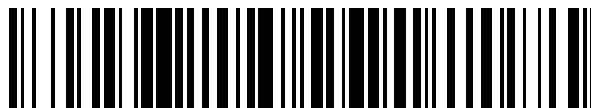


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 161**

21 Número de solicitud: 201700345

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

30.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.10.2018

71 Solicitantes:

**FUNDACION PARA LA INVESTIGACION
BIOMEDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA
PRINCESA (25.0%)
C/ Diego de León, 62 - 1ª Planta
28006 Madrid ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (75.0%)**

72 Inventor/es:

**YÁÑEZ-MÓ, María;
SUÁREZ MONTERO, Henar;
SÁNCHEZ MADRID, Francisco y
ROCHA-PERUGINI, Vera**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Uso de CD81 como diana terapéutica para regular los niveles intracelulares de dNTPS**

57 Resumen:

La presente invención pertenece al campo de la biomedicina, en particular se dirige al uso de agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante y a métodos de cribado para la identificación de dichos agentes. Finalmente, la presente invención proporciona terapias de combinación para el tratamiento del VIH.

ES 2 688 161 A2

DESCRIPCIÓN

**USO DE CD81 COMO DIANA TERAPÉUTICA PARA REGULAR LOS NIVELES
INTRACELULARES DE dNTPs****Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de la biomedicina, en particular se dirige al uso de agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante y a métodos de cribado para la identificación de dichos agentes.

Estado de la técnica

SAMHD1 es una desoxinucleósido trifosfato fosfohidrolasa (dNTPasa) de expresión ubicua que regula los niveles intracelulares de dNTP (Franzolin *et al.*, 2013, The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells, Proc Natl Acad Sci U S A, 110:14272-14277). La actividad de SAMHD1 limita, por ejemplo, la RT de HIV-1 RT en monocitos en reposo, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T CD4 (Ballana and Este, 2015, AMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction, Trends Microbiol. 23:680-692). Una elevada actividad de esta enzima (causada, por ejemplo, por un aumento en los niveles intracelulares de la misma) provoca una reducción de la concentración de dNTPs disponibles.

En el contexto específico de infección por HIV, en células provenientes del ratón deficiente para SAMHD1 se observó un aumento en la RT de HIV-1 y en las concentraciones intracelulares de dNTPs (Behrendt *et al.*, 2013, Mouse SAMHD1 has antiretroviral activity and suppresses a spontaneous cell-intrinsic antiviral response, Cell Rep. 4:689-696; Rehwinkel *et al.*, 2013, SAMHD1-dependent retroviral control and escape in mice, Embo J. 32:2454-2462). Bajos niveles de dNTP previenen la síntesis del DNA viral de doble cadena, bloqueando pasos posteriores en el ciclo viral (Baldauf *et al.*, 2012, SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells, Nat Med. 18:1682-1687; Lahouassa *et al.*, 2012, SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates, Nat Immunol. 13:223-228). En linfocitos T CD4+ activados la

expresión de SAMHD1 se reduce (Ruffin *et al.*, 2015, Low SAMHD1 expression following T-cell activation and proliferation renders CD4⁺ T cells susceptible to HIV-1, *Aids*, 29:519-530), y los altos niveles de dNTP permiten la infección viral (Baldauf *et al.*, 2012; Descours *et al.*, 2012, SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells, *Retrovirology*, 9:87).

5 Los mecanismos específicos de regulación de la actividad enzimática de SAMHD1 están por elucidar. En células en división que no presentan restricción a la infección por HIV-1, SAMHD1 es fosforilada en los residuos de treonina 592 (T592) por quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Cribier *et al.*, 2013, Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1, *Cell Rep.* 3:1036-1043; Welbourn *et al.*, 2013, Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1, *J Virol.* 87:11516-11524; White *et al.*, 2013, The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation, *Cell Host Microbe*, 13:441-451). Esta fosforilación se induce por las interleuquinas 2 (IL-2) y IL-7 en linfocitos T CD4⁺ (Coiras *et al.*, 2016, IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4⁺ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle, *Cell Rep.* 14:2100-2107). SAMHD1 además es una proteína de unión a ácidos nucleicos y presenta actividad exonucleasa *in vitro* frente a DNAs y RNAs de cadena sencilla (Beloglazova *et al.*, 2013, Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutieres syndrome and HIV-1 restriction, *J Biol Chem.* 288:8101-8110; Ryoo *et al.*, 2016, The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction, *Nat Med.* 20:936-941). Esta actividad RNasa, que también juega un papel en la restricción de la infección por HIV-1 (Choi *et al.*, 2015, SAMHD1 specifically restricts retroviruses through its RNase activity, *Retrovirology*, 12:46; Ryoo *et al.*, 2014, The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction, *Nat Med.* 20:936-941), tendría especificidad por dúplex DNA-RNA como los que ocurren durante la RT de HIV-1. Sin embargo, estudios recientes ponen en duda el requerimiento de la fosforilación en T592 para el control de las actividades nucleasas y fosfodihidrolasas (Antonucci *et al.*, 2016, SAMHD1-mediated HIV-1 restriction in cells does not involve ribonuclease activity, *Nature medicine*, 22:1072-1074; Bhattacharya *et al.*, 2016, Effects of T592 phosphomimetic mutations on tetramer stability and dNTPase activity of SAMHD1 cannot explain the retroviral restriction defect, *Scientific reports*, 6:31353; Ruiz *et al.*, 2015, Cyclin D3-dependent control of the dNTP pool and HIV-1 replication in human macrophages, *Cell Cycle*, 14:1657-1665; Tang *et al.*, 2015, Impaired dNTPase activity of SAMHD1 by phosphomimetic mutation of Thr-592, *J Biol Chem.* 290:26352-26359), sugiriendo mecanismos adicionales de regulación.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infecta fundamentalmente a linfocitos T CD4, monocitos y células dendríticas. Tras unión al receptor CD4 las glicoproteínas de la envuelta viral interactúan con una proteína correceptora, los receptores de quimioquinas CXCR4 o CCR5, que inducen cambios conformacionales que permiten la fusión entre las membranas virales y celulares (Blumenthal *et al.*, 2012, HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion, J Biol Chem. 287:40841-40849). La replicación de HIV-1 requiere un paso de transcripción reversa (RT) y la inserción del DNA viral en el genoma del huésped. Sin embargo, la secuenciación temporal de estos eventos todavía no está completamente definida. El desensamblaje de la partícula viral puede ocurrir en la membrana plasmática, justo después de la fusión, induciendo la RT, siendo posteriormente el complejo de pre-integración (PIC) activamente transportado al núcleo (Ambrose, Z., and C. Aiken, 2014, HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins, Virology, 454-455:371-379.; Arhel, N. 2010, Revisiting HIV-1 uncoating, Retrovirology, 7:96.; Warrilow *et al.*, 2009, Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together, Rev Med Virol. 19:324-337).

Alternativamente, la cápsida viral podría ser transportada a la región perinuclear, produciéndose el desensamblaje y la RT de forma gradual (Ambrose and Aiken, 2014; Arhel, 2010; Hu, W.S., and S.H. Hughes, 2012, HIV-1 reverse transcription, Cold Spring Harb Perspect Med. 2; Warrilow *et al.*, 2009). Un tercer modelo propone que, tras la fusión, la cápsida viral permanecería intacta y la RT ocurriría durante el transporte, siendo completada en el poro nuclear, justo antes de que el PIC se transfiera al núcleo (Ambrose and Aiken, 2014; Arhel, 2010; Hu and Hughes, 2012).

Numerosas moléculas de la célula, incluyendo las tetraspaninas, regulan la infección por HIV-1 (Rocha-Perugini *et al.*, 2014, PIP: choreographer of actin-adaptor proteins in the HIV-1 dance, Trends Microbiol. 22:379-388; Thali, M. 2009, The roles of tetraspanins in HIV-1 replication, Curr Top Microbiol Immunol. 339:85-102). Las tetraspaninas establecen interacciones homotípicas con otras tetraspaninas, así como con receptores transmembrana, lípidos y proteínas intracelulares, organizando complejos multimoleculares en la membrana denominados microdominios enriquecidos en tetraspaninas (TEMs) (Charrin *et al.*, 2014, Tetraspanins at a glance, J Cell Sci. 127:3641-3648; Yanez-Mo *et al.*, 2009, Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes, Trends in cell biology, 19:434-446). A través de los TEMs, las tetraspaninas modulan la función de sus moléculas asociadas, jugando un importante

papel en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la inmunidad y las infecciones virales (Levy and Shoham, 2005, The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes, *Nat Rev Immunol.* 5:136-148; Rocha-Perugini *et al.*, 2015, Function and Dynamics of Tetraspanins during Antigen Recognition and Immunological Synapse Formation, *Front Immunol.* 6:653; van Spriel and Figdor, 2010, The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases, *Microbes Infect.* 12:106-112). Las tetraspanins CD9 y CD81 regulan negativamente la fusión de membranas inducida por HIV-1 (Gordon-Alonso *et al.*, 2006, Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion, *J Immunol.* 177:5129-5137), y un mutante de delección del dominio *N*-terminal de la tetraspanina CD63 bloquea la entrada de HIV impidiendo la expresión en la superficie celular de CXCR4 (Yoshida *et al.*, 2008, A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane, *Traffic*, 9:540-558). CD63 también es importante para la RT viral (Fu *et al.*, 2015, Tetraspanin CD63 is a regulator of HIV-1 replication, *Int J Clin Exp Pathol.* 8:1184-1198; Li *et al.*, 2011, A post-entry role for CD63 in early HIV-1 replication, *Virology*, 412:315-324). El ensamblaje de virus de HIV-1 ocurre preferentemente en TEMs (Ono, 2010, Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly, *Biol Cell.* 102:335-350), aunque el papel de las tetraspaninas como co-factores de liberación no ha sido todavía bien establecido (Thali, 2011, Tetraspanin functions during HIV-1 and influenza virus replication, *Biochem Soc Trans.* 39:529-531).

El uso de medicamentos contra el VIH para el tratamiento de la infección por el VIH se conoce como tratamiento antirretroviral (TAR). Los medicamentos contra el VIH están agrupados en seis clases, dependiendo de cómo combaten dicha infección. Las seis clases son:

- Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINN)
- Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIN)
- Inhibidor de la proteasa (IP)
- Inhibidores de la fusión
- Antagonistas de los receptores CCR5 (conocidos también como inhibidores de la entrada)
- Inhibidor de la transferencia de cadenas de la integrasa (INSTI, por sus siglas en inglés)

En general, un primer régimen de tratamiento de la infección por el VIH para un adulto o un adolescente incluye dos ITIN junto con un INSTI, un ITINN o un IP administrados con un

refuerzo de cobicistat o de ritonavir. Tanto el cobicistat como el ritonavir aumentan (refuerzan) la eficacia del IP. Sin embargo, a medida que el VIH se reproduce, puede sufrir mutaciones y volverse resistente a los medicamentos contra el VIH. La resistencia a los medicamentos puede hacer que falle el tratamiento contra el VIH (información obtenida de <https://infosida.nih.gov>).

5 Por lo tanto, son necesarios nuevos métodos tanto para el tratamiento/prevención de la infección causada por VIH como para el tratamiento y/o prevención de enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante, así como métodos de cribado para la identificación de agentes (compuestos) útiles en dichos métodos de tratamiento y/o prevención.

10 **Breve descripción de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 en la elaboración
15 de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona métodos de cribado para identificar agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima
20 SAMHD1 que comprenden las etapas de:

- a) Seleccionar agentes candidatos, preferiblemente a partir de una librería de compuestos;
- b) Determinar si alguno de dichos agentes es capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 en células que expresan ambas proteínas;
- 25 c) Seleccionar aquellos agentes que promueven la reducción/inhibición descrita en el paso b); y,
- d) Opcionalmente, producir aquellos agentes seleccionados en el paso c).

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una combinación de medicamentos o terapia de combinación para el tratamiento del VIH que comprende al menos tres
30 medicamentos seleccionados de por lo menos dos clases diferentes de medicamentos para tratar el VIH, caracterizado porque la combinación comprende al menos un medicamento perteneciente a la clase de medicamentos inhibidores de la transcriptasa inversa análogo de los

nucleósidos, en el que dicho medicamento es un agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1.

Breve descripción de las figuras

5

Figura 1. El dominio C-terminal de CD81 media su asociación con SAMHD1. A) Western-blot de SAMHD1 de lisados de linfocitos T primarios humanos precipitados con péptidos biotinilados formados por la secuencia C-terminal de las tetraspaninas CD81, CD9 y CD151. Se muestran los resultados para el control negativo de sefarsa desnuda y el lisado total. B) 10 Lisados de linfocitos T primarios humanos fueron inmunoprecipitados con anticuerpos frente a SAMHD1 y CD81. Las membranas se analizaron para SAMHD1 y CD81. Se muestran los resultados de las microesferas control incubadas con el lisado celular y el lisado celular completo. C) Células Hela/R5 (paneles superiores) o linfoblastos T (imágenes inferiores) fueron sembrados en cubreobjetos recubiertos con PLL, fijados, permeabilizados e inmunomarcados 15 para CD81 y SAMHD1 y analizados por microscopía confocal. Se muestra un único plano confocal. Barra=10µm D) Células Hela/R5 transfectadas con siARN control (siControl) o siARN de CD81 (siCD81) fueron sembradas durante 2h en cubreobjetos cubiertos con PLL (10µg/ml), o anticuerpos monoclonales anti-CD9 (VJ1/20, 10µg/ml), anti-CD4 (HP2/6, 10µg/ml) o anti-CD81 (5A6, 10µg/ml), fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas para SAMHD1 (anticuerpo 20 policlonal) y analizadas por microscopía confocal. Las imágenes muestran un único plano confocal en posición ventral, barra=10 µm. Los gráficos muestran las cuantificaciones del número de agregados observados (agregados/célula) los datos son la media ± EEM de 50 células procedentes de 3 experimentos independientes analizados por ANOVA post-test de Tukey. E) Linfoblastos T primarios sembrados en cubreobjetos cubiertos con PLL se marcaron 25 con anticuerpos frente a SAMHD1 y CD81 siguiendo las instrucciones del fabricante del kit Duo/link. La cotinción con SAMHD1 y CD147 se utilizó como control negativo, y la de CD81/ERM como control positivo, barra=10µm. Las gráficas muestran el número de puntos positivos por célula; cada punto en la gráfica representa una célula individual, la barra representa la media del gráfico de dispersión, los valores obtenidos fueron analizados mediante 30 ANOVA y post-test de Dunns.

Figura 2. La expresión de CD81 regula la transcripción reversa del virus VIH-1 X5-trópico

A) Evolución temporal de la RT de VIH-1 medida por PCR cuantitativa de los productos

tempranos (gráficas a la izquierda para cada tipo de virus) o tardíos (gráficas a la derecha para cada tipo de virus) a 24 o 48 horas post-infección. Células Hela/R5 que expresan GFP (negro), CD81GFP (línea punteada) o CD81 Δ cytGFP (gris) fueron infectadas con el virus R5-trópico VIH-1 BaL o con VSV-G-VIH. Los valores indican la inducción media $\pm$ EEM calculada a partir de 4 experimentos independientes realizados por triplicado. B) Células Hela/R5 transfectadas con siARN control (gráficos superiores, negro) siARN CD81 (paneles superiores, gris) o con CRISPR/Cas9-CD81 (paneles inferiores, gris) o células no transfectadas (paneles inferiores, negro) fueron infectadas y analizadas al igual que en a. Los valores indican la inducción media calculada a partir de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. En cada caso la primera gráfica de la izquierda se corresponde a los productos tempranos y la de la derecha a los tardíos. C) Células Hela/R5 pretratadas durante 5 días con péptidos citopermeables constituidos por la secuencia de la región C-terminal de CD81 (CD81pept, gris) o una versión desordenada (scramble, negro) a una concentración de 2 μ M fueron infectados y analizados como en a. Los valores de a-c fueron analizados mediante ANOVA y post-test de Bonferroni.

