péptido RRP5 i42V-CA
51	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
52	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
53	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
54	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
55	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
56	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
57	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
58	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4-péptido TAT i42V
59	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4-péptido RRP5-i42V
60	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4-péptido RRP5-i1
61	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
62	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
63	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
64	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
65	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
66	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4-péptido RRP5-i5
67	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
68	péptido i5 mutado
69	Péptido RRP5 i5 mutado
70	Péptido i1
71	Fragmento H3 estabilizado
72	Fragmento H3 estabilizado

ES 2 639 838 T3

73	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
74	péptido inhibidor Asf1 / H3-H4
75	Péptido i5_s3
76	Péptido i5_D
77	Péptido i5_loopR
78	Péptido i5_loopA
79	Péptido i5_Aloop
80	Péptido i6
81	Péptido RRP5-i6
82	E1-B-E2 de fórmula (X)

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)

<120> Péptidos inhibidores de la interacción entre ASF1 y las histonas, y sus usos

5 <130> B1257FR

<160> 82

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fórmula (I) = E1, realización a1

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa es X3, un aminoácido hidrófobo o R, preferiblemente A, C, V, P, L, I, M, F, W, R o Y

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa es X4, siendo T, S, P, D, M o N

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa es X5, cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa es X6, siendo Q, E, L, M, A, D o W

35

<220>

<221> MISC\_FEATURE

ES 2 639 838 T3

<222> (6) .. (7)

<223> Xaa son X7 y X8, cualquiera de los aminoácidos (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (9) .. (10)

<223> Xaa son X9 y X10, cualquiera de los aminoácidos (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (13) .. (13)

<223> Xaa es X11, cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

<400> 1

15

Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Ile Xaa  
1 5 10

<210> 2

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fórmula (I) E1, realización a2

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

30 <223> Xaa es X1, estando ausente o cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2) .. (2)

35 <223> Xaa es X2, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa es X3, siendo T, S, P, D o N

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (5)

<223> Xaa son X4 y X5, siendo aminoácidos favorables a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente s A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa es X6, siendo Q, E, L, M, A, D o W

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (9)

<223> Xaa son X7 y X8, siendo cualquiera de los aminoácidos (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11) .. (12)

<223> Xaa son X9 y X10, siendo cualquiera de los aminoácidos (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15) .. (15)

<223> Xaa es X11, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

30

<400> 2

35

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Ile Xaa  
 1 5 10 15

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Fórmula (II) = B

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa es X12, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

15 <221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa es X13, estando ausente o siendo G, A o S

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa es X14, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

25 <400> 3

**Gly Xaa Gly Xaa Xaa**  
**1 5**

<210> 4

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Fórmula (III) = E2

ES 2 639 838 T3

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa es X15, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa es X16, siendo T o V

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa es X17, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa es X18, siendo cualquier aminoácido no cargado positivamente (A, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, M, F, P, S, T, V, W e Y)

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa es X19, siendo un aminoácido hidrófobo, preferiblemente A, C, V, P, L, I, M, F, W o Y

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa es X20, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

30

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa

35

1

5

<210> 5



<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Fórmula (IV) = E1 (a1) -B-E2

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (1) .. (1)

<223> Xaa es X3, siendo un aminoácido A, C, V, P, L, I, M, F, W, R o Y, preferiblemente A, C, V, P, L, I, M, F, W o Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa es X4, siendo T, S, P, D, M o N

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (3) .. (3)

<223> Xaa es X5, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

25 <222> (5) .. (5)

<223> Xaa es X6, siendo Q, E, L, M, A, D o W

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30 <222> (6) .. (7)

<223> Xaa son X7 y X8, siendo cualquiera de los aminoácidos (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

35 <221> MISC\_FEATURE

<222> (9) .. (10)

<223> Xaa son X9 y X10, siendo cualquiera de los aminoácidos (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W

e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (13) .. (13)

<223> Xaa es X11, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (15) .. (15)

<223> Xaa es X12, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (17) .. (17)

<223> Xaa es X13, estando ausente o seleccionado entre los aminoácidos G, A y S

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (18) .. (18)

<223> Xaa es X14, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa es X15, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

30 <221> MISC\_FEATURE

<222> (20) .. (20)

<223> Xaa es X16, siendo T o V

<220>

35 <221> MISC\_FEATURE

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa es X17, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22) .. (22)

5 <223> Xaa es X18, siendo cualquier aminoácido no cargado positivamente (A, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (24) .. (24)

<223> Xaa es X19, siendo un aminoácido hidrófobo, preferiblemente A, C, V, P, L, I, M, F, W o Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (25) .. (25)

<223> Xaa es X20, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<400> 5

20

Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Ile Xaa Gly Xaa Gly  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa  
 20 25

<210> 6

<211> 27

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fórmula (V) = E1 (a2) -B-E2

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

35 <223> Xaa es X1, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2) .. (2)

5 <223> Xaa es X2, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (3) .. (3)

<223> Xaa es X3, siendo T, S, P, D o N

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (4) .. (5)

<223> Xaa son X4 y X5, siendo aminoácidos favorables a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa es X6, siendo Q, E, L, M, A, D o W

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (9)

<223> Xaa son X7 y X8, siendo cualquiera de los aminoácidos (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

30 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11) .. (12)

<223> Xaa son X9 y X10, siendo cualquiera de los aminoácidos (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

35

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15) .. (15)

## ES 2 639 838 T3

<223> Xaa es X11, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (17) .. (17)

<223> Xaa es X12, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (19) .. (19)

<223> Xaa es X13, estando ausente o siendo un aminoácido G, A o S

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (20) .. (20)