Figura 3. CD81 regula la transcripción reversa del virus X4- trópico VIH-1 en linfoblastos T primarios humanos.

A) Linfoblastos T primarios fueron tratados previamente con el péptido control (scramble, negro) o CD81pept (gris) a una concentración de 2 μ M durante 5 días, y posteriormente fueron infectados con la cepa de VIH-1 X4-trópica NL4-3 (gráficas superiores) o VSV-G-VIH (gráficas inferiores). Los productos tempranos (izquierda) y tardíos (derecha) procedentes de la RT del virus HIV-1 fueron analizados por PCR cuantitativa a 24 y 48 horas post-infección. Los valores indican la inducción media $\pm$ EEM de dos experimentos independientes realizados por triplicado, analizados mediante ANOVA y post-test de Bonferroni. B) Linfoblastos T primarios transfectados con siARN control (negro) o siARN CD81 (gris) fueron infectados con la cepa de VIH-1 X4-trópica NL4-3 y la RT viral fue medida al igual que en A. Los datos proceden de un experimento representativo de dos. En el recuadro se muestra el Western-blot obtenido a partir de los lisados totales de los linfoblastos T utilizados en dicho experimento. ERM fue empleado como control de carga.

Figura 4. CD81 regula negativamente la actividad dNTPasa de SAMHD1. A) Células T Jurkat J77 transfectadas con siARN control (negro) o frente a CD81 (gris) fueron infectadas con la cepa viral VIH-1 NL4-3, y los productos tempranos de la RT fueron medidos por qPCR a los tiempos indicados. Los valores representan la inducción media $\pm$ EEM de dos experimentos

independientes realizados por triplicado. B) Células T Jurkat J77 pretratadas con una concentración 2 μ M de péptido control (negro) o CD81pept (gris) durante 5 días fueron infectadas con la cepa viral VIH-1 NL4-3, y la RT del virus se analizó de la misma forma que en A. C) El contenido de dNTP fue medido mediante un ensayo basado en la RT del VIH en células Hela/R5, Hela/R5 CRISPR/Cas9-CD81 (gráfica izquierda), y linfoblastos T primarios humanos transfectados con siARN control o frente a CD81 (gráfica derecha). Los valores representan la inducción media $\pm$ EEM de 4 (Hela/R5) o 2 (linfoblastos T) experimentos independientes analizados mediante t de Student pareada. D) Contenido de dNTP en células Hela/R5 que sobreexpresan GFP, CD81GFP o CD81 Δ cytGFP. Los valores representan la inducción media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes analizados mediante ANOVA con post-test de Tukey.

Figura 5. CD81 regula la expresión de SAMHD1. A) Linfoblastos T primarios humanos fueron transfectados con siARN control o frente a CD81, y células Hela/R5 se transfectaron o no con CRISPR/Cas9-CD81. Las células fueron lisadas y analizadas para CD81, SAMHD1 y la forma fosforilada de SAMHD1 por Western-blot. Tubulina y cofilina fueron usadas como controles de carga. Las membranas proceden de un experimento representativo de dos (Blastos, izquierda) y tres (Hela/R5, derecha); los números debajo de cada membrana indica la relación de la señal entre CD81, SAMHD1 y la forma fosforilada de SAMHD1 con respecto a su control de carga. B) Células Hela/R5 transfectadas con CRISPR/Cas9-CD81 (línea gris) o sin tratar (línea negra) fueron fijadas, permeabilizadas, inmunomarcadas para SAMHD1 y CD81, y analizadas por citometría de flujo. Los histogramas muestran un experimento representativo de 3. El control negativo corresponde a células marcadas únicamente con el anticuerpo secundario. C-D) células en las que se ha eliminado CD81 (CRISPR/Cas9-CD81) o Hela/R5 control fueron tratados con el vehículo (control) o con las concentraciones indicadas de C) MG132 o D) NH4Cl durante 6 horas. Las células fueron lisadas y analizadas por Western-blot para SAMHD1 y ERM como control de carga. Las gráficas muestran la relación entre la señal de SAMHD1 y ERM como inducción media $\pm$ EEM de c) 3 o d) 2 experimentos independientes analizados por ANOVA con post-test de Bonferroni.

Figura 6. SAMHD1 está parcialmente enriquecido en endosomas tempranos. A) Células Hela/R5 fueron transfectadas con siARN control o frente a CD81, y se dejaron adherir a cubreobjetos recubiertos de fibronectina (FN) durante 4 horas, se fijaron, permeabilizaron, se

inmunomarcaron para SAMHD1 y se analizaron por microscopía confocal. Las imágenes muestran un solo plano confocal, las flechas muestran la acumulación de SAMHD1 en estructuras intracelulares con morfología circular, barras=10µm. Los gráficos muestran la cuantificación del número (estructuras/célula, gráficas superiores) y el área (µm²/cell, gráficas inferiores) de las estructuras citoplasmáticas observadas. Los datos representan la media ± EEM de 230 células (n=4 experimentos independientes) analizados mediante t-Student. B) Células Hela/R5 fueron tratadas con una concentración 2µM de péptido control o CD81pept y analizadas de la misma forma que en A (n=400 células de 4 experimentos independientes), t-Student. C) Células Hela/R5 fueron transfectadas con GFP, CD81GFP o CD81ΔcytGFP, y analizadas como en A. Los datos representan la media ± EEM de 20 células (n=2 experimentos independientes) analizados mediante ANOVA con post-test de Tukey D) Se permitió la adhesión de células Hela/R5 transfectadas con siARN control o frente a CD81 durante 4h a cubreobjetos cubiertos con fibronectina. Las muestras se fijaron, permeabilizaron, inmunomarcaron y analizaron por microscopía confocal. Las imágenes muestran SAMHD1, EEA1, LAMP1, y la co-localización de SAMHD1/EEA1. Se muestra un único plano confocal, barras=10µm. Las gráficas representan la co-localización entre SAMHD1-EEA1 cuantificada en grupos de imágenes 3D de microscopía confocal. En el gráfico superior, el coeficiente de Pearson; en el gráfico inferior % de la señal de SAMHD1 que colocaliza con EEA1 con respecto a la señal de SAMHD1 en la totalidad de la célula. Los datos representan la media ± EEM de 3 experimentos independientes (n= 200 células) analizada por t-Student.

Figure 7. A) Células T Jurkat J77 fueron fijadas, permeabilizadas, inmunomarcadas para SAMHD1 y analizadas por citometría de flujo. Para el control negativo se marcaron únicamente con anticuerpo secundario. B) Células Hela/R5 fueron transfectadas con siRNA frente a CD81 (siCD81) o control (siControl) (panel izquierdo); o con CRISPR/Cas9-CD81 o sin transfectar (panel central). Las células se lisaron y analizaron para CD81, y para tubulina o p150glued como controles de carga. En las imágenes se muestran las membranas representativas. Los valores bajo los western-blot representan el valor del ratio entre la señal de CD81/tubulina obtenido en los experimentos con siRNA. Células T Jurkat J77 fueron transfectadas con siRNA frente a CD81 (siCD81) o siRNA control (siControl), y se analizaron como las Hela (panel derecho). C) Células Hela/R5 tratadas con el siRNA control (negro) o de CD81 (blanco) fueron inmunomarcadas para CD4, CCR5 y diversas tetraspaninas y analizadas mediante citometría de flujo. Los gráficos representan indican la inducción media ± EEM de 4 experimentos

independientes. Las diferencias no son significativas. D) Células Hela/R5 tratadas o no con CRISPR/Cas9-CD81, fueron analizadas como se describe en C).

Figura 8. A) Células Hela/R5 fueron transfectadas con siRNA control o frente a CD81, o tratadas con una concentración 2 μ M de péptido scramble o CD81, y se sembraron en cubreobjetos tratados con fibronectina durante 2h. Tras esto fueron fijadas, permeabilizadas, inmunomarcadas para SAMHD1 y analizadas por microscopía confocal. Los gráficos muestran la cuantificación del número (cuentas/célula, gráficas superiores) y el área (μm^2 / célula, gráficas inferiores) de las estructuras con forma circular observadas en el citoplasma. Los valores representan la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes (n=60 células en los experimentos de siRNA, y n=100 en los experimentos de tratamiento con los péptidos). Los datos se analizaron mediante t-Student, * $p<0.05$, ** $p<0.01$. B) Células Hela/R5 tratadas con siRNA o con los péptidos fueron sembradas durante 18 horas en cubreobjetos tratados con fibronectina, y analizados como se hizo en A. Los valores representan la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes (n=90 células en los experimentos de siRNA, y n=20 células en los experimentos con los péptidos). Los datos fueron analizados mediante el test t-Student * $p<0.05$, ** $p<0.01$. C) Células Hela/R5 fueron transfectadas con GFP, CD81GFP o CD81/cytGFP, se adhirieron durante 2 h en cristales cubiertos con fibronectina y se analizaron al igual que en a (cuentas/célula, gráfica izquierda) y el área (μm^2 /célula, gráfica derecha). Los datos son la media $\pm$ EEM de dos experimentos independientes (n=40 células) analizado mediante ANOVA de una vía y test de Tukey's.

Figura 9. A-B) Células Hela/R5 transfectadas con siARN se adhirieron durante 4 h en cubreobjetos cubiertos con fibronectina, fijadas, permeabilizadas, inmunomarcadas y analizadas por microscopía confocal. Las imágenes muestran SAMHD1 y (A) HGS/HRS o (B) CD63. Se muestra un único plano confocal, barras=10 μ m.

Descripción detallada de la invención

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debería entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, solamente se proporcionan a modo de ilustración, dado que diversos cambios y modificaciones dentro del

espíritu y alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la presente descripción detallada.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

Como se usa en el presente documento, los términos "*expresar*", "*que expresa*" y "*expresión*" se refieren a que permiten o hacen que la información en un gen o secuencia de ADN se llegue a manifestar, por ejemplo mediante la producción de una proteína mediante activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y la traducción de un gen o secuencia de ADN correspondientes. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula hospedadora para formar un "*producto de expresión*" tal como una proteína. También se puede decir que el producto de expresión por sí mismo, por ejemplo, la proteína resultante, es "*expresado*" o "*producido*" por la célula hospedadora.

El término "*expresión génica*" se refiere al proceso por el cual los ácidos nucleicos de un gen se utilizan para dirigir la transcripción resultando en la síntesis de proteínas. El proceso de expresión génica comprende 2 pasos principales:

- 1) La transcripción: la producción de ARN mensajero (ARNm) por una ARN polimerasa utilizando la secuencia de ADN como molde. Esta etapa continúa con el procesado o maduración de la resultante molécula de ARNm.
- 2) La traducción: el uso de ARNm para dirigir la síntesis de proteína. Después de esta segunda etapa pueden producirse modificaciones post-traduccionales de la proteína.

En el contexto de la presente invención, "*ARN de interferencia (ARNi)*" se entiende como una molécula de ARN que suprime la expresión de genes específicos mediante mecanismos conocidos globalmente como ribointerferencia o interferencia por ARN. Los ARN interferentes son moléculas pequeñas (de 20 a 25 nucleótidos) que se generan por fragmentación de precursores más largos. Los ARNi comprenden los siguientes grupos de moléculas:

- *ARN de interferencia pequeño* (o siRNA del inglés "*small interfering RNA*") son moléculas de ARN bicatenario perfectamente complementarias de aproximadamente 20

ó 21 nucleótidos (nt) con 2 nucleótidos desemparejados en cada extremo 3'. Cada hebra de ARN tiene un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo (-OH) 3'. Esta estructura proviene del procesamiento llevado a cabo por Dicer, una enzima que corta moléculas largas de ARN bicatenario (dsRNA, double stranded RNA) en varios siRNAs. Una de las hebras del siRNA (la hebra 'antisentido') se ensambla en un complejo proteico denominado RISC (RNA-induced silencing complex), que utiliza la hebra de siRNA como guía para identificar el ARN mensajero complementario. El complejo RISC cataliza el corte del ARNm complementario en dos mitades, que son degradadas por la maquinaria celular, bloqueando así la expresión del gen. Los siRNA pueden ser también introducidos de forma exógena en las células utilizando métodos de transfección basándose en la secuencia complementaria de un gen en particular, con la finalidad de reducir significativamente su expresión.

- *miARN* (o miRNA del inglés “*micro-RNA*”) son pequeños ARNs interferentes que se generan a partir de precursores específicos codificados en el genoma, que al transcribirse se pliegan en horquillas (hairpins) intramoleculares que contienen segmentos de complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en dos etapas, catalizado por dos enzimas, Drosha en el núcleo y Dicer en el citoplasma. Una de las hebras del miRNA (la hebra 'antisentido'), como ocurre con los siRNA, se incorpora a un complejo similar al RISC (del inglés “*RNA-induced silencing complex*”). Dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con el ARNm, los miRNAs pueden bien inhibir la traducción del ARNm o bien inducir su degradación. Sin embargo, a diferencia con la vía de los siRNA, la degradación de ARNm mediada por miRNA se inicia con la eliminación enzimática de la cola de poli(A) del ARNm.

En el contexto de la presente invención, el término “*oligonucleótido antisentido de ARN*” se refiere a una cadena simple de ARN que es complementaria a una secuencia específica. Esta secuencia de ARN antisentido hibrida con un determinado ARNm inhibiendo así su traducción, ya que la traducción del ARNm requiere una cadena simple de ARN. De este modo, el oligonucleótido antisentido de ARN inhibe la síntesis de una proteína determinada. Por otro lado, la ARNasa H degrada complejos de ARN-ADN, de modo que la hibridación del

oligonucleótido antisentido de ARN a una secuencia específica de ADN también provocará la degradación de dicha secuencia de ADN.

En el contexto de la presente invención, el término “*vector*” se refiere a un pequeño fragmento de ADN, obtenido de un virus, de un plásmido, o de una célula de un organismo superior en el que se pueden insertar fragmentos genéticos heterólogos y que se usan habitualmente para transportar de manera artificial este material genético heterólogo a otra célula, donde puede replicarse, expresarse y/o insertarse en el genoma de la célula huésped. En general, el vector mismo es una secuencia de ADN que consiste en un transgen y en una secuencia más larga que sirve de “*esqueleto*” del vector. Puede ser de simple o de doble cadena. Opcionalmente, puede estar formado, o comprender, ácidos nucleicos modificados, como por ejemplo metilfosfato o cadenas principales de fosforotioato.

Tal como se usa en el presente documento, el término “*aproximadamente*” significa el valor indicado $\pm 1\%$ de su valor, o el término “*aproximadamente*” significa el valor indicado $\pm 2\%$ de su valor, o el término “*aproximadamente*” significa el valor indicado $\pm 5\%$ de su valor, el término “*aproximadamente*” significa el valor indicado $\pm 10\%$ de su valor, o el término “*aproximadamente*” significa el valor indicado $\pm 20\%$ de su valor, o el término “*aproximadamente*” significa el valor indicado $\pm 30\%$ de su valor; preferentemente el término “*aproximadamente*” significa exactamente el valor indicado ($\pm 0\%$).

Los términos “*tratamiento*” o “*terapia*” abarcan tanto métodos profilácticos como métodos curativos de una enfermedad o dolencia, ya que ambos están dirigidos al mantenimiento o la restauración de la salud. Independientemente del origen del dolor, malestar o incapacidad, su mejora, mediante la administración de un agente apropiado, debe interpretarse como terapia o uso terapéutico en el contexto de la presente solicitud.

El término “*reducción*” o “*reducir*” o “*inhibir*” o “*inhibición*” se refiere a reducciones por debajo del nivel basal. Por ejemplo, los niveles basales son normales en los niveles *in vivo* antes de, o en ausencia de, un agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el suceso o circunstancia descrito posteriormente puede o no ocurrir, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no.

5 El término "*terapia de combinación*" o "*combinación de medicamentos*" significa la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico descrito en la presente descripción. Dicha administración abarca la co-administración de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una sola cápsula que tiene una relación fija de ingredientes activos o en múltiples
10 cápsulas separadas para cada ingrediente activo. Además, tal administración también abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico de una manera secuencial. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de compuestos en el tratamiento de las afecciones o trastornos descritos en la presente descripción.

15 La frase "*terapéuticamente eficaz*" pretende calificar la cantidad de ingredientes activos utilizados en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Esta cantidad será la necesaria para lograr el objetivo de reducir o eliminar dicha enfermedad o trastorno.

20 Como se usa aquí, los términos "*prevenir*", "*previniendo*" y "*prevención*" se refieren a los métodos para evitar o impedir el desarrollo de una enfermedad o trastorno o retardar la recurrencia o la aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto resultante de la administración de un agente profiláctico.

25 La tetraspanina CD81 (en humanos, Gene ID: 975, actualizado el 5-Feb-2017; UniProtKB – P60033) regula la disponibilidad de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) a través de su asociación directa con la enzima celular SAMHD1 y la regulación de su expresión, y por lo tanto su actividad dNTPasa. Una reducción/inhibición de la interacción entre la tetraspanina CD81 y la enzima celular SAMHD1 (en humanos, Gene ID: 25939, actualizado el 5-Feb-2017; UniProtKB – Q9Y3Z3) reduce la disponibilidad de dNTPs, ya que esta reducción/inhibición de la
30 interacción entre CD81 y SAMHD1 provoca un aumento en los niveles intracelulares de SAMHD1, y por lo tanto un aumento en los niveles de actividad dNTPasa, lo que conlleva a una reducción de los niveles de dNTPs disponibles. La reducción/inhibición de la interacción entre CD81 y SAMHD1 incrementa los niveles basales de la enzima SAMHD1; en ausencia de

interacción con CD81, SAMHD1 queda retenida en los endosomas tempranos, por lo que se previene su degradación por proteosoma.

5 La reducción/inhibición de la interacción entre la tetraspanina CD81 y la enzima celular SAMHD1 puede lograrse por medios directos, es decir, una disrupción física de esta interacción (ej., mediante péptidos, pequeñas moléculas o anticuerpos que bloquean específicamente la interacción entre CD81 y SAMHD1) o por medios indirectos, es decir, una reducción en los niveles de expresión de CD81 (ej., mediante ARNs pequeños de interferencia (ARNip), micro ARNs (miARN), shARNs, vectores para terapia génica, como por ejemplo vectores para terapia
10 génica que comprenden el sistema CRISP/Cas9).

Esta reducción/inhibición de la interacción entre la tetraspanina CD81 y la enzima celular SAMHD1, ya sea de manera directa o indirecta, tiene relevancia en el tratamiento de enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante, como por ejemplo infecciones
15 causadas por retrovirus, infecciones causadas por virus DNA y por virus DNA que tienen en su ciclo viral pasos de retrotranscripción, y síndrome de Aicardi – Goutières. En particular, la reducción/inhibición de la interacción entre la tetraspanina CD81 y la enzima celular SAMHD1 es relevante en la replicación temprana del virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1 o, por sus siglas en inglés, HIV-1), ya que la actividad dNTPasa de la enzima SAMHD1 reduce la
20 cantidad de dNTPs disponibles para la síntesis de cDNA de la transcriptasa inversa viral del VIH, previniendo de esta manera la replicación del virus.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 en la
25 elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante. Por lo tanto, la presente invención proporciona agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 para su uso en medicina, en particular en métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante. Tal y como se ha indicado anteriormente, la
30 reducción/inhibición de la interacción entre la tetraspanina CD81 y la enzima celular SAMHD1 puede lograrse por medios directos, es decir, una disrupción física de esta interacción (ej., mediante péptidos, pequeñas moléculas o anticuerpos que bloquean específicamente la interacción entre CD81 y SAMHD1) o por medios indirectos, es decir, una reducción en los

niveles de expresión de CD81 (ej., mediante ARNs pequeños de interferencia (ARNip), micro ARNs (miARN), shARNs, vectores para terapia génica, como por ejemplo vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISP/Cas9.

- 5 Preferiblemente, las enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante se seleccionan de entre el grupo que consiste en infecciones causadas por retrovirus, infecciones causadas por virus DNA y por virus DNA que tienen en su ciclo viral pasos de retrotranscripción, y síndrome de Aicardi – Goutières.
- 10 La persona experta en la materia conoce las infecciones causadas por retrovirus. Los retrovirus son virus con genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva que se replican a través de una forma intermedia de ADN bicatenario. Este proceso se lleva a cabo mediante una enzima, la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa (RT), que dirige la síntesis de ADN a través de ARN. Una vez que se ha pasado de ARN monocatenario a ADN, este ADN se inserta dentro del
15 ADN propio de la célula infectada donde se comporta como un gen más.

Existen 4 retrovirus humanos identificados: el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), el de tipo 2 (VIH-2) y los virus linfotrópicos de células T humanos de tipo I y II (HTLV-I y HTLV-II). Todos se hospedan en los linfocitos T. Los virus de la inmunodeficiencia humana
20 inducen una respuesta inmune que produce la lisis de las células infectadas provocando una severa inmunodepresión. Los virus HTLV/ II producen la inmortalización de los linfocitos infectados, generando una replicación descontrolada de los mismo, y por lo tanto una linfoproliferación.

- 25 La transcriptasa inversa, transcriptasa reversa o retrotranscriptasa (RT) es una enzima de tipo ADN-polimerasa, que tiene como función sintetizar ADN de doble cadena utilizando como molde ARN monocatenario, es decir, catalizar la retrotranscripción o transcripción inversa.

En una realización preferida, las infecciones causadas por los retrovirus son causadas por uno
30 o más virus que se selecciona(n) del grupo que consiste en VIH y HTLV, preferiblemente se selecciona(n) del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, HTLV-I y HTLV-II. En una realización preferida, las infecciones causadas por los virus DNA son causadas por los virus de herpes, preferiblemente se selecciona(n) del grupo que consiste en virus del herpes simple tipo I (VHS-

1), virus del herpes simple tipo II (VHS-2), virus de la varicela-zoster o herpes virus humano 3, virus Epstein-Barr o herpes virus humano 4, cytomegalovirus o herpes virus humano 5, herpes virus humano 6, herpes virus humano 7 y virus del Sarcoma de Kaposi o herpes virus humano 8. En una realización preferida, las infecciones causadas por los virus DNA que tienen en su ciclo viral pasos de retrotranscripción son causadas por un virus que se selecciona del grupo que consiste en infecciones causadas por el virus de la hepatitis B.

En una realización aún más preferida, la enfermedad en la que el volumen de dNTPs es relevante es la infección causada por el VIH.

Preferiblemente, el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 se selecciona del grupo que consiste en ARN pequeño de interferencia (ARNip), micro ARN (miARN), shARN, péptidos, pequeñas moléculas, anticuerpos y vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISP/Cas9. Aún más preferible, el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 se selecciona del grupo que consiste en ARNip, péptidos, anticuerpos y vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISP/Cas9.

El agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 (ingrediente activo) se puede administrar *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "*farmacéuticamente aceptable*" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

El vehículo, naturalmente, se selecciona para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como es bien conocido para un experto en la técnica.

Las dosificaciones efectivas y los calendarios de administración de las composiciones que comprenden el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 descrito en este documento pueden ser determinadas empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de la experiencia en la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos lo suficientemente grandes para

producir el deseado efecto de reducción/inhibición de la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente, la vía de administración, o si otros fármacos se incluyen en el régimen, y puede ser determinada por un experto en la técnica. La dosificación puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier contraindicación. La dosis puede variar, y puede ser administrada en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días. Se pueden encontrar orientaciones en la bibliografía para las dosificaciones apropiadas para las clases dadas de productos farmacéuticos.

El ARN pequeño de interferencia (ARNip) (en inglés, siRNA, *small interfering RNA*) o ARN de silenciamiento es una clase de ARN bicatenario, que generalmente posee una longitud de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos y es altamente específico para la secuencia de nucleótidos de su ARN mensajero diana, interfiriendo por ello con la expresión del gen respectivo. Interviene en el mecanismo denominado interferencia de ARN (del inglés *RNA interference*, RNAi), mediante el cual el ARNip interfiere con la expresión de un gen específico, reduciéndola, tal y como se ha descrito anteriormente. En el contexto de la presente invención, si el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 es un ARNip, dicha reducción/inhibición se realiza de manera indirecta; el ARNip interfiere con la expresión del gen que codifica para la proteína CD81, por lo que la expresión de este gen se reduce/inhibe (y, como consecuencia, los niveles de proteína CD81 también se reducen/inhiben). Dado que los niveles de proteína CD81 se reducen/inhiben, la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 también se reduce/inhibe, y los niveles intracelulares de SAMHD1 aumentan, aumentando así su actividad dNTPasa, reduciéndose la cantidad de dNTPs disponibles.

Preferiblemente, el ARN pequeño de interferencia se selecciona del grupo que consiste en secuencias que comprenden o, alternativamente, consisten en CAATTTGTGTCCCTCGGGC (SEQ ID NO.: 3), CACCTTCTATGTAGGCATC (SEQ ID NO.: 8) y CACGTGCGCTTCAACTGTA (SEQ ID NO.: 9).

Un micro ARN (miARN o miRNA por sus siglas en inglés) es un ARN monocatenario, generalmente de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes. Los miRNA son moléculas de ARN transcritas a partir de genes de ADN, pero no son traducidas a proteínas. Generalmente, un miRNA es complementario a una parte de uno o más ARN mensajeros (ARNm), y regulan de esta manera la expresión génica, tal y como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, si el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 es un miARN, este puede ser complementario a una parte del ARNm de la proteína CD81, reduciendo/inhibiendo la traducción de este ARNm a la proteína CD81. Los niveles de proteína CD81 se verán por lo tanto reducidos, reduciéndose/inhibiéndose de esta manera la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1.

Un shRNA ("*short hairpin RNA*" o "*small hairpin RNA*", en inglés) es una molécula de ARN artificial que se puede usar para silenciar la expresión de un gen diana mediante ARN de interferencia. La expresión del shRNA en células se consigue generalmente mediante su transporte en plásmidos o vectores virales o de origen bacteriano.

Un péptido es una molécula compuesta por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos. En el contexto de la presente invención, el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 puede ser un péptido que se une o bien a CD81 o bien a SAMHD1 e interfiere en la asociación de ambas moléculas, reduciéndola o inhibiéndola. En una realización preferida, el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de CD81 con SAMHD1 es un péptido, preferiblemente un péptido que comprende la secuencia CCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 10) o una secuencia que puede competir con SEQ ID NO.: 10. El agente capaz de reducir/inhibir la asociación de CD81 con SAMHD1, en el caso que sea un péptido, también puede comprender cualquier secuencia que permita que el péptido penetre una membrana celular como, por ejemplo, una secuencia de siete argininas RRRRRRRCCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 1), o el péptido puede ser encapsulado en un liposoma o nanocapsula que permite que el péptido traspase una membrana celular.

Además, el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 puede ser un anticuerpo que interfiere en la asociación de CD81 con SAMHD1, reduciéndola o inhibiéndola. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce

específicamente el dominio C-terminal de la proteína CD81, donde el dominio C-terminal de la proteína CD81 es la secuencia CCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 10). Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente y se une al dominio C-terminal de la proteína CD81, impidiendo (reduciendo/inhibiendo) de esta manera la asociación entre CD81 y SAMHD1. En una realización preferida, el dominio C-terminal de la proteína CD81 es SEQ ID NO.: 10.

El término “*anticuerpo*” tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con, por ejemplo, el dominio C-terminal de la proteína CD81. Ejemplos de fragmentos inmunológicamente activos, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que se pueden generar tratando el anticuerpo con una enzima tal y como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). En una realización preferida, el dominio C-terminal de la proteína CD81 es SEQ ID NO.: 10.

El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humano o humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “*anticuerpo o polipéptido recombinante*” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico que codifica para el polipéptido o antígeno, o produce el polipéptido o antígeno como resultado de la recombinación homóloga.

En otra realización de este primer aspecto de la presente invención, el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 es un vector para terapia génica, también denominado vector génico. Un vector génico es un agente que transfiere información genética a un organismo. Por ejemplo, el vector génico puede ser un plásmido que comprende un gen de interés o una secuencia de interés. Preferiblemente, el vector para terapia génica o vector génico comprende el sistema CRISPR/Cas9. Al administrar la proteína Cas9 y los ARN guía apropiados a una célula, el genoma de esta puede cortarse en los lugares deseados, cuyas secuencias serán complementarias a las de los ARN guía utilizados. Esto permite la eliminación funcional de genes. El sistema CRISPR/Cas9 se puede utilizar para la edición de genes; en el contexto de la presente invención, el sistema

CRISPR/Cas9 se emplea para la eliminación funcional del gen que codifica para la proteína CD81, inhibiéndose de esta manera la expresión de CD81 en la célula diana y reduciéndose/inhibiéndose por lo tanto la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1. Preferiblemente, el el vector para terapia génica o vector génico que comprende el sistema CRISPR/Cas9 comprende como secuencia diana una secuencia que comprende o,
 5 alternativamente consiste en, CACCGGCTGGCTGGAGGCGTGATCCGT (SEQ ID NO.: 11) o CACCGGCGCCCAACACCTTCTATGTGT (SEQ ID NO.: 12).

En una realización aún más preferida, la enfermedad en la que el volumen de dNTPs es relevante es la infección causada por el VIH y el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 se selecciona del grupo que consiste en ARN pequeño de interferencia seleccionado del grupo que consiste en secuencias que comprenden o, alternativamente, consisten en CAATTTGTGT CCCTCGGGC (SEQ ID NO.: 3), CACCTTCTATGTAGGCATC (SEQ ID NO.: 8) y CACGTCGCCTTCAACTGTA (SEQ ID NO.: 9),
 15 un péptido que comprende la secuencia CCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 10), una secuencia que puede competir con SEQ ID NO.: 10 y/o una secuencia que además puede comprender cualquier secuencia que permite que el péptido penetre una membrana celular como, por ejemplo, una secuencia de siete argininas (SEQ ID NO.: 1) y un vector para terapia génica que comprende el sistema CRISPR/Cas9 comprende como secuencia diana una secuencia que
 20 comprende o, alternativamente consiste en, CACCGGCTGGCTGGAGGCGTGATCCGT (SEQ ID NO.: 11) o CACCGGCGCCCAACACCTTCTATGTGT (SEQ ID NO.: 12).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona métodos de cribado para identificar agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1. Los métodos de cribado de acuerdo con la presente invención comprenden o,
 25 alternativamente consisten en las etapas de:

a) Seleccionar agentes candidatos, preferiblemente a partir de una librería de compuestos;

b) Determinar si alguno de dichos agentes es capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 en células que expresan ambas proteínas;

c) Seleccionar aquellos agentes que promueven la reducción/inhibición descrita en el paso b); y,

d) Opcionalmente, producir aquellos agentes seleccionados en el paso c).