<223> Xaa es X14, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa es X15, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (22) .. (22)

<223> Xaa es X16, siendo T o V

<220>

30 <221> MISC\_FEATURE

<222> (23) .. (23)

<223> Xaa es X17, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

35 <221> MISC\_FEATURE

<222> (24) .. (24)

<223> Xaa es X18, siendo cualquier aminoácido no cargado positivamente (A, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, M, F, P, S, T,

V, W o Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (26) .. (26)

<223> Xaa es X19, siendo un aminoácido hidrófobo, preferiblemente A, C, V, P, L, I, M, F, W o Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (27) .. (27)

<223> Xaa es X20, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<400> 6

15

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Ile Xaa Gly
1           5           10           15
```

```
Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
           20           25
```

20 <210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Fórmula (I) = E1, realización preferida de a1

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30 <222> (1) .. (1)

<223> Xaa es X3, siendo un aminoácido hidrófobo s (A, C, V, P, L, I, M, F, W o Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

35 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa es X4, siendo T, S, P, D o N

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (3)

5 <223> Xaa es X5, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5) .. (5)

10 <223> Xaa es X6, siendo Q, E, L, M, A o W

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6) .. (7)

15 <223> Xaa son X7 y X8, siendo aminoácidos favorables a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (9) .. (9)

<223> Xaa es X9, siendo un aminoácido favorable a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa es X10, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

<220>

30 <221> MISC\_FEATURE

<222> (13) .. (13)

<223> Xaa es X11, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

<400> 7

35

Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Ile Xaa  
 1 5 10

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Fórmula (I) = E1, realización preferida de a2

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (2)

<223> Xaa son X1 y X2, siendo cualquiera de los aminoácidos, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

15 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa es X3, siendo T, S, P, D o N

20 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (5)

<223> Xaa son X4 y X5, siendo aminoácidos favorables a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa es X6, siendo Q, E, L, M, A o W

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (9)

35 <223> Xaa son X7 y X8, siendo aminoácidos favorables a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE



# ES 2 639 838 T3

<222> (11) .. (11)

<223> Xaa es X9, siendo un aminoácido favorable a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

5 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa es X10, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15) .. (15)

<223> Xaa es X11, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

15 <400> 8

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Ile Xaa  
1 5 10 15

<210> 9

20 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Fórmula (IV) preferida = E1 (a1) -B-E2

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

30 <223> Xaa es X3, siendo un aminoácido hidrófobo seleccionado entre el grupo que consiste en A, C, V, P, L, I, M, F, W e Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE

35 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa es X4, siendo T, S, P, D o N

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa es X5, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa es X6, siendo Q, E, L, M, A o W

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6) .. (7)

15 <223> Xaa son X7 y X8, siendo aminoácidos favorables a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9) .. (9)

20 <223> Xaa es X9, siendo un aminoácido favorable a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE

25 <222> (10) .. (10)

<223> Xaa es X10, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30 <222> (13) .. (13)

<223> Xaa es X11, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

35 <222> (15) .. (15)

<223> Xaa es X12, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa es X13, estando ausente o seleccionado entre los aminoácidos G, A y S

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (18) .. (18)

<223> Xaa es X14, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa es X15, siendo A, T, V, I o R

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (20) .. (20)

<223> Xaa es X16, siendo T o V

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa es X17, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22) .. (22)

<223> Xaa es X18, siendo cualquier aminoácido no cargado positivamente (A, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, M, F, P, S, T, V, W e Y)

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24) .. (24)

<223> Xaa es X19, siendo un aminoácido hidrófobo, preferiblemente A, C, V, P, L, I, M, F, W o Y

35

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (25) .. (25)

5 <223> Xaa es X20, estando ausente o siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

<400> 9

Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Ile Xaa Gly Xaa Gly  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa  
20 25

10

<210> 10

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Fórmula (V) preferida = E1 (a2) -B-E2

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (2)

<223> Xaa son X1 y X2, siendo cualquiera de los aminoácidos (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

25 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa es X3, siendo T, S, P, D o N

30 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (5)

<223> Xaa son X4 y X5, siendo aminoácidos favorables a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

35

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa es X6, siendo Q, E, L, M, A o W

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (9)

<223> Xaa son X7 y X8, siendo aminoácidos favorables a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11) .. (11)

<223> Xaa es X9, siendo un aminoácido favorable a una estructura secundaria de hélice alfa, preferiblemente A, R, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, M, F, S, W o Y

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa es X10, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15) .. (15)

<223> Xaa es X11, siendo cualquier aminoácido, (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W o Y)

25

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa es X12, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa es X13, estando ausente o seleccionado entre los aminoácidos G, A y S

35

## ES 2 639 838 T3

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (20) .. (20)

5 <223> Xaa es X14, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (21) .. (21)

10 <223> Xaa es X15, siendo A, T, V, I o R

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22) .. (22)

15 <223> Xaa es X16, siendo T o V

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (23) .. (23)

20 <223> Xaa es X17, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24) .. (24)

25 <223> Xaa es X18, siendo cualquier aminoácido no cargado positivamente (A, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30 <222> (26) .. (26)

<223> Xaa es X19, siendo un aminoácido hidrófobo, preferiblemente s A, C, V, P, L, I, M, F, W o Y

<220>

<221> MISC\_FEATURE

35 <222> (27) .. (27)

<223> Xaa es X20, siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27) .. (27)

5 <223> Xaa es X20, estando ausente o siendo cualquier aminoácido (A, R, D, N, C, G, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, V, W e Y)

<400> 10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Ile Xaa Gly  
1 5 10 15

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa  
20 25

10

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Fórmula (IV) preferida = E1 (a1) -B-E2

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa es X3, siendo I, R o L

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa es X4, siendo T o M

<220>

30 <221> MISC\_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa es X6, siendo E o D

<220>

35 <221> MISC\_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa es X7, siendo R, A, I o E

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa es X8, siendo R, Q o E

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa es X9, siendo R o A

<220>

15 <221> MISC\_FEATURE

<222> (13) .. (13)

<223> Xaa es X11, siendo R o E

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (15) .. (15)

<223> Xaa es X12, siendo A o P

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa es X13, estando ausente o seleccionado entre los aminoácidos G, A y S

<220>

30 <221> MISC\_FEATURE

<222> (18) .. (18)

<223> Xaa es X14, estando ausente o siendo S

<220>

35 <221> MISC\_FEATURE

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa es X15, siendo R o V



<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (20) .. (20)

5 <223> Xaa es X16, siendo T o V