En el contexto de la presente invención, el término “*método de cribado*” se entiende como un método que permite seleccionar compuestos (agentes) capaces de promover un cambio determinado medible por métodos *in vitro* conocidos en la técnica, en una muestra biológica o en un animal modelo no humano a los que se les ha administrado dicho compuesto (agente), en comparación con una muestra biológica o animal modelo no humano similares y comparables, a los que no se les ha administrado el compuesto (agente). Dicho método de cribado también puede incluir una fase adicional de aislamiento del compuesto seleccionado o de los compuestos seleccionados

Los agentes candidatos de acuerdo con la etapa a) se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en ARN pequeño de interferencia (ARNip), micro ARN (miARN), shARN, péptidos, pequeñas moléculas, anticuerpos y vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISP/Cas9, tal y como se han definido en el contexto del primer aspecto de la presente invención.

La persona experta en la materia conoce métodos disponibles para determinar si alguno de dichos agentes es capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 en células que expresan ambas proteínas (etapa b) del método de cribado de la presente invención). Por ejemplo, en el apartado 2 de los ejemplos de la presente memoria se describen experimentos de precipitación utilizando lisados de linfoblastos T primarios y péptidos biotinilados con la secuencia C-terminal de distintas tetraspaninas acoplados a esferas de sefarosa con estreptavidina con el objetivo de estudiar si SAMHD1 se une específicamente a los péptidos C-terminal de CD81. En este mismo apartado, la asociación entre las moléculas de SAMHD1 y CD81 endógenas se confirmó en ensayos de co-inmunoprecipitación usando lisados de linfoblastos T primarios. Otros métodos que se pueden emplear para estudiar la asociación de las proteínas CD81 y SAMHD1 son ensayos de ligación *in situ* por proximidad como Duolink®, ensayos de reticulación (“*cross-linking*” en inglés) y usando proteínas de fusión purificadas en columnas de cromatografía por afinidad. Además, tal y como se ha detallado anteriormente, una reducción en los niveles de expresión de la proteína CD81 produce, al menos indirectamente, una reducción/inhibición de la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1. Por lo tanto, si alguno de dichos agentes de la etapa a) del método de cribado de la presente invención es capaz de reducir la expresión de CD81, este agente también es capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima

SAMHD1. Por ejemplo, la RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa-transcripción inversa) se puede emplear para cuantificar los niveles de ARNm de CD81 y el inmunoblot ("*Western blot*" en inglés) o citometría por flujo se pueden emplear para cuantificar los niveles de proteína.

- 5 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una combinación de medicamentos o una terapia de combinación para el tratamiento del VIH. La combinación de medicamentos de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención comprende al menos tres medicamentos seleccionados de por lo menos dos clases diferentes de medicamentos para tratar el VIH, y comprende al menos un medicamento perteneciente a la clase de medicamentos inhibidores de
- 10 la transcriptasa inversa análogo de los nucleósidos, en el que dicho medicamento es un agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1.

En general, el régimen de tratamiento inicial para el VIH incluye tres o más medicamentos contra el VIH de por lo menos dos clases diferentes de medicamentos para tratar el VIH. Los

15 medicamentos contra el VIH están agrupados en seis clases de medicamentos dependiendo de cómo combaten la infección por VIH. Estas seis clases de medicamentos incluyen los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIN), los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINN), los inhibidores de la proteasa (IP), los inhibidores de la fusión, los inhibidores de la entrada (también denominados antagonistas de

20 los receptores CCR5) y los inhibidores de la transferencia de cadenas de la integrasa (INSTI). También existen los llamados potenciadores farmacocinéticos.

Preferiblemente, la combinación de medicamentos de acuerdo con la presente invención comprende dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIN), junto

25 con un inhibidor de la transferencia de cadenas de la integrasa (INSTI). Al menos uno de los ITIN es un agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 tal y como se ha descrito en la presente descripción. Opcionalmente, la combinación de medicamentos de acuerdo con la presente invención comprende además un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de los nucleósidos (ITINN) y/o un inhibidor de la proteasa (IP),

30 opcionalmente administrados con un refuerzo de cobicistat o de ritonavir.

La siguiente tabla muestra los medicamentos contra el VIH autorizados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA,

“[https://infosida.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/medicamentos-contra-el-vih-
autorizados-por-la-fda](https://infosida.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/medicamentos-contra-el-vih-autorizados-por-la-fda)”) de los Estados Unidos para el tratamiento de dicha infección en el país. Los medicamentos contra el VIH aparecen de acuerdo a la clase de medicamento y están
5 identificados por su nombre genérico.

Medicamentos contra el VIH autorizados por la FDA	
Clase de medicamento	Nombre genérico (Otros nombres y siglas)
Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIN)	
Esta clase de medicamentos bloquea la transcriptasa inversa, una enzima que el VIH necesita para replicarse.	abacavir (sulfato de abacavir, ABC)
	didanosina (didanosina de liberación lenta, dideoxinosina, didanosina revestimiento entérico, ddl, ddl EC)
	emtricitabina (FTC)
	lamivudina (3TC)
	estavudina (d4T)
	fumarato de disoproxilo de tenofovir (tenofovir DF, TDF)
	zidovudina (azidothymidina, AZT, ZDV)
Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINN)	
Esta clase de medicamentos se liga y luego altera la transcriptasa inversa, una enzima que el VIH	efavirenz (EFV)
	etravirina

necesita para replicarse.	(ETR)
	nevirapina (nevirapina de liberación lenta, NVP)
	rilpivirina (clorhidrato de rilpivirina, RPV)
Inhibidor de la proteasa (IP)	
Esta clase de medicamentos bloquea la proteasa del VIH, una enzima que el VIH necesita para replicarse.	atazanavir (sulfato de atazanavir, ATV)
	darunavir (etanolato de darunavir, DRV)
	fosamprenavir (fosamprenavir cálcico, FOS-APV, FPV)
	indinavir (sulfato de indinavir, IDV)
	nelfinavir (mesilato de nelfinavir, NFV)
	ritonavir (RTV) * Aunque el ritonavir es un inhibidor de la proteasa, por lo general se usa como potenciador farmacocinético según lo recomendado en las Guías clínicas para el uso de agentes antirretrovirales en adultos y adolescentes con la infección por el VIH-1 (<i>Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents</i>) y en las Guías clínicas para el uso de agentes antirretrovirales en pacientes pediátricos con la infección por el VIH (<i>Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection</i>).

	saquinavir (mesilato de saquinavir, SQV)
	tipranavir (TPV)
Inhibidores de la fusión	
Esta clase de medicamentos impide que el VIH penetre los linfocitos CD4 del sistema inmunitario.	enfuvirtida (T-20)
Inhibidores de la entrada	
Esta clase de medicamentos bloquea las proteínas en los linfocitos CD4 que el VIH necesita para penetrarlos.	maraviroc (MVC)
Inhibidores de la integrasa	
Esta clase de medicamentos bloquea la integrasa del VIH, una enzima que el VIH necesita para replicarse.	dolutegravir (DTG)
	elvitegravir (EVG)
	raltegravir (potasio de raltegravir, RAL)

5

10

Preferiblemente, el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 se selecciona del grupo que consiste en ARN pequeño de interferencia (ARNip), micro ARN (miARN), shARN, péptidos, pequeñas moléculas, anticuerpos y vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9, tal y como se han definido en el contexto del primer aspecto de la presente invención. Aún más preferible, el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 se selecciona del grupo que consiste en ARNip, péptidos, anticuerpos y vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9, tal y como se han definido en el contexto del primer aspecto de la presente invención.

En una realización preferida, el ARN pequeño de interferencia se selecciona del grupo que consiste en secuencias que comprenden o, alternativamente, consisten en CAATTTGTGT CCCTCGGGC (SEQ ID NO.: 3), CACCTTCTATGTAGGCATC (SEQ ID NO.: 8) y CACGTCGCCTTCAACTGTA (SEQ ID NO.: 9).

5

En una realización preferida, el péptido comprende la secuencia CCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 10), una secuencia que puede competir con SEQ ID NO.: 10 y/o una secuencia que además puede comprender cualquier secuencia que permite que el péptido penetre una membrana celular como, por ejemplo, una secuencia de siete argininas (SEQ ID NO.: 1).

10

En otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce específicamente el dominio C-terminal de la proteína CD81. En una realización preferida, el dominio C-terminal de la proteína CD81 es SEQ ID NO.: 10.

15 En otra realización preferida, el vector para terapia génica que comprende el sistema CRISPR/Cas9 comprende como secuencia diana una secuencia que comprende o, alternativamente consiste en, CACCGGCTGGCTGGAGGCGTGATCCGT (SEQ ID NO.: 11) o CACCGGCGCCCAACACCTTCTATGTGT (SEQ ID NO.: 12).

20 Los siguientes ejemplos sirven meramente para ilustrar la presente invención.

Ejemplos

25 Las tetraspaninas modulan diferentes etapas en el ciclo de infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1). La tetraspanina CD81 regula la entrada del virus y su salida; sin embargo, se desconoce si CD81 controla otras fases del ciclo viral. Los inventores de la presente invención han identificado a SAMHD1 como una molécula asociada a CD81 en linfocitos T. SAMHD1 es una desoxinucleósido trifosfato fosfohidrolasa (dNTPasa) que actúa como un inhibidor celular de la transcripción reversa (RT) del virus HIV-1. Los resultados que
30 aquí se muestran indican que CD81 se asocia directamente a SAMHD1 a través de su dominio C-terminal. La sobreexpresión de CD81 aumenta enormemente la retrotranscripción viral, mientras que la depleción de CD81 inhibe las primeras etapas de la replicación del virus. La región C-terminal de CD81 es crucial para su capacidad de regular la actividad de SAMHD1,

regulando de esta forma la concentración y disponibilidad intracelular de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) y consecuentemente la retrotranscripción de HIV-1. En ausencia de la tetraspanina, SAMHD1 se acumula en compartimentos endosomales tempranos y su degradación vía proteasoma está bloqueada. En conjunto, estos resultados indican que estrategias que inhiban la función de CD81 inhiben la retrotranscripción de HIV mediante el control de los niveles intracelulares de dNTPs a través de SAMHD1.

1. Materiales y Métodos

Células

La línea celular Hela P4.R5 MAGI (HELA/R5) fue obtenida del NIH AIDS Reagent Program (número de referencia 3580) división de SIDA, NIAID, NIH: P4R5 MAGI, del Dr. Nathaniel Landau (Charneau *et al.*, 1994, HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome, Journal of molecular biology, 241:651-662) y fueron cultivadas en DMEM (Sigma) suplementado con un 10% de FCS y 1µg/ml de puromicina (Sigma). Por otro lado, se aislaron y se cultivaron linfocitos de sangre periférica procedente de pacientes sanos siguiendo las pautas descritas previamente (Rocha-Perugini *et al.*, 2013, CD81 controls sustained T cell activation signaling and defines the maturation stages of cognate immunological synapses, Molecular and cellular biology, 33:3644-3658).

Las células Hela/R5 (8×10^6), los linfoblastos T humanos (2×10^7), o las células Jurkat J77 (2×10^7) se lavaron dos veces con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Lonza) y se transfectaron transitoriamente mediante electroporación con siARN (1µM) o DNA plasmídico (20µg) en medio OPTIMEM (Gibco, Invitrogen) a 240 V y 34ms (Gene Pulser II, Bio-Rad). Esta transfección fue realizada por duplicado con una diferencia de 48 horas entre ambos pulsos, y los experimentos se llevaron a cabo 48 horas después del último de ellos. La sobreexpresión, silenciamiento o delección génica fueron confirmadas mediante citometría o western-blot.

Reactivos y construcciones

Los péptidos con las secuencias RRRRRRRCCGIRNSSVY (CD81pept, SEQ ID NO.: 1) o RRRRRRRYSVNICRGCSS (Scrambled, SEQ ID NO.: 2), marcados en el extremo N-terminal con tetrametilrodamina (TAMRA) fueron obtenidos de LifeTein. Péptidos biotinilados en su

extremo *N*-terminal y portadores de una secuencia SGSG conectada al dominio C-terminal de las proteínas de interés, se obtuvieron de Ray Biotech (descritos con anterioridad (Perez-Hernandez *et al.*, 2013, The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes, The Journal of biological chemistry, 288:11649-11661; Tejera *et al.*, 2013, CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase, Molecular biology of the cell, 24:261-273). Tanto el siARN control AAUUCUCCCGAACGUGUCACGU (siControl, SEQ ID NO.: 13) como el siARN de CD81 CAATTTGTGTCCCTCGGGC (siCD81, SEQ ID NO.: 3) fueron comprados en Eurogentec. Tres secuencias distintas para silenciar CD81 han sido previamente validadas, consiguiendo fenotipos similares en otros sistemas (Rocha-Perugini *et al.*, 2013, CD81 controls sustained T cell activation signaling and defines the maturation stages of cognate immunological synapses, Molecular and cellular biology, 33:3644-3658; Tejera *et al.*, 2013, CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase, Molecular biology of the cell, 24:261-273).

Ensayos de pull-down, inmunoprecipitación e inmunoblot

Los péptidos biotinilados en el extremo *N*-terminal (30nmol) fueron conjugados a 40 µl de estreptavidina-sefarosa (GE Healthcare). Se realizaron ensayos de pull-down como ha sido descrito previamente (Tejera *et al.*, 2013, CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase, Molecular biology of the cell, 24:261-273) utilizando extractos obtenidos de linfoblastos T y estos fueron analizados mediante Western-blot. Brevemente, las células fueron lavadas con tampón fosfato salino frío (PBS) y posteriormente se lisaron usando NP-40 al 1% en PBS en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Complete, PhosSTOP; Roche). Los lisados se lavaron durante dos horas a 4 °C con estreptavidina sefarosa (GE Healthcare), tras lo cual se incubaron durante 2 h a 4°C con péptidos biotinilados inmovilizados en esferas de estreptavidina sefarosa.

Para los ensayos de inmunoprecipitación, los linfoblastos T primarios humanos (2×10^7) se lisaron utilizando 0.5 % NP-40 en PBS con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados fueron preclareados durante 2 h a 4°C con proteína G-Sefarosa (Amersham Biosciences) y posteriormente fueron incubados 2 h a 4°C en presencia de anti-CD81 5A6 mAb (producido en el laboratorio de la Dra. S. Levy, Standford, USA (Takahashi *et al.*, 1990, TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, is associated on the cell surface with the Leu-13 antigen, J

Immunol. 145:2207-2213) y vendido por Santa Cruz Biotechnology con el número de referencia: sc-23962) o anti-SAMHD1 Ab (Sigma) inmovilizados sobre microesferas de proteína G sefarosa. Tras lavar con buffer de lisis, los complejos fueron eluidos con tampón Laemmli y analizados mediante PAGE-SDS.

5 Para el inmuno-blot, tanto las células sin tratar como las células cultivadas durante 6 h a 37°C en presencia de distintas concentraciones de cloruro amónico (NH₄Cl, Sigma) o MG132 (Sigma) fueron lisadas con Triton X-100 al 1% en PBS en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Todas las membranas se revelaron utilizando FUJIFILM LAS-4000 tras ser
10 incubadas primero con anticuerpos específicos y posteriormente con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (Pierce). Se usaron anticuerpos primarios frente a: SAMHD1 (policlonal; Sigma), CD81 (5A6 mAb), α -tubulina (Sigma), p150glued (BD Biosciences), cofilina (Abcam), y ERM (90.3; aportado generosamente por el Dr. H Furthmayr, Standford, USA). La intensidad de cada una de las bandas fue cuantificada utilizando ImageGauge (FUJIFILM) y los resultados
15 fueron normalizados con respecto a la intensidad de la señal procedente de los controles de carga.

Citometría de flujo y microscopía confocal de fluorescencia

20 Para la citometría de flujo las células fueron fijadas en paraformaldehído al 2% (PFA; Electron Microscopy Sciences), para el análisis de proteínas intracelulares fueron permeabilizadas en 0.5% Triton X-100 y teñidas con los anticuerpos primarios apropiados, seguido del marcaje con anticuerpos secundarios (Invitrogen). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-CCR5 (Santa Cruz), anti-SAMHD1 (Sigma), anti-CD82 (TS82b, generosamente suministrado por el Dr.
25 E. Rubinstein, Villejuif, France), y anticuerpos producidos en nuestro laboratorio (anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD151 (LIA1/1), anti-CD63 (Tea3/18), y anti-CD4 (HP2/6)) (Barreiro *et al.*, 2005, Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation, Blood, 105:2852-2861; Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2005, Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection, Molecular biology of the cell, 16:5445-5454;
30 Yanez-Mo *et al.*, 1998, Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with α 3 β 1 integrin localized at endothelial lateral junctions, The Journal of cell biology, 141:791-804). El análisis de las muestras fue

realizado utilizando un citómetro de flujo FACSCantoll (BD), y los resultados se procesaron mediante los softwares BD FACSDIVA (BD) o FlowJo (Inc).

Para los inmunomarcajes, se adhirieron las células sobre matrices de poli-L-lisina (PLL; Sigma), o sobre anticuerpos monoclonales anti-CD4, -CD81 o -CD9 (10 µg/ml) durante 2 h; o en cubreobjetos recubiertos de fibronectina (20 µg/ml, Sigma) durante 2, 4 ó 18 h a 37°C, se fijaron con 4% PFA, y se permeabilizaron con PBS 0.5% Triton X-100 durante 5 min. Las muestras fueron teñidas con anticuerpos primarios específicos, seguido de la incubación con anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos Alexa-Fluor (Invitrogen), y montados usando el medio ProLong (Invitrogen). Los anticuerpos primarios usados fueron: anti-CD81 (5A6 mAb), anti-SAMHD1 (mAb y policlonal; Sigma), anti-EEA1 y -CD63 (Santa Cruz), anti-HGS/HRS (Abcam), y anti-LAMP-1 marcado con Alexa-647 (BioLegend). Para el ensayo *in situ* de ligación por proximidad Duolink, las células se fijaron, bloquearon y marcaron con el anticuerpo frente a SAMHD1, CD81 (5A6 mAb), ERM (90.3) o CD147 (VJ1/9 mAb (Gutierrez-Lopez *et al.*, 2011, The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9, Cellular and molecular life sciences: CMLS, 68:3275-3292); producido en nuestro laboratorio) durante 1 h a 37°C. Los anticuerpos secundarios incluidos en el kit de ligación por proximidad Duolink (Sigma) fueron añadidos para poder visualizar la proximidad de ambas moléculas en la membrana. Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio confocal Leica TCS-SP5 acoplado a un microscopio invertido de epifluorescencia DMI6000B con un objetivo HCX PL APO lambda blue 63X/1.4 de inmersión en aceite, y el software de adquisición Las-AF (Leica Microsystems), o alternativamente mediante un confocal ZEISS LSM700 acoplado a un microscopio de epifluorescencia invertido (Observer.Z1) con un objetivo de inmersión en aceite Pan APO Chromat 63X/1.4, y el software de adquisición ZEN 2009 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ (NIH). Los valores del coeficiente de Pearson's y el % de colocación entre SAMHD1 y EEA1 se calcularon a partir de secciones tridimensionales con Imaris (Bitplane). La señal de SAMHD1 procedente del núcleo fue excluida del análisis.

Preparación e infección del virus VIH-1

La preparación de la forma salvaje del VIH-1 NL4-3 (X4-trópico) o BaL (R5-trópico), y del virus recombinante VSV-G-pseudotipado se realizó según lo descrito anteriormente (Gordon-Alonso *et al.*, 2013, Actin-binding protein drebrin regulates HIV-1-triggered actin polymerization and viral infection, The Journal of biological chemistry, 288:28382-28397).

Para el análisis de la RT del VIH-1, células Hela/R5 fueron infectadas con 100ng de VIH-BaL por pocillo de p24 o con 50 ng por pocillo de p24 del virus VSV-G-VIH, mientras que los linfocitos T primarios o células Jurkat J77 fueron infectadas con 100ng de virus HIV-1 NL4-3 por 10^6 células o 200 ng por 10^6 células en el caso del VSV-G-VIH. Tras 2h de infección, las células fueron lavadas e incubadas a 37 °C durante 24 y 48 horas, lisadas en 0.2% NP-40, y el ADN genómico total fue extraído usando el miniKit QiAmp DNA (Qiagen). El análisis de la transcripción reversa del VIH-1 se realizó mediante amplificación del ADN genómico por PCR cuantitativa usando SYBR Green PCR master mixture (Applied Biosystem): oligo 5'-CAGGATTCTTGCCTGGAGCTG-3' (SEQ ID NO.: 4) y oligo reverso 5'-GGAGCAGCAGGAAGCACTATG-3' (SEQ ID NO.: 5) para los productos de transcripción reversa tempranos y oligo 5'-TGTGTGCCCCGTCTGTTGTGT-3' (SEQ ID NO.: 6) y oligo reverso 5'-CGAGTCCTGCGTCGAGAGAT-3' (SEQ ID NO.: 7) para los productos de transcripción tardía. El gen de β -actina fue amplificado para medir la concentración de ADN y para la normalización de los resultados. Cada medida fue realizada por triplicado.

Medida de dNTP intracelulares

Para el análisis y cuantificación de dNTP, las células fueron recogidas, lisadas en metanol frío al 65%, y agitadas mediante vórtex durante 2 min. Los extractos fueron incubados a 95°C durante 3 min, y el sobrenadante fue recogido y evaporado en un speed-vacuum. Las muestras fueron procesadas para los ensayos de incorporación de un único nucleótido como descrito en (Diamond *et al.*, 2004, Macrophage tropism of HIV-1 depends on efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase, The Journal of biological chemistry, 279:51545-51553). Cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) fue detectado por separado, y para el análisis de los niveles contenidos en células que sobreexpresan o carecen de CD81 los niveles fueron normalizados frente a los niveles medidos en las células control.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). El p-valor fue calculado mediante el test t-Student de dos colas, ANOVA el post-test de Bonferroni, Tukey o Dunn según lo apropiado para cada conjunto de datos. El nivel de significación estadística fue definido como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

2. Resultados

CD81 se asocia a SAMHD1

En este ejemplo se ha investigado la posible asociación entre CD81 y SAMHD1. Para probar la interacción entre CD81 y SAMHD1, llevamos a cabo experimentos de precipitación utilizando lisados de linfoblastos T primarios y péptidos biotinilados con la secuencia C-terminal de distintas tetraspaninas acoplados a esferas de sefarosa con estreptavidina. Estos experimentos revelaron que SAMHD1 se unía específicamente a los péptidos C-terminales de CD81, mientras que no se observaba interacción con los de otras tetraspaninas (CD9 y CD151) (Figura 1A). La asociación entre las moléculas de SAMHD1 y CD81 endógenas fue confirmada en ensayos de co-inmunoprecipitación usando lisados de linfoblastos T primarios. SAMHD1 fue detectado en los inmunoprecipitados de CD81 y vice versa (Figura 1B). Estos resultados indican que SAMHD1 y CD81 se asocian de forma directa a través del dominio C-terminal de CD81.

SAMHD1 no se expresa en líneas inmortalizadas de linfocitos T, como pueden ser las Jurkat J77 o CEM (Figura 7A). Sin embargo, la expresión de la enzima fue detectada tanto en el citoplasma como en el núcleo de linfocitos T primarios y células Hela (Figura 1C). Aunque CD81 y SAMHD1 co-immunoprecipitan (Figura 1B), no se observó una co-localización clara de ambas moléculas mediante tinciones dobles en células en reposo (Figura 1C), sugiriendo una interacción transitoria. Por ello se estudió la localización de SAMHD1 tras entrecruzamiento de la tetraspanina. Para ello, células Hela/R5, que expresan de manera estable CD4 y CCR5, fueron sembradas durante 2h sobre cubreobjetos recubiertos de anticuerpos específicos frente a las tetraspaninas CD81 o CD9, o frente al receptor de HIV-1 la molécula de CD4, que además se asocia a la tetraspanina CD81 (Levy and Shoham, 2005, The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes, Nat Rev Immunol. 5:136-148), o sobre poli-L-lisina (PLL) como control. Las células sembradas sobre PLL o anticuerpos anti-CD9 mostraron una débil tinción

de SAMHD1 en la zona ventral del citoplasma en secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal (Figura 1D), en concordancia con la ausencia de asociación entre SAMHD1 y los péptidos de la región C-terminal de CD9 en los ensayos de precipitación. Las Hela/R5 sembradas sobre anticuerpos anti-CD81 o anti-CD4 mostraron claras acumulaciones de SAMHD1 en parches en la zona ventral de la célula (Figura 1D). De manera interesante, el agrupamiento de SAMHD1 observado tras entrecruzamiento de ambas proteínas de membrana, fue anulado en células en las que la expresión de CD81 se redujo mediante transfección de siRNA (siCD81) (Figura 1D), sugiriendo que el entrecruzamiento tanto de CD81 como de CD4 puede inducir la acumulación de SAMHD1 en la membrana plasmática de forma dependiente de CD81. Además, ensayos de ligación *in situ* por proximidad, revelaron interacciones proteína-proteína en un número significativo de linfoblastos T primarios humanos no estimulados (Figura 1E). Estos experimentos incluyeron la co-tinción de SAMHD1/CD147 como control negativo, en tanto en cuanto CD147 es un receptor de membrana con una expresión incluso mayor que la de CD81. Como control positivo utilizamos la pareja CD81/ERM, cuya interacción ha sido descrita ocurre en el urópodo de los linfoblastos T (Yanez-Mo *et al.*, 2009, Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes, Trends in cell biology, 19:434-446), corroborando que la señal de ligación por proximidad se podía obtener en cotinciones entre un receptor de membrana y conector intracelular.

CD81 regula positivamente la transcripción reversa de HIV-1

Puesto que SAMHD1 modula la infectividad de HIV a través de la regulación del paso de RT, lo siguiente que se abordó en este ejemplo fue el posible papel de CD81 como modulador de dicho paso del ciclo viral. Células Hela/R5 fueron transfectadas transitoriamente con GFP, GFP-CD81 (CD81GFP) o un mutante de CD81 que carece de la región citosólica C-terminal (CD81 Δ cytGFP) (Tejera *et al.*, 2013, CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase, Molecular biology of the cell, 24:261-273). Las células así transfectadas fueron infectadas con virus HIV-1 salvaje R5-trópico (cepa BaL), que reconoce a CCR5 como correceptor. Productos tempranos y tardíos de la RT viral fueron medidos mediante PCR cuantitativa tanto a 24 como a 48h post-infección. La expresión de CD81GFP en células Hela/R5 aumentó la RT de HIV-1 en comparación con los controles de células transfectadas con GFP (Figura 2A, paneles a la izquierda). Este aumento era dependiente del dominio C-terminal de CD81, puesto que los niveles de los productos de la RT viral eran similares en

células Hela/R5 que expresaban el mutante CD81 Δ cytGFP y las células control expresando GFP (Figura 2A, izquierda). Para excluir la posibilidad de que los efectos observados por la expresión de CD81GFP fueran debidos a efectos en la entrada del virus (Gordon-Alonso *et al.*, 2006, Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion, J Immunol. 177:5129-5137), se realizó el mismo tipo de ensayos utilizando un virus recombinante con la envuelta de VSV (VSV-G-HIV). El pseudovirus VSV-G-HIV entra en la célula mediante la unión de la glicoproteína G del VSV a la membrana plasmática permitiendo el análisis de la RT de HIV-1 de forma independiente de su entrada. En este modelo, las células Hela/R5 que expresaban CD81GFP mostraron de nuevo un gran aumento en la RT, mientras que las células que expresaban el mutante CD81 Δ cytGFP mostraron niveles similares a las células control transfectadas con GFP (Figura 2A, paneles en la derecha). Estos resultados indican que la sobreexpresión de CD81 específicamente aumenta la RT de HIV-1 a través de conexiones intracelulares mediadas por el dominio C-terminal, y de manera independiente a sus efectos en entrada del virus.

De forma contraria, la reducción de CD81 mediante siRNA (Figura 7B, panel superior), o la delección completa mediante la tecnología de CRISPR/Cas9 (CRISPR/Cas9-CD81; Figura 7B, panel inferior) en células Hela/R5 redujo la RT de HIV-1 tanto para el virus salvaje de la cepa BaL como para VSV-G-HIV (Figura 2B). La depleción de CD81 en células Hela/R5 con siRNA o CRISPR/Cas9 no afectó a los niveles de expresión de CD4, CCR5 o las tetraspaninas CD82, CD9, CD151 o CD63 (Figura 7D-E). Para corroborar la implicación del dominio C-terminal de CD81 en la regulación de la RT de HIV-1, se trataron células Hela/R5 con péptidos citopermeables fluorescentes correspondientes a dicha secuencia C-terminal (CD81pept) o una versión desordenada como control (scramble). Este péptido de CD81 remedia funcionalmente los efectos del silenciamiento de CD81 en diferentes modelos (Tejera *et al.*, 2013, CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase, Molecular biology of the cell, 24:261-273). Las células Hela/R5 pre-tratadas con los péptidos citopermeables fueron infectadas con virus salvaje (cepa BaL) o VSV-G-HIV, y se analizó la RT. El pre-tratamiento de Hela/R5 con CD81pept disminuye específicamente la RT de HIV-1 en comparación con los controles scramble (Figura 2C), sugiriendo que CD81 modula positivamente la RT de HIV-1 a través de interacciones moleculares que tienen lugar a través de su dominio C-terminal.

En un modelo más fisiológico, investigamos si CD81 modula la RT de HIV-1 en células primarias, utilizando una cepa de HIV-1 X4-trópica que utiliza CXCR4 como co-receptor. Los linfoblastos T fueron pre-tratados con los péptidos scramble o CD81pept, e infectados con los virus X4-trópicos salvajes (cepa NL4-3) o VSV-G-HIV. El tratamiento con los péptidos bloqueantes CD81 C-terminal claramente impidieron la RT de HIV-1 cuando se analizaron los productos tempranos y tardíos de dicha RT mediante PCR cuantitativa (Figura 3A). También se pudo observar un descenso en la RT de HIV-1 mediante silenciamiento por RNA interferencia (Figura 3B). En conjunto, nuestros resultados sugieren que CD81 regula positivamente la RT de HIV-1 tanto en cepas R5- como X4-trópicas.

CD81 regula la actividad dNTPasa de SAMHD1

Para determinar si la función de CD81 en la RT de HIV-1 dependía de la regulación de la actividad de SAMHD1, analizamos los efectos del silenciamiento de CD81 en células T de la línea Jurkat J77, que no expresan SAMHD1 (Figura 7A). En dichas células, el silenciamiento de CD81 (Figura 7C) o el tratamiento con los péptidos de CD81 C-terminal no afectó a los niveles de los productos de la RT de HIV-1 en comparación con células control (Figura 4A-B), indicando que CD81 no afecta a la RT de HIV-1 RT en ausencia de SAMHD1.