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22) .. (22)

10 <223> Xaa es X18, siendo Y, N o D

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24) .. (24)

15 <223> Xaa es X19, siendo F, M, A o Q

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (25) .. (25)

20 <223> Xaa es X20, siendo G, Q o N

<400> 11

Xaa Xaa Pro Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Arg Arg Ile Xaa Gly Xaa Gly  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Gly Xaa Xaa  
 20 25

25

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Fórmula (V) preferida = E1 (a2) -B-E2

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa es X4, siendo E o R

5 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa es X12, siendo A o P

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa es X13, estando ausente o seleccionado entre los aminoácidos G, A y S

15 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (20) .. (20)

<223> Xaa es X14, estando ausente o siendo S

20 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa es X15, siendo R o V

25 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22) .. (22)

<223> Xaa es X16, siendo T o V

30 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24) .. (24)

<223> Xaa es X18, siendo Y, N o D

35 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (26) .. (26)

<223> Xaa es X19, siendo F, M, A o Q

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (27) .. (27)

<223> Xaa es X20, siendo G, Q o N

<400> 12

Ala Ser Thr Xaa Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly  
1 5 10 15

10 Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Gly Xaa Xaa  
20 25

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

20 <400> 13

Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Arg Thr Leu Tyr Gly Phe Gly  
20

<210> 14

25 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> elemento E1-B-E2

<400> 14

ES 2 639 838 T3

Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Ala Ser Arg Thr Leu Tyr Gly Phe Gly  
20 25

<210> 15

5 <211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> elemento E1-B-E2

<400> 15

Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20

15

<210> 16

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> elemento E1-B-E2

<400> 16

25

Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Ala Ser Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 17

<211> 24

ES 2 639 838 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> elemento E1-B-E2

<400> 17

Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20

10 <210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> elemento E1-B-E2

<400> 18

Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Ala Ser Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

20

<210> 19

<211> 25

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

30 <400> 19

ES 2 639 838 T3

Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg Ile Glu Gly Ala Gly  
1                   5                   10                   15

Ala Ser Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
          20                   25

<210> 20

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

10

<400> 20

Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Glu Gly Ala Gly  
1                   5                   10                   15

Ala Ser Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
          20                   25

15 <210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> elemento E1-B-E2

<400> 21

Ile Thr Pro Lys Glu Glu Gln Leu Arg Arg Arg Ile Glu Gly Ala Gly  
1                   5                   10                   15

25

Ala Ser Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
          20                   25

<210> 22

<211> 24

<212> PRT

ES 2 639 838 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

5

<400> 22

Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1                    5                    10                    15

Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
                  20

10 <210> 23

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> elemento E1-B-E2

<400> 23

Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1                    5                    10                    15

Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
                  20

20

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

30 <400> 24

ES 2 639 838 T3

Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20

<210> 25

<211> 24

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

10

<400> 25

Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20

15 <210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> elemento E1-B-E2

<400> 26

Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

25 Ala Ser Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 27

<211> 24

<212> PRT



ES 2 639 838 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

5

<400> 27

Arg Thr Pro Lys Glu Arg Arg Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1                    5                    10                    15

Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
                  20

10 <210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> elemento E1-B-E2

<400> 28

Arg Thr Pro Lys Glu Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1                    5                    10                    15

Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
                  20

20

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

30 <400> 29

ES 2 639 838 T3

Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Val Thr Tyr Asp Gly Phe Gly  
20

<210> 30

<211> 24

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

10

<400> 30

Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Val Thr Leu Asn Gly Ala Asn  
20

15 <210> 31

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> elemento E1-B-E2

<400> 31

Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala  
1 5 10 15

25 Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 32

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> elemento E1-B-E2

5

<400> 32

Ala Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly  
1 5 10 15

Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

10 <210> 33

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> elemento E1-B-E2

<400> 33

Ala Ser Thr Arg Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly  
1 5 10 15

20 Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido Tat

30 <400> 34

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5

<210> 35

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de antenapedia

10

<400> 35

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1 5 10 15

15 <210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> péptido de poliarginina

<400> 36

25 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido rico en arginina

35 <400> 37

ES 2 639 838 T3

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro  
1 5 10 15

<210> 38

5 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4 - péptido i4\_1

<400> 38

Gly Ala Met Gly Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Arg Thr Leu Tyr Gly Phe Gly  
20 25

15

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 39

25

Gly Ala Met Gly Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Ala Ser Arg Thr Leu Tyr Gly Phe Gly  
20 25 30

<210> 40

<211> 29

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4 - péptido i4\_2

5 <400> 40

Gly Ala Met Gly Thr Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 41

10 <211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 41

Gly Ala Met Gly Thr Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Ala Ser Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25 30

20

<210> 42

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y el H3-H4 - péptido i4

<400> 42

30

ES 2 639 838 T3

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 43

<211> 30

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

10

<400> 43

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Ala Ser Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25 30

15 <210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 44

Gly Ala Met Gly Thr Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Glu Gly Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25 30

25

<210> 45

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

5

<400> 45

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Glu Gly Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25 30

10 <210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 46

Gly Ala Met Gly Thr Ile Thr Pro Lys Glu Glu Gln Leu Arg Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Glu Gly Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25 30

20

<210> 47

<211> 29

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4-péptido i42V

30 <400> 47



ES 2 639 838 T3

Gly Ala Met Gly Thr Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 48

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4-péptido i4V

10

<400> 48

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

15 <210> 49

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 49

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

25

<210> 50

<211> 46

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4-péptido RRP5-i42V-CA

5

<400> 50