La actividad dNTPasa de SAMHD1 fue directamente analizada mediante cuantificación del contenido intracelular de dNTPs en lisados de células tras sobreexpresión o depleción de CD81. En paralelo a los efectos observados en la RT viral, el conjunto de dNTP estaba significativamente reducido en las células depletadas para CD81 comparadas con los controles, tanto en Hela/R5 CRISPR/Cas9-CD81 como el linfoblastos T primarios transfectados con CD81 siRNA (Figura 4C). Resultados similares fueron obtenidos cuando células Hela/R5 o linfoblastos T primarios humanos fueron tratados con los péptidos CD81 C-terminal (CD81pept) en comparación con las células control tratadas con el péptido scrambled. De forma contraria, la sobreexpresión de CD81GFP en células Hela/R5 aumentó los niveles de dNTP, mientras que dichos niveles no se afectaron por la sobreexpresión de CD81 Δ cytGFP que fue similar al de las células control GFP (Figura 4D). Estos resultados sugieren que CD81 regula la actividad dNTPasa de SAMHD1.

CD81 regula la degradación de SAMHD1 por el proteasoma y su localización subcelular

A continuación, investigamos el mecanismo por el cual CD81 regularía la actividad de SAMHD1. De manera interesante, la depleción de CD81 aumentaba la expresión de SAMHD1, detectada por inmunoblot de lisados celulares totales o por citometría de flujo, tanto en linfoblastos T primarios silenciados para CD81 (Figura 5A), como en células Hela/R5 carentes de la expresión de CD81 tras transfección con CRISPR/Cas9 (Figura 5A-B). Sin embargo, no se observaron diferencias en la cantidad de SAMHD1 fosforilado en T592 (Figura 5A). Para estudiar si el incremento en la expresión de SAMHD1 estaba relacionado con una degradación alterada de la proteína, tratamos células con los inhibidores MG132, que previene la degradación por el proteasoma, o con cloruro amónico (NH₄Cl), que bloquea la acidificación de los lisosomas. La expresión de SAMHD1 era dos veces superior en células Hela/R5 control tras tratamiento con MG132 (Figura 5C), mientras que fue solo levemente afectada por concentraciones crecientes de NH₄Cl (Figura 5D), indicando que la degradación por proteasoma es la ruta principal para el recambio de SAMHD1. En células CRISPR/Cas9-CD81, la expresión basal de SAMHD1 estaba incrementada, pero el subsecuente incremento tras tratamiento con MG132 estaba completamente abolido (Figura 5C), sugiriendo que CD81 es importante para la degradación de SAMHD1 por el proteasoma. El tratamiento de las células Hela/R5 CRISPR/Cas9-CD81 con NH₄Cl conseguía todavía incrementar levemente la expresión de SAMHD1, sugiriendo que la ruta de degradación lisosomal no se veía afectada, en todo caso ligeramente favorecida tras el bloqueo del proteasoma por la ausencia de CD81 (Figure 5D).

Puesto que la deleción de CD81 aumenta los niveles de expresión de SAMHD1 protegiendo a la enzima de la degradación por el proteasoma (Figura 5); y que el entrecruzamiento de CD81 induce la acumulación de SAMHD1 en la membrana plasmática (Figura 1D), se decidió estudiar si la deleción o bloqueo de CD81 podría afectar a la localización subcelular de SAMHD1. Células Hela/R5 transfectadas con CD81 siRNA o control, fueron sembradas sobre fibronectina durante distintos tiempos, fijadas, permeabilizadas y teñidas para SAMHD1. En ausencia de CD81, SAMHD1 se acumulaba en estructuras citoplásmicas circulares. Estas estructuras sólo se observaban en unas pocas células control, y su tamaño era menor que en células silenciadas para CD81 (Figura 6A y Figura 8A-B). Resultados similares se obtuvieron cuando las células Hela/R5 fueron tratadas con los péptidos CD81 C-terminal (Figura 6B y Figura 8A-B). En concordancia, la presencia de estructuras circulares citoplásmicas enriquecidas en SAMHD1

se vio reducida en células sobreexpresando CD81GFP mientras que no se observaron diferencias entre células Hela/R5 expresando CD81 Δ cytGFP o GFP (Figura 6C y Figura 8C).

Para caracterizar dichas estructuras intracelulares, las células Hela/R5 transfectadas CD81 siRNA o control, fueron co-teñidas con anticuerpos frente a SAMHD1 y marcadores de diferentes compartimentos intracelulares, y analizadas mediante microscopía confocal. No se observó co-localización entre SAMHD1 y marcadores de endosomas tardíos (HGS/HRS), cuerpos multivesiculares (CD63) o lisosomas (LAMP-1) (Figura 6D y Figura 9). Interesantemente, las estructuras intracelulares que acumulaban SAMHD1 colocalizaban parcialmente con EEA1, un marcador de endosomas tempranos. La colocalización SAMHD1/EEA1 se veía aumentada en células silenciadas para CD81 en comparación Hela/R5 control, según se cuantificó mediante el coeficiente de Pearson y la frecuencia de colocalización de SAMHD1 con EEA1 en comparación con la señal total de SAMHD1 (Figura 6D).

En conjunto estos resultados muestran que la delección de CD81 regula la expresión de SAMHD1 protegiendo a la enzima de la degradación por proteasoma mediante su compartimentalización subcelular en endosomas tempranos.

3. Discusión

Se ha mostrado que la tetraspanina CD81 regula la RT de HIV-1 a través de su asociación molecular con SAMHD1 que controla su expresión y localización subcelular. Se muestran evidencias sólidas de la asociación de CD81 con SAMHD1 en linfoblastos T humanos primarios por:

i) precipitación con péptidos sintéticos que contienen la secuencia del dominio C-terminal de CD81 pero no el de otras tetraspaninas (CD9 y CD151), confirmando así la especificidad de unión de SAMHD1 por CD81;

ii) coinmunoprecipitación de las moléculas endógenas CD81 y SAMHD1 en ambos sentidos (inmunoprecipitando CD81 y revelando para SAMHD1 y vice versa) usando condiciones de lisis con detergentes (0.5% NP-40) que deshacen los TEMs, impidiendo conexiones indirectas; y

iii) por ensayos de ligación *in situ* por proximidad. Este último ensayo no demuestra una interacción directa, ya que el rango de distancia es flexible tras tinción con anticuerpo primario

más secundario, pero supone una evidencia firme de que dicha interacción ocurre *in vivo*. Por último, el entrecruzamiento de CD81 con anticuerpos monoclonales frente a CD81 o CD4 induce la acumulación de SAMHD1 cerca de la membrana plasmática de manera CD81-dependiente.

5

SAMHD1 es un inhibidor celular de la RT de HIV-1 en células mieloides en reposo y en linfocitos T CD4⁺ en reposo. Aunque ampliamente estudiada en estos últimos años, los mecanismos que controlan este proceso no se conocen en su totalidad (Ahn, 2016, Functional organization of human SAMHD1 and mechanisms of HIV-1 restriction, *Biol Chem.* 397:373-379; Ballana and Este, 2015, SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction, *Trends Microbiol.* 23:680-692). La fosforilación de SAMHD1 en T592 parece ser importante para el control de la actividad RNasa (Choi *et al.*, 2015, SAMHD1 specifically restricts retroviruses through its RNase activity, *Retrovirology*, 12:46; Cribier *et al.*, 2013, Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1, *Cell Rep.* 3:1036-1043; Ryoo *et al.*, 2014, The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction, *Nat Med.* 20:936-941; Welbourn *et al.*, 2013, Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1, *J Virol.* 87:11516-11524; White *et al.*, 2013, The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation, *Cell Host Microbe*, 13:441-451) y dNTPasa (Pauls *et al.*, 2014, Cell cycle control and HIV-1 susceptibility are linked by CDK6-dependent CDK2 phosphorylation of SAMHD1 in myeloid and lymphoid cells, *J Immunol.* 193:1988-1997; Ruiz *et al.*, 2015, Cyclin D3-dependent control of the dNTP pool and HIV-1 replication in human macrophages, *Cell Cycle.* 14:1657-1665; Tang *et al.*, 2015, Impaired dNTPase activity of SAMHD1 by phosphomimetic mutation of Thr-592, *J Biol Chem.* 290:26352-26359; Yan *et al.*, 2015, CyclinA2-Cyclin-dependent Kinase Regulates SAMHD1 Protein Phosphohydrolase Domain, *J Biol Chem.* 290:13279-13292) de SAMHD1. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que dicha fosforilación no puede explicar en su totalidad el efecto restrictivo de SAMHD1 (Antonucci *et al.*, 2016, SAMHD1-mediated HIV-1 restriction in cells does not involve ribonuclease activity, *Nature medicine*, 22:1072-1074; Bhattacharya *et al.*, 2016, Effects of T592 phosphomimetic mutations on tetramer stability and dNTPase activity of SAMHD1 cannot explain the retroviral restriction defect, *Scientific reports*, 6:31353). La actividad exonucleasa de SAMHD1 es también controvertida, y algunos estudios recientes indican que no está relacionada con su función en restricción viral (Antonucci *et al.*, 2016, SAMHD1-mediated

10
15
20
25
30

HIV-1 restriction in cells does not involve ribonuclease activity, *Nature medicine*, 22:1072-1074; Welbourn and Strebel, 2016, Low dNTP levels are necessary but may not be sufficient for lentiviral restriction by SAMHD1, *Virology*, 488:271-277). Dicha actividad exonucleasa podría deberse incluso a contaminantes en la muestra (Seamon *et al.*, 2015, SAMHD1 is a single-stranded nucleic acid binding protein with no active site-associated nuclease activity, *Nucleic Acids Res.* 43:6486-6499). En ausencia de CD81 observamos que se induce la expresión de SAMHD1 y su actividad dNTPasa está aumentada, sin efectos notorios en los niveles de fosforilación de SAMHD1. Estos resultados indican claramente que CD81 es un regulador importante en la restricción de la replicación de HIV-1 por SAMHD1. Cuando la expresión de CD81 se depleciona la expresión de SAMHD1, y por lo tanto su actividad dNTPasa de SAMHD1 aumenta, reduciendo los niveles intracelulares de dNTPs, e impidiendo la RT de HIV-1. Por el contrario, cuando se sobreexpresa CD81, la expresión, y por tanto la actividad de SAMHD1 está reducida, el contenido celular de dNTs es mayor, permitiendo un enorme incremento en la RT de HIV-1. Además, el dominio C-terminal de CD81 es esencial en este proceso, como se demuestra mediante el uso de un mutante de delección C-terminal o de péptidos bloqueantes con la secuencia de la región C-terminal de CD81.

En resumen, CD81 regula la replicación temprana de HIV-1 a través de su asociación directa con SAMHD1 y la regulación de su actividad dNTPasa, a través de la modulación de su expresión y el control de su localización subcelular. La evidencia de que SAMHD1 está incluida en TEMs pone de relevancia la importancia de estos microdominios de membrana durante la replicación de HIV-1, no sólo en las fases de entrada y ensamblaje, pero también en la fase de RT del ciclo viral.

REIVINDICACIONES

1. Uso de agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante,
5 donde los agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 se selecciona del grupo que consiste en
 - (i) ARN pequeño de interferencia (ARNips) complementario al ARNm de la proteína CD81;
 - 10 (ii) péptidos que comprenden la secuencia CCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 10);
 - (iii) anticuerpos que reconocen específicamente el dominio C-terminal de la proteína CD81, donde el dominio C-terminal de la proteína CD81 es la secuencia CCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 10); y
 - (iv) vectores para terapia génica y para la eliminación funcional del gen que codifica para
15 la proteína CD81 que comprenden el sistema CRISPR/Cas9;donde las enfermedades en las que el volumen de dNTPs es relevante se selecciona de entre el grupo que consiste en infecciones causadas por retrovirus, infecciones causadas por virus DNA e infecciones causadas por virus DNA que tienen en su ciclo viral pasos de retrotranscripción.
20
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que las infecciones causadas por retrovirus se seleccionan del grupo que consiste en infecciones causadas por VIH y HTLV.
- 25 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que las infecciones causadas por virus DNA se seleccionan del grupo que consiste en infecciones causadas por virus del herpes simple tipo I (VHS-1), virus del herpes simple tipo II (VHS-2), herpes virus humano 3, herpes virus humano 4, herpes virus humano 5, herpes virus humano 6, herpes virus humano 7 y herpes virus humano 8.
- 30 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que las infecciones causadas por virus DNA que tienen en su ciclo viral pasos de retrotranscripción se seleccionan del grupo que consiste en infecciones causadas por el virus de la Hepatitis B.

5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el ARN pequeño de interferencia se selecciona del grupo que consiste en secuencias que comprenden o, alternativamente, consisten en CAATTTGTGT CCCTCGGGC (SEQ ID NO.: 3), CACCTTCTATGTAGGCATC (SEQ ID NO.: 8) y CACGTGCGCCTTCAACTGTA (SEQ ID NO.: 9).

5

6. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, caracterizado por que el vector para terapia génica que comprende el sistema CRISPR/Cas9 comprende como secuencia diana una secuencia que comprende o, alternativamente consiste en, CACCGGCTGGCTGGAGGCGTGATCCGT (SEQ ID NO.: 11) o CACCGGCGCCCAACACCTTCTATGTGT (SEQ ID NO.: 12).

10

7. Método de cribado para identificar agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 que comprende las etapas de:

a) Seleccionar agentes candidatos, preferiblemente a partir de una librería de compuestos;

15

b) Determinar si alguno de dichos agentes es capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 en células que expresan ambas proteínas;

c) Seleccionar aquellos agentes que promueven la reducción/inhibición descrita en el paso b); y,

20

d) Opcionalmente, producir aquellos agentes seleccionados en el paso c).

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que el agente candidato capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 se selecciona del grupo que consiste en ARN pequeño de interferencia (ARNip) que interfiere con la expresión del gen que codifica para la proteína CD81, micro ARN (miARN), shARN, péptidos, pequeñas moléculas, anticuerpos y vectores para terapia génica y para la eliminación funcional del gen que codifica para la proteína CD81 que comprenden el sistema CRISPR/Cas9.

25

9. Combinación de medicamentos para el tratamiento de la infección causada por el VIH que comprende al menos tres medicamentos seleccionados de por lo menos dos clases diferentes de medicamentos para tratar la infección causada por el VIH, caracterizado porque la combinación comprende al menos un medicamento perteneciente a la clase de medicamentos inhibidores de la transcriptasa inversa análogo de los nucleósidos, en el que dicho

30

medicamento es un agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1,

donde el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 se selecciona del grupo que consiste en

- 5 (i) ARN pequeño de interferencia (ARNips) complementario al ARNm de la proteína CD81;
- (ii) péptidos que comprenden la secuencia CCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 10);
- (iii) anticuerpos que reconocen específicamente el dominio C-terminal de la proteína CD81, donde el dominio C-terminal de la proteína CD81 es la secuencia
- 10 CCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 10); y
- (iv) vectores para terapia génica y para la eliminación funcional del gen que codifica para la proteína CD81 que comprenden el sistema CRISPR/Cas9.

10. La combinación de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada por que el ARN

15 pequeño de interferencia se selecciona del grupo que consiste en secuencias que comprenden o, alternativamente, consisten en CAATTTGTGT CCCTCGGGC (SEQ ID NO.: 3), CACCTTCTATGTAGGCATC (SEQ ID NO.: 8) y CACGTGCCTTCAACTGTA (SEQ ID NO.: 9).

11. La combinación de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada por que el vector para

20 terapia génica que comprende el sistema CRISPR/Cas9 comprende como secuencia diana una secuencia que comprende o, alternativamente consiste en, CACCGGCTGGCTGGAGGCGTGATCCGT (SEQ ID NO.: 11) o CACCGGCGCCCAACACCTTCTATGTGT (SEQ ID NO.: 12).

25 12. El uso de agentes capaces de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la enfermedad en la que el volumen de dNTPs es relevante es la infección por VIH y por qué el agente capaz de reducir/inhibir la asociación de la tetraspanina CD81 con la enzima SAMHD1 se selecciona del grupo que consiste en ARN pequeño de interferencia seleccionado del grupo que consiste en

30 secuencias que comprenden o, alternativamente, consisten en CAATTTGTGT CCCTCGGGC (SEQ ID NO.: 3), CACCTTCTATGTAGGCATC (SEQ ID NO.: 8) y CACGTGCCTTCAACTGTA (SEQ ID NO.: 9), un péptido que comprende o, alternativamente, consiste en la secuencia CCGIRNSSVY (SEQ ID NO.: 10) y un vector para terapia génica que comprende el sistema

CRISPR/Cas9 comprende como secuencia diana una secuencia que comprende o, alternativamente consiste en, CACCGGCTGGCTGGAGGCGTGATCCGT (SEQ ID NO.: 11) o CACCGGCGCCCAACACCTTCTATGTGT (SEQ ID NO.: 12).

Figura 1

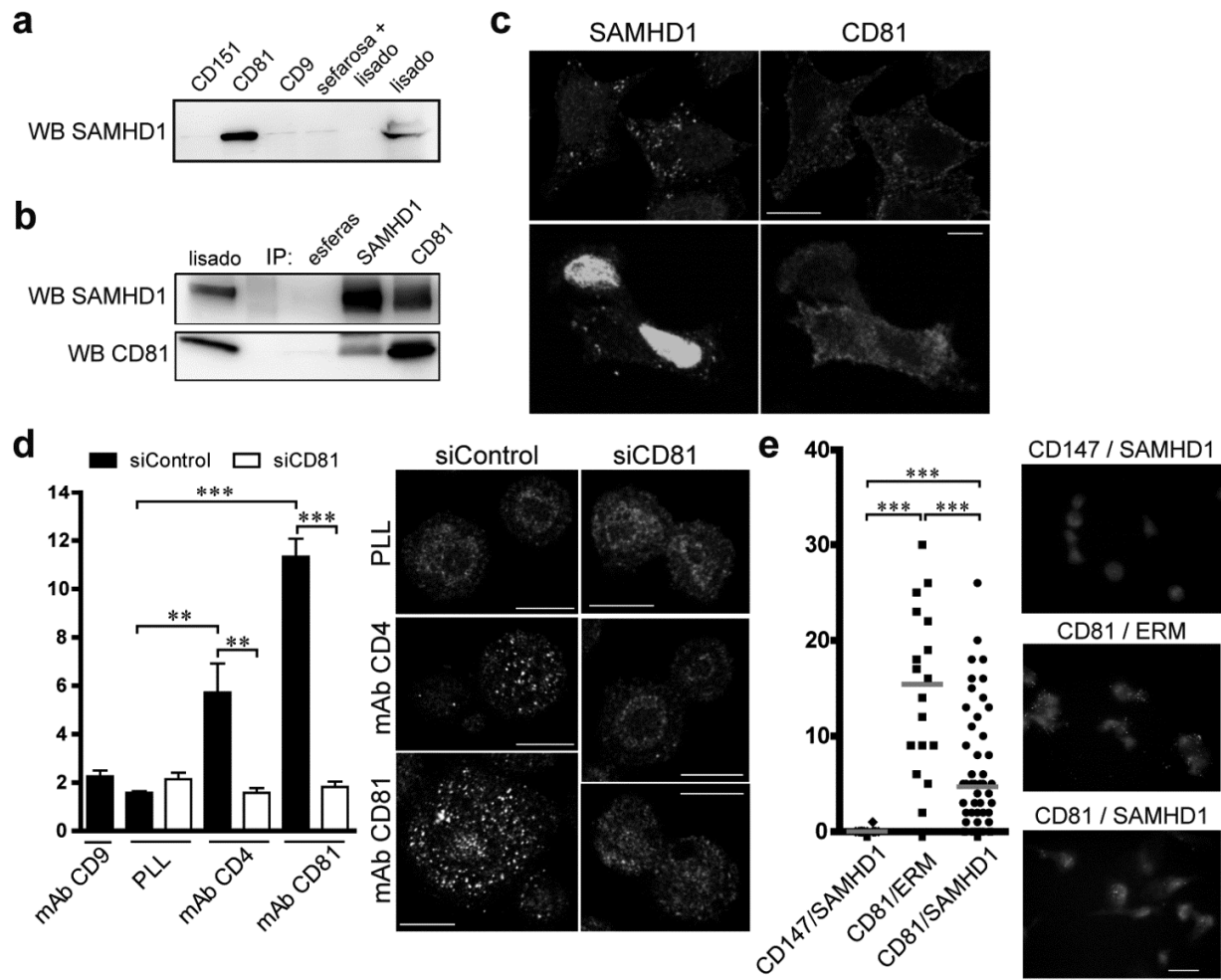


Figura 2

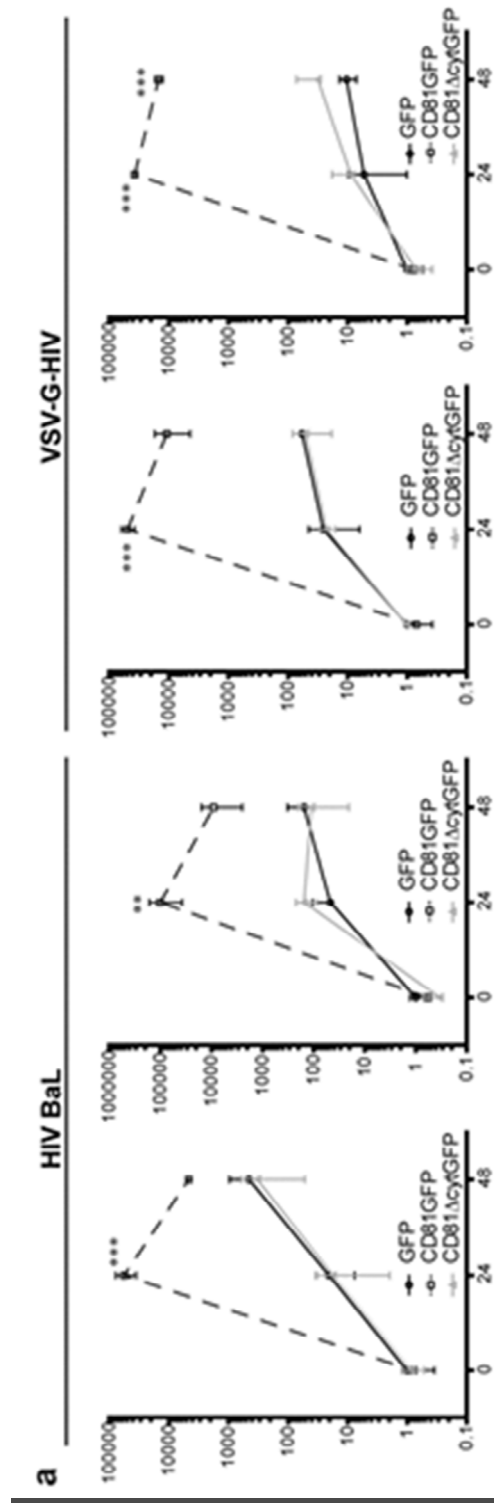


Figura 2 (continuación)

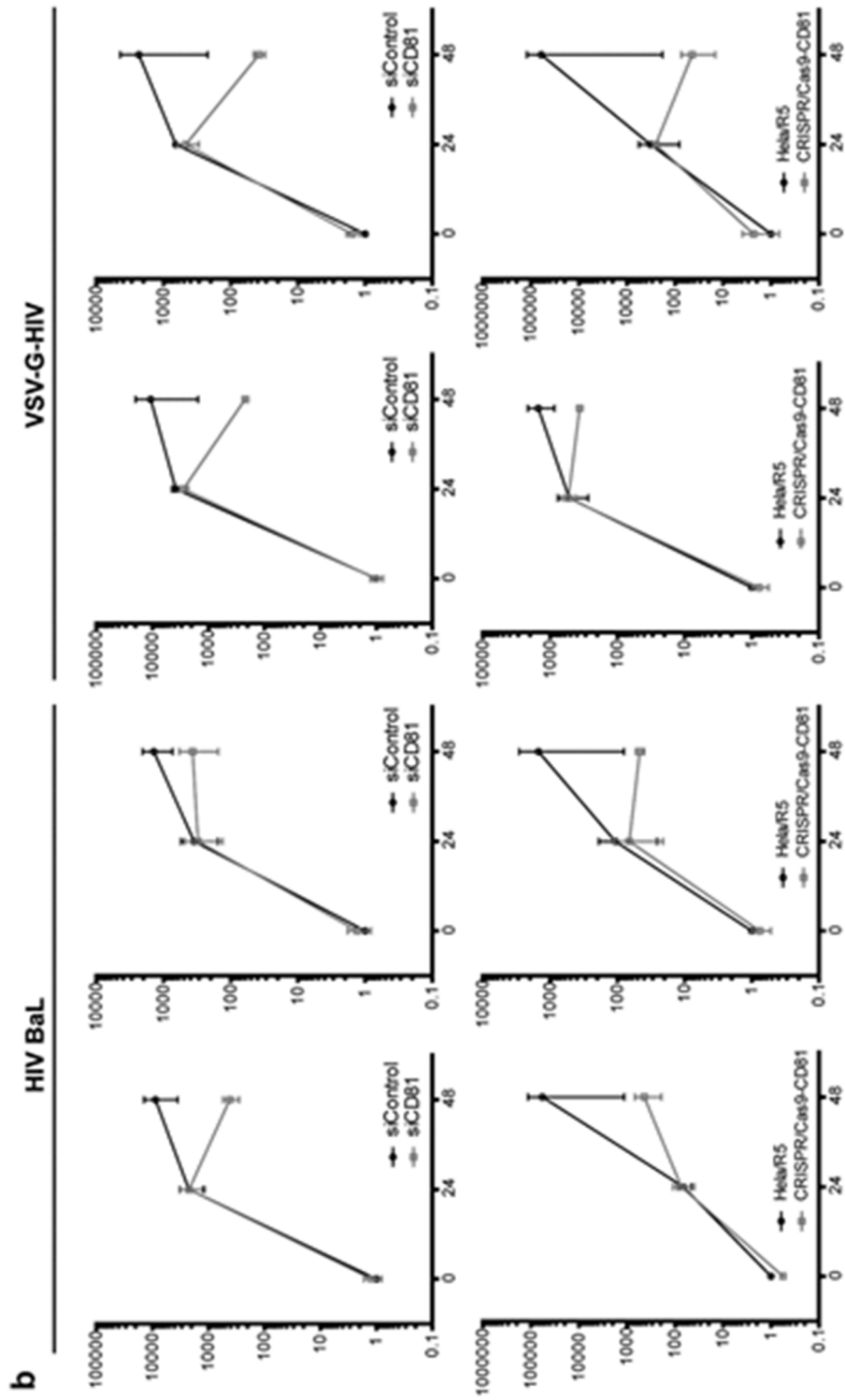


Figura 2 (continuación)