```

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly
1           5           10           15

Ala Met Gly Thr Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg Ile
           20           25           30

Arg Gly Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly Cys Ala
           35           40           45
    
```

10 <210> 51

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 51

```

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg
1           5           10           15

Ile Arg Gly Ala Gly Ala Ser Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly
           20           25           30
    
```

20

<210> 52

<211> 39

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

30 <400> 52

ES 2 639 838 T3

Gly Ala Met Gly Leu Thr Ala Ala Glu His Ala Lys Arg Ser Thr Leu  
1 5 10 15

Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly Gly  
20 25 30

Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
35

<210> 53

5 <211> 35

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 53

Leu Thr Ala Ala Glu His Ala Lys Arg Ser Thr Leu Thr Pro Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn  
20 25 30

Gly Phe Gly  
35

15

<210> 54

<211> 36

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 54

25

ES 2 639 838 T3

Leu Thr Ala Ala Glu His Ala Lys Arg Ser Thr Leu Thr Pro Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Gln Leu Ala Arg Arg Ile Glu Gly Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu  
20 25 30

Asn Gly Phe Gly  
35

<210> 55

<211> 36

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

10

<400> 55

Leu Thr Ala Ala Glu His Ala Lys Arg Ser Thr Leu Thr Pro Lys Glu  
1 5 10 15

Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Glu Gly Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu  
20 25 30

Asn Gly Phe Gly  
35

15 <210> 56

<211> 29

<212> PRT

<213> artificial

20 <220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 56

Gly Ala Met Gly Thr Arg Thr Pro Lys Glu Arg Arg Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

25

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

ES 2 639 838 T3

<210> 57

<211> 29

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

10 <400> 57

Gly Ala Met Gly Thr Arg Thr Pro Lys Glu Ala Arg Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 58

15 <211> 39

<212> PRT

<213> artificial

<220>

20 <223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4-péptido TAT-i42V

<400> 58

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ala Met Gly Thr Ile  
1 5 10 15

Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly Gly  
20 25 30

Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
35

25

<210> 59

<211> 44

<212> PRT

<213> artificial

30

ES 2 639 838 T3

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4-péptido RRP5-i42V

<400> 59

5

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Met Gly Thr Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg Ile  
20 25 30

Arg Gly Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
35 40

<210> 60

<211> 37

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido RRP5-i1

15

<400> 60

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Met Gly Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Arg Arg Ile  
20 25 30

Arg Gly Gly Cys Ala  
35

20

<210> 61

<211> 29

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

ES 2 639 838 T3

<400> 61

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Val Thr Tyr Asp Gly Phe Gly  
20 25

5 <210> 62

<211> 33

<212> PRT

<213> artificial

10 <220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 62

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg

15

1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly Ala Ser Thr  
20 25 30

Gly

<210> 63

20 <211> 34

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 63

ES 2 639 838 T3

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Ala Asn Phe Val Ser  
20 25 30

Thr Gly

<210> 64

<211> 40

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

10

<400> 64

Gly Ala Met Gly Arg Val Pro Pro Ala Val Arg Lys Leu Gly Asn Ser  
1 5 10 15

Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala Gly  
20 25 30

Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
35 40

15 <210> 65

<211> 41

<212> PRT

<213> artificial

20 <220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 65



ES 2 639 838 T3

Gly Ala Met Gly Arg Val Pro Pro Ala Val Arg Lys Leu Gly Asn Ala  
1 5 10 15

Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala  
20 25 30

Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
35 40

<210> 66

<211> 44

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4 - péptido RRP5-i5

10

<400> 66

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala  
20 25 30

Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly Gly Cys Ala  
35 40

15 <210> 67

<211> 41

<212> PRT

<213> artificial

20 <220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 67

ES 2 639 838 T3

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly Ala  
20 25 30

Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
35 40

<210> 68

<211> 26

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido i5 mut

10

<400> 68

Ala Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Ala Ala Arg Arg Ala Arg Gly  
1 5 10 15

Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Ala Gly  
20 25

15 <210> 69

<211> 44

<212> PRT

<213> artificial

20 <220>

<223> péptido (RRP) 5-i5 mutado

<400> 69

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Ala Ala Arg Arg Ala Arg Gly Ala  
20 25 30

Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Ala Gly Gly Cys Ala  
35 40

25

ES 2 639 838 T3

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> péptido i1

10 <400> 70

Gly Ala Met Gly Thr Ile Met Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly

<210> 71

15 <211> 19

<212> PRT

<213> artificial

<220>

20 <223> Fragmento H3 estabilizado

<400> 71

Gly Ala Met Gly Thr Ile Thr Pro Lys Glu Ala Gln Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly

25

<210> 72

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial

30

<220>

<223> Fragmento H3 estabilizado

<400> 72

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly

5

<210> 73

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

<400> 73

15

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 74

<211> 31

20

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido inhibidor entre Asf1 y H3-H4

25

<400> 74

Gly Ala Met Gly Thr Leu Thr Pro Lys Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Ile Arg Gly Ala Gly Ala Ser Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25 30

<210> 75

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido i5\_s3

<400> 75

10

Ala Ser Thr Glu Glu Lys Trp Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly  
 1                    5                    10                    15

Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
                   20                    25

<210> 76

<211> 26

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido i5\_D

20

<400> 76

Ala Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly  
 1                    5                    10                    15

Ala Gly Gly Val Thr Leu Asp Gly Phe Gly  
                   20                    25

25

<210> 77

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido i5\_loopR

ES 2 639 838 T3

<400> 77

Ala Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly  
1 5 10 15

Ala Gly Gly Arg Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

5 <210> 78

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptido i5\_loopA

<400> 78

Ala Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Arg Gly  
1 5 10 15

15 Ala Gly Gly Ala Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 79

<211> 26

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido i5\_Aloop

25 <400> 79

Ala Ser Thr Glu Arg Lys Trp Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ile Ala Gly  
1 5 10 15

Ala Gly Gly Val Thr Leu Asn Gly Phe Gly  
20 25

<210> 80

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido i6

<400> 80

Ala Ser Thr Glu Glu Lys Trp Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ile Ala Gly  
1 5 10 15

10 Ala Gly Gly Val Thr Leu Asp Gly Phe Gly  
20 25

<210> 81

<211> 41

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido RRP5-i6

20 <400> 81

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Thr Glu Glu Lys Trp Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ile Ala Gly Ala  
20 25 30

Gly Gly Val Thr Leu Asp Gly Phe Gly

35 40

25

<210> 82

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> E1-B-E2 de fórmula (X)

<220>

5 <221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (5)

<223> Xaa es consecutivamente X4 y X5 y es E o R

<220>

10 <221> MISC\_FEATURE

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa es X8 siendo E o R

<220>

15 <221> MISC\_FEATURE

<222> (15) .. (15)

<223> Xaa es X11 siendo R o A

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa es X12 siendo A o P

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa es X13 estando ausente o seleccionado entre los aminoácidos G, A y S

<220>

30 <221> MISC\_FEATURE

<222> (20) .. (20)

<223> Xaa es X14 estando ausente o siendo S

<220>

35 <221> MISC\_FEATURE

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa es X15 siendo R, V o A



<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22) .. (22)

5 <223> Xaa es X16 siendo T o V

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24) .. (24)

10 <223> Xaa es X18 siendo Y, N o D

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (26) .. (26)

15 <223> Xaa es X19 siendo F o M

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27) .. (27)

20 <223> Xaa es X20 siendo G, Q o N

<400> 82

Ala Ser Thr Xaa Xaa Lys Trp Ala Glu Leu Ala Xaa Arg Ile Xaa Gly  
1 5 10 15

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Gly Xaa Xaa  
20 25

**REIVINDICACIONES**

1. Molécula peptídica capaz de inhibir la formación del complejo entre Asf1 (Anti-Silencing Factor 1) y las histonas H3-H4 y que comprende los elementos E1-B-E2, en la que

a) E1 es un péptido de fórmula (I)

5  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-K-X_6-X_7-X_8-L-X_9-X_{10}-R-I-X_{11}$  (I)

en donde

a1) o bien (SEQ ID No 1)

$X_1$  y  $X_2$  están ausentes;

$X_3$  es I, R o L, preferiblemente I o L;

10  $X_4$  es T o M, preferiblemente T;

$X_5$  es P;

$X_6$  es E o D, preferiblemente D;

$X_7$  se selecciona entre el grupo que consiste en R, A, I y E, preferiblemente R, A y E;

$X_8$  se selecciona entre el grupo que consiste en R, Q y E;

15  $X_9$  es R o A;

$X_{10}$  es R; y

$X_{11}$  es R o E;

a2) o (SEQ ID No 2)

$X_1$ ,  $X_7$  y  $X_9$  son A;

20  $X_2$  es S;

$X_3$  es T;

$X_4$ ,  $X_5$  y  $X_8$  son E o R;

$X_6$  es W; y

$X_{10}$  es R;

25 y  $X_{11}$  es R o A;

b) B es un péptido de fórmula (II)

$G-X_{12}-G-X_{13}-X_{14}$  (II) (SEQ ID No 3)

en donde

$X_{12}$  es A o P;

30  $X_{13}$  está ausente o se selecciona entre los aminoácidos G, A y S;

$X_{14}$  está ausente o es S;

y

c) E2 es un péptido de fórmula (III)

$X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-G-X_{19}-X_{20}$  (III) (SEQ ID No 4)

35 en donde

$X_{15}$  es R, V o A;

$X_{16}$  es T o V;

X<sub>17</sub> es L;

X<sub>18</sub> es Y, N o D;

X<sub>19</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en F o M; y

X<sub>20</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en G, Q y N.

- 5 2. Molécula peptídica capaz de inhibir la formación del complejo entre Asf1 (Anti-Silencing Factor 1) y las histonas H3-H4 y que comprende los elementos E1-B-E2, en la que los elementos E1-B-E2 presentan una de las secuencias siguientes

X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-P-K-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-L-X<sub>9</sub>-R-R-I-X<sub>11</sub>-G-X<sub>12</sub>-G-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-L-X<sub>18</sub>-G-X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub> (VIII) (SEQ ID No 11)

en la que

10 X<sub>3</sub> es I, R o L, preferiblemente I o L;

X<sub>4</sub> es T o M, preferiblemente T;

X<sub>6</sub> es E o D, preferiblemente D;

X<sub>7</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en R, A, I y E, preferiblemente entre R, A y E;

X<sub>8</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en R, Q y E;

15 X<sub>9</sub> es R o A;

X<sub>11</sub> es R o E;

X<sub>12</sub> es A o P;

X<sub>13</sub> está ausente o se selecciona entre los aminoácidos G, A y S;

X<sub>14</sub> está ausente o es S;

20 X<sub>15</sub> es R o V;

X<sub>16</sub> es T o V;

X<sub>18</sub> es Y, N o D;

X<sub>19</sub> es F, M, A y Q, preferiblemente F o M, de manera incluso más preferida F; y

X<sub>20</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en G, Q y N;

25 A-S-T-X<sub>4</sub>-R-K-W-A-E-L-A-R-R-I-R-G-X<sub>12</sub>-G-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-L-X<sub>18</sub>-G-X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub> (IX) (SEQ ID No 12)

en la que

X<sub>4</sub> es E o R;

X<sub>12</sub> es A o P;

X<sub>13</sub> está ausente o se selecciona entre los aminoácidos G, A y S;

30 X<sub>14</sub> está ausente o es S;

X<sub>15</sub> es R o V;

X<sub>16</sub> es T o V;

X<sub>18</sub> es Y, N o D;

X<sub>19</sub> es F, M, A o Q, preferiblemente F o M, de manera incluso más preferida F; y

35 X<sub>20</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en G, Q y N,

A-S-T-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-K-W-A-E-L-A-X<sub>8</sub>-R-I-X<sub>11</sub>-G-X<sub>12</sub>-G-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-L-X<sub>18</sub>-G-X<sub>19</sub>-X<sub>20</sub> (XI) (SEQ ID No 82)

en la que

X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>8</sub> son E o R;

X<sub>11</sub> es R o A;

X<sub>12</sub> es A o P;

X<sub>13</sub> está ausente o se selecciona ente los aminoácidos G, A y S;

5 X<sub>14</sub> está ausente o es S;

X<sub>15</sub> es R, V o A;

X<sub>16</sub> es T o V;

X<sub>18</sub> es Y, N o D;

X<sub>19</sub> es F o M, preferiblemente F; y

10 X<sub>20</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en G, Q y N.

3. La molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que los elementos E1-B-E2 presentan una de las secuencias siguientes

IMPKDIQLARRIRGAGGRTLYGFG (SEQ ID No 13)

IMPKDIQLARRIRGAGASRTLYGFG (SEQ ID No 14)

15 ITPKEAQLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 15)

ITPKEAQLARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 16)

LTPKEAELARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 17)

LTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 18)

ITPKEAQLARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 19)

20 LTPKEAELARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 20)

ITPKEEQLRRRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 21)

ITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 22)

LTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 23)

LTPKEAELARRIRGAGRTLNGFG (SEQ ID No 24)

25 LTPKEAELARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 25)

LTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 26)

RTPKERRLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 27)

RTPKEARLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 28)

LTPKEAELARRIRGAGGVTYDGFG (SEQ ID No 29)

30 LTPKEAELARRIRGAGGVTLNGAN (SEQ ID No 30)

STERKWA ELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 31)

ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 32)

ASTRRKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 33)

ASTEELKWARLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 75)

35 ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNLDGFG (SEQ ID No 76)

ASTERKWAELARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 77)

ASTERKWAELARRIRGAGGATLNGFG (SEQ ID No 78)

ASTERKWAELARRIAGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 79)

ASTEELWARLARRIAGAGGVTLDGFG (SEQ ID No 80)

así como una secuencia que presenta 90 o 95% de identidad con las mismas.

5 4. La molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la molécula comprende además un péptido que facilita la penetración celular.

5. La molécula según la reivindicación 4, en la que el péptido que facilita la penetración celular es RRRRRRRRRR-  
RRRP (SEQ ID No 37).

6. La molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo o consistiendo la molécula en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en

10 GAMGTIMPKDIQLARRIRGAGGRTLYGFG (SEQ ID No 38)

GAMGTIMPKDIQLARRIRGAGASRTLYGFG (SEQ ID No 39)

GAMGTITPKEAQLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 40)

GAMGTITPKEAQLARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 41)

GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 42)

15 GAMGTLTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 43)

GAMGTITPKEAQLARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 44)

GAMGTLTPKEAELARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 45)

GAMGTITPKEEQLRRRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 46)

GAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 47)

20 GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 48)

GAMGTLTPKEAELARRIRGAGRTLNGFG (SEQ ID No 49)

GAMGTLTPKEAELARRIRGAGASRTLNGFG (SEQ ID No 51)

GAMGLTAAEHAKRSTLTPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 52)

LTAAEHAKRSTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 53)

25 LTAAEHAKRSTLTPKEAQLARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 54)

LTAAEHAKRSTLTPKEAELARRIEGAGASVTLNGFG (SEQ ID No 55)

GAMGTRTPKERRLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 56)

GAMGTRTPKEARLARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 57)

GRKKRRQRRRGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 58)

30 RRRRRRRRRRRRRPGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 59)

GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTYDGF (SEQ ID No 61)

GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGFGASTG (SEQ ID No 62)

GAMGTLTPKEAELARRIRGAGGVTLNGANFVSTG (SEQ ID No 63)

GAMGRVPPAVRKLGNSTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 64)

35 GAMGRVPPAVRKLGNASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 65)

ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 32)

ASTRRKWAELARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 33)

ASTEELWARLARRIRGAGGVTLNGFG (SEQ ID No 75)

ASTERKWAELARRIRGAGGVTLNDFG (SEQ ID No 76)

ASTERKWAELARRIRGAGGRTLNGFG (SEQ ID No 77)

ASTERKWAELARRIRGAGGATLNGFG (SEQ ID No 78)

ASTERKWAELARRIAGAGGVTLNDFG (SEQ ID No 79)

5 ASTEEKWARLARRIAGAGGVTLNDFG (SEQ ID No 80)

RRPRRRRRRRRRPASTERKWAELARRIRGAGGVTLNDFGGCA (SEQ ID No 66)

RRPRRRRRRRRRPASTERKWAELARRIRGAGGVTLNDFG (SEQ ID No 67)

RRPRRRRRRRRRRPGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNDFGGCA (SEQ ID No 50) y

RRPRRRRRRRRRRPASTEERWARLARRIAGAGGVTLNDFG (SEQ ID No 81)

10 así como una secuencia que presenta 90 o 95% de identidad con las mismas.

7. La molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo o consistiendo la molécula en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en

RRPRRRRRRRRRRPGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNDFG (SEQ ID No 59)

RRPRRRRRRRRRRRPASTERKWAELARRIRGAGGVTLNDFGGCA (SEQ ID No 66)

15 RRPRRRRRRRRRRRPASTERKWAELARRIRGAGGVTLNDFG (SEQ ID No 67)

RRPRRRRRRRRRRPGAMGTITPKEAQLARRIRGAGGVTLNDFGGCA (SEQ ID No 50) y

RRPRRRRRRRRRRRPASTEERWARLARRIAGAGGVTLNDFG (SEQ ID No 81).

8. La molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, como un medicamento.

9. Composición farmacéutica que comprende una molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

20 10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la composición comprende otro compuesto de interés terapéutico.

11. La molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en el tratamiento de un cáncer.

12. La molécula para uso según la reivindicación 11, en donde la molécula se utiliza en combinación con otro compuesto de interés terapéutico o con una radioterapia.

25

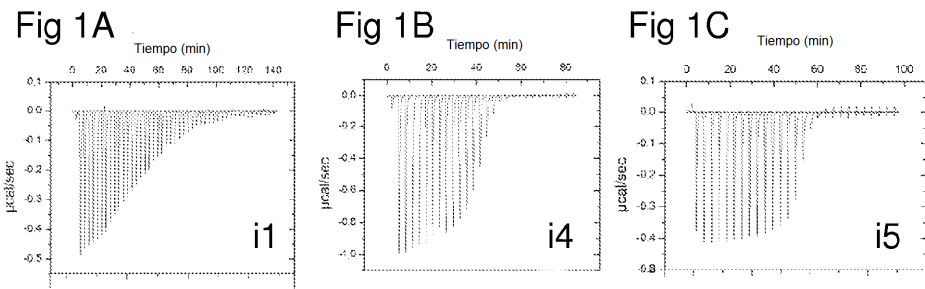


Figura 1

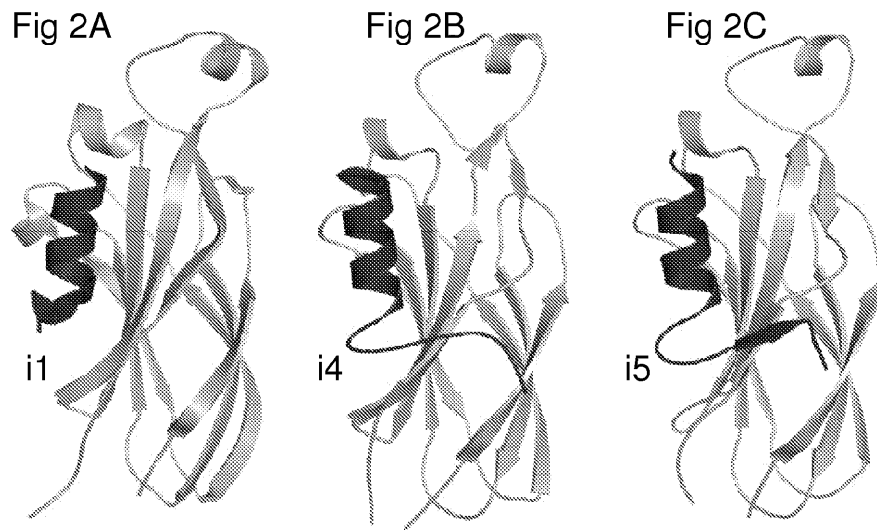


Figura 2

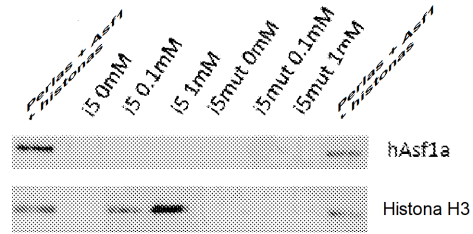


Figura 3

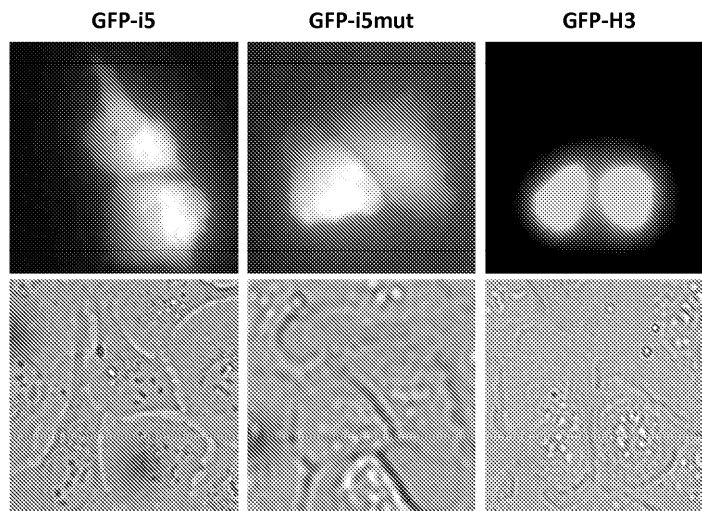


Figura 4A

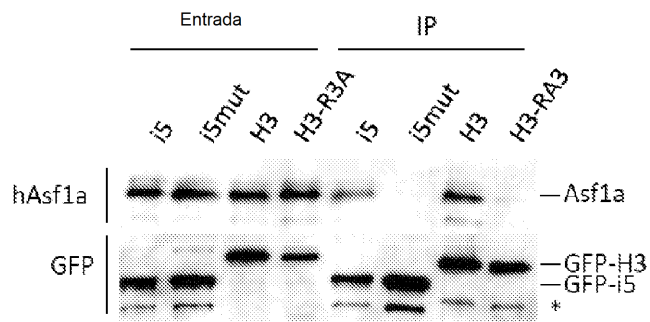


Figura 4B



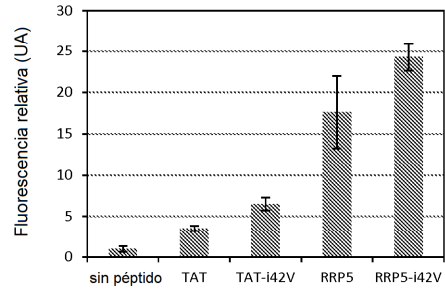


Figura 5

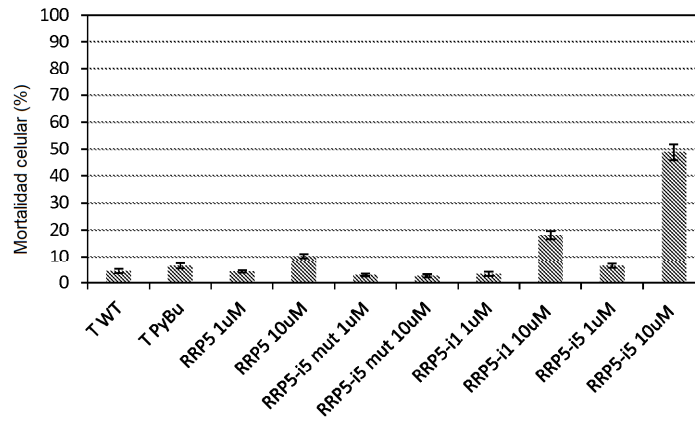


Figura 6

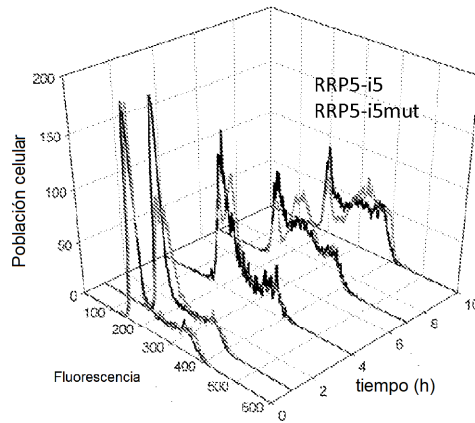


Figura 7

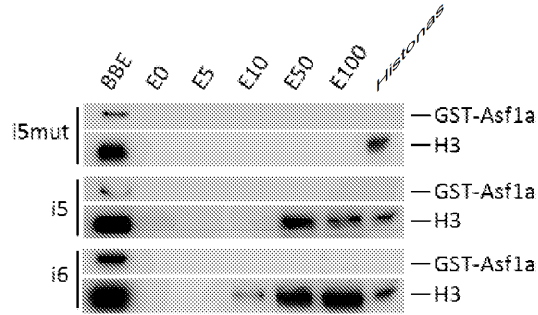


Figura 8

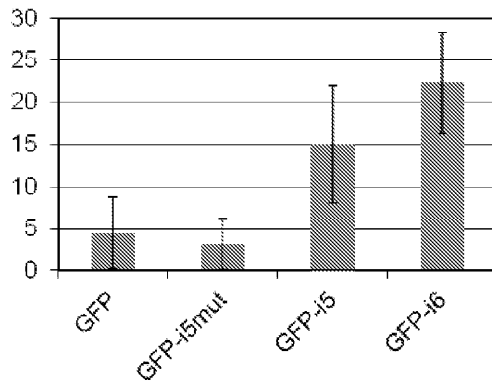


Figura 9

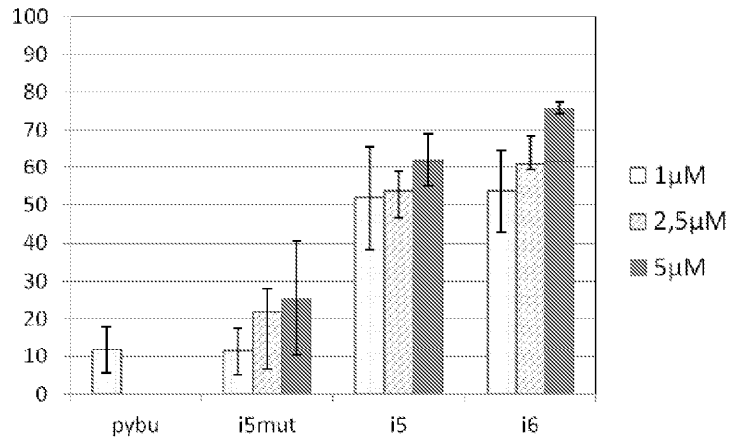


Figura 10