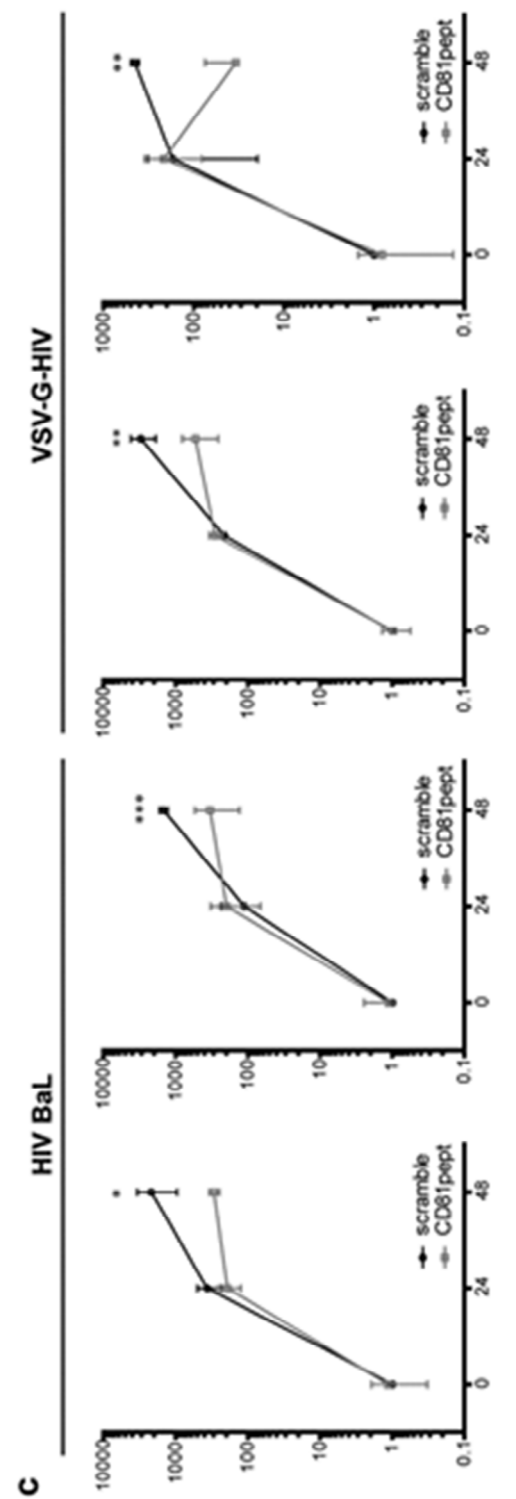


Figura 3

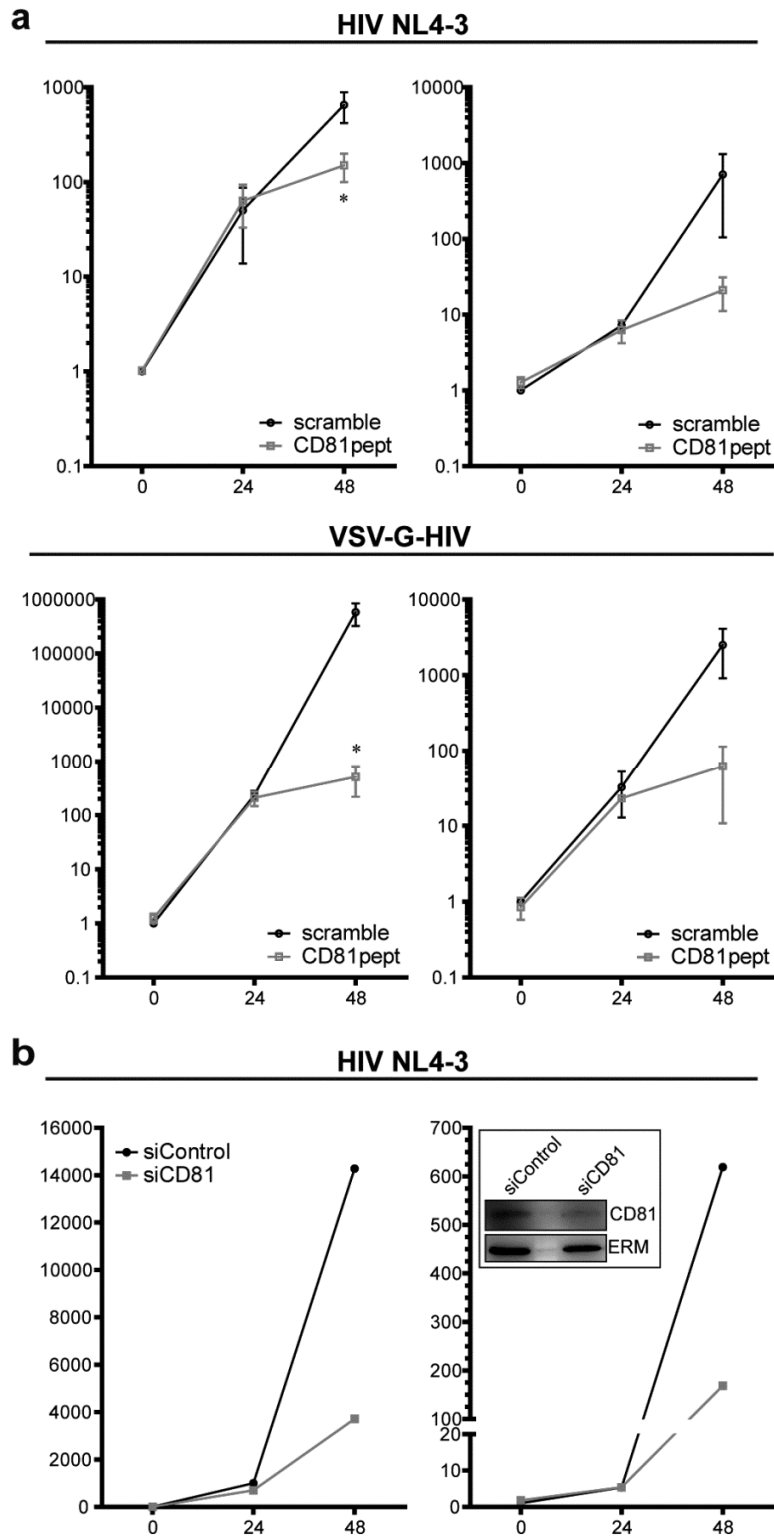


Figura 4

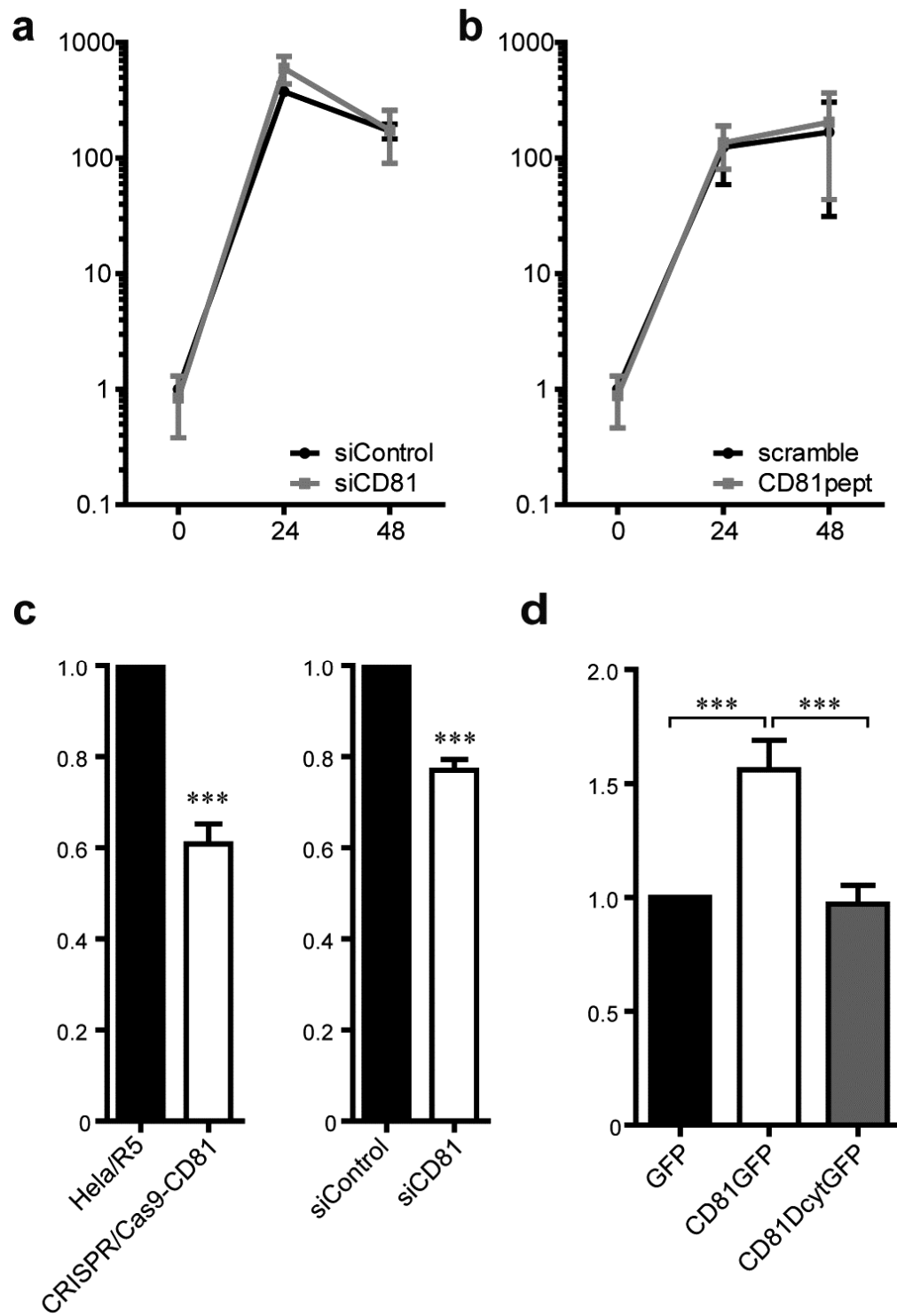


Figura 5

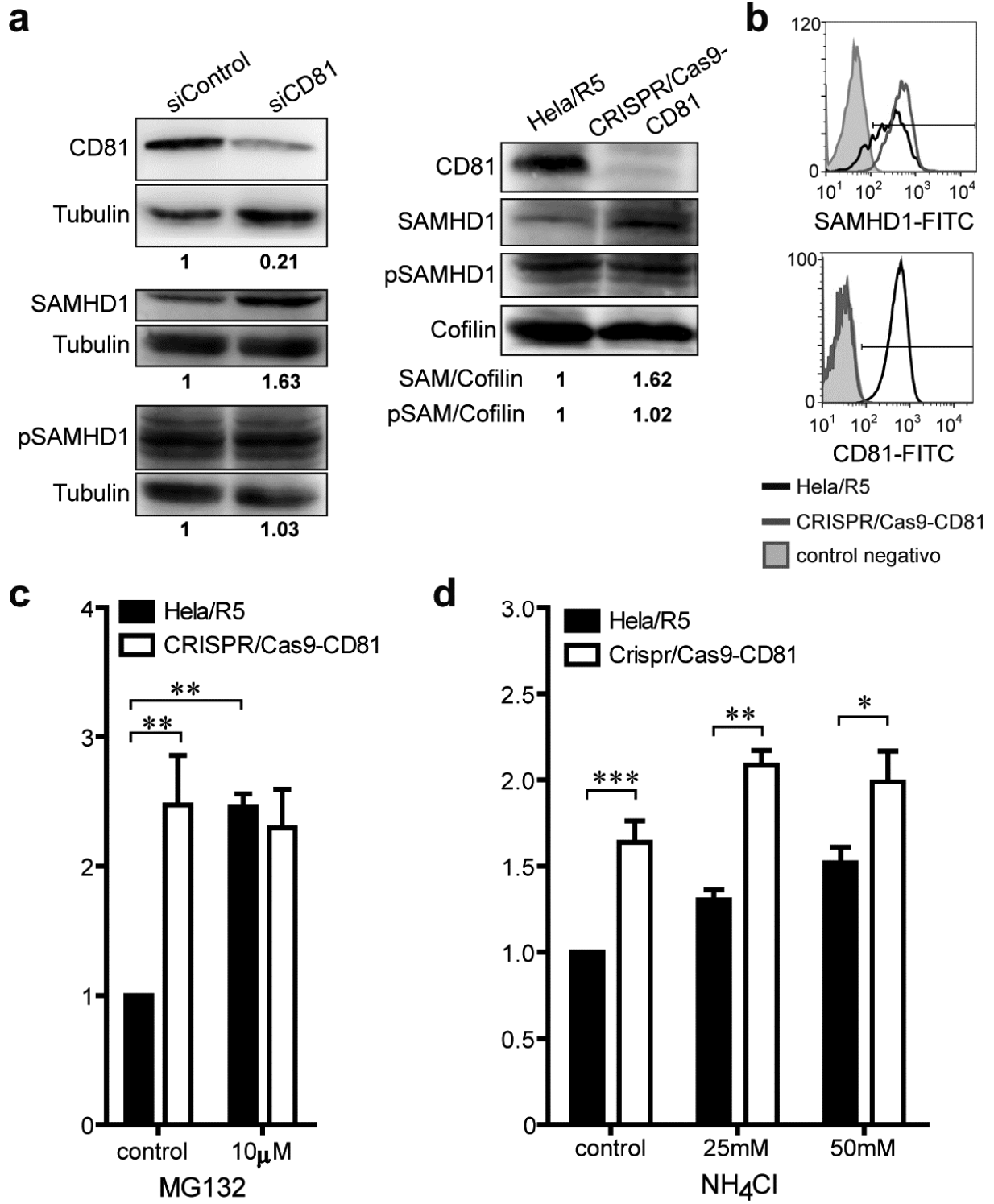


Figura 6

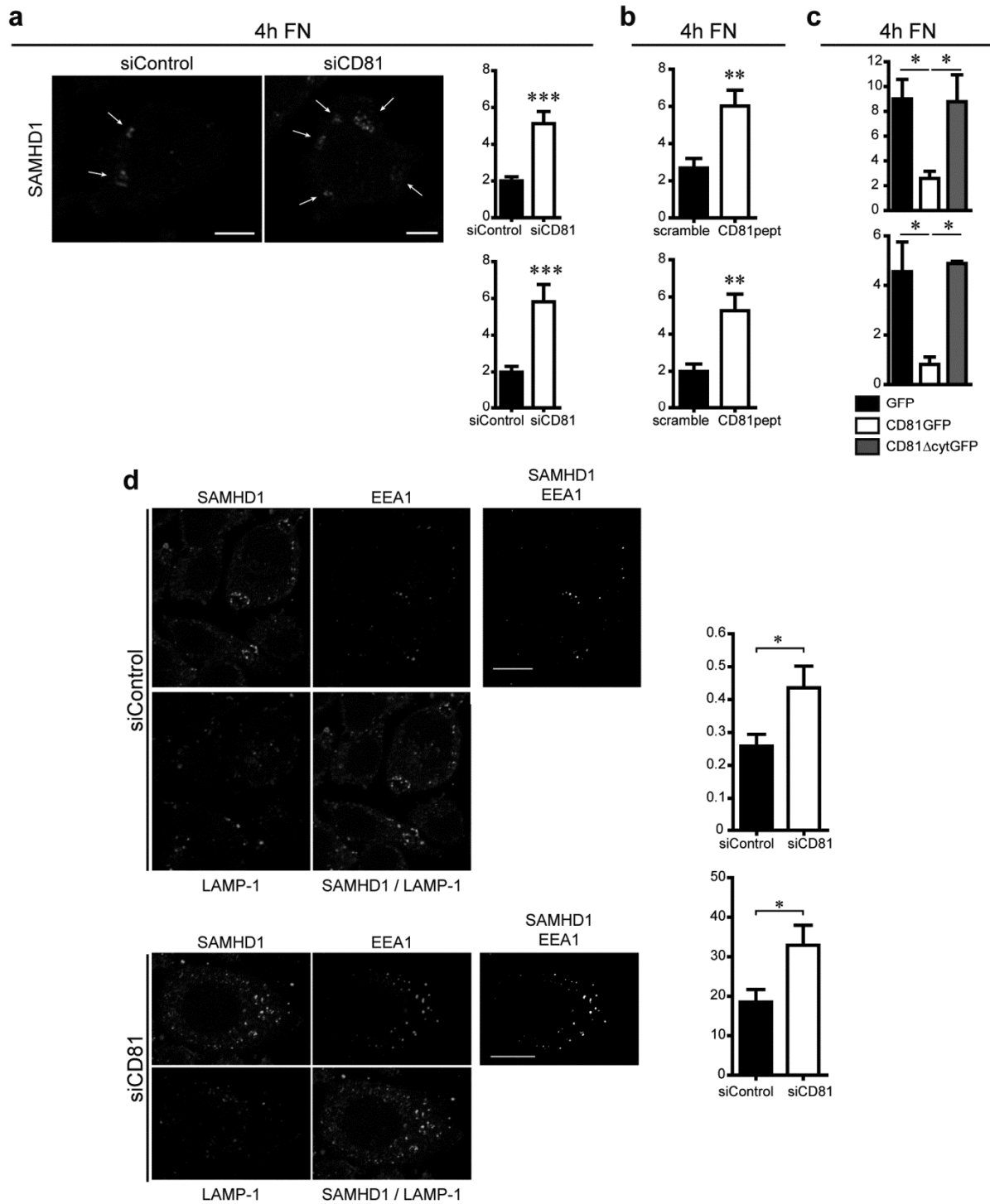


Figura 7

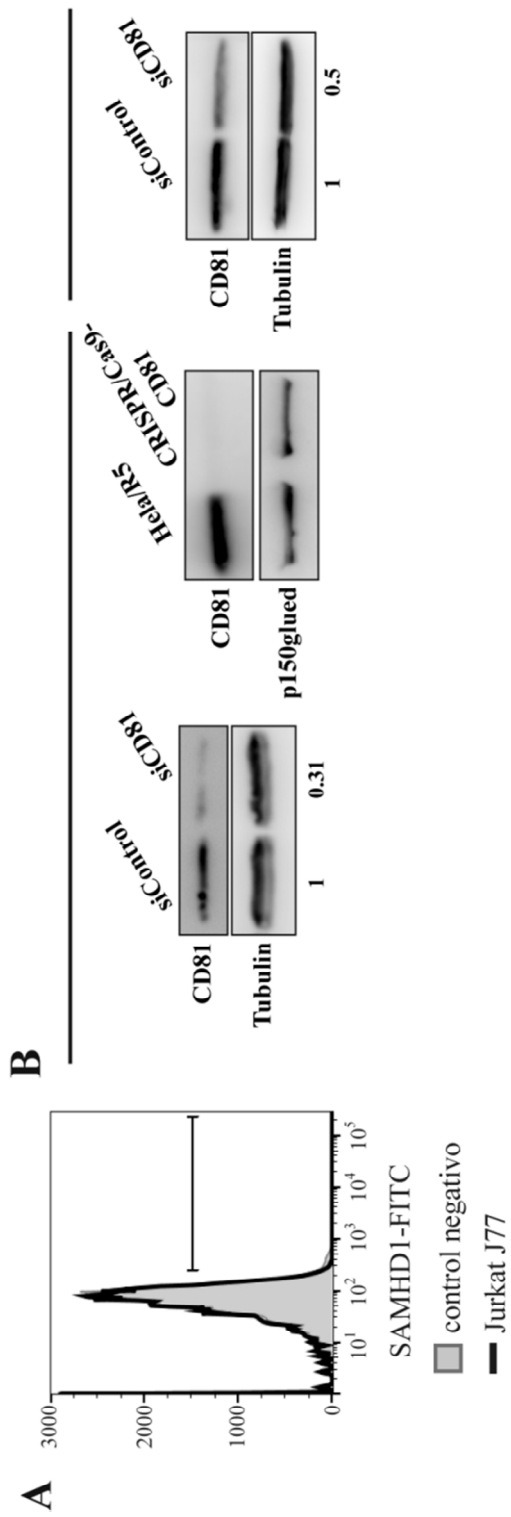


Figura 7 (continuación)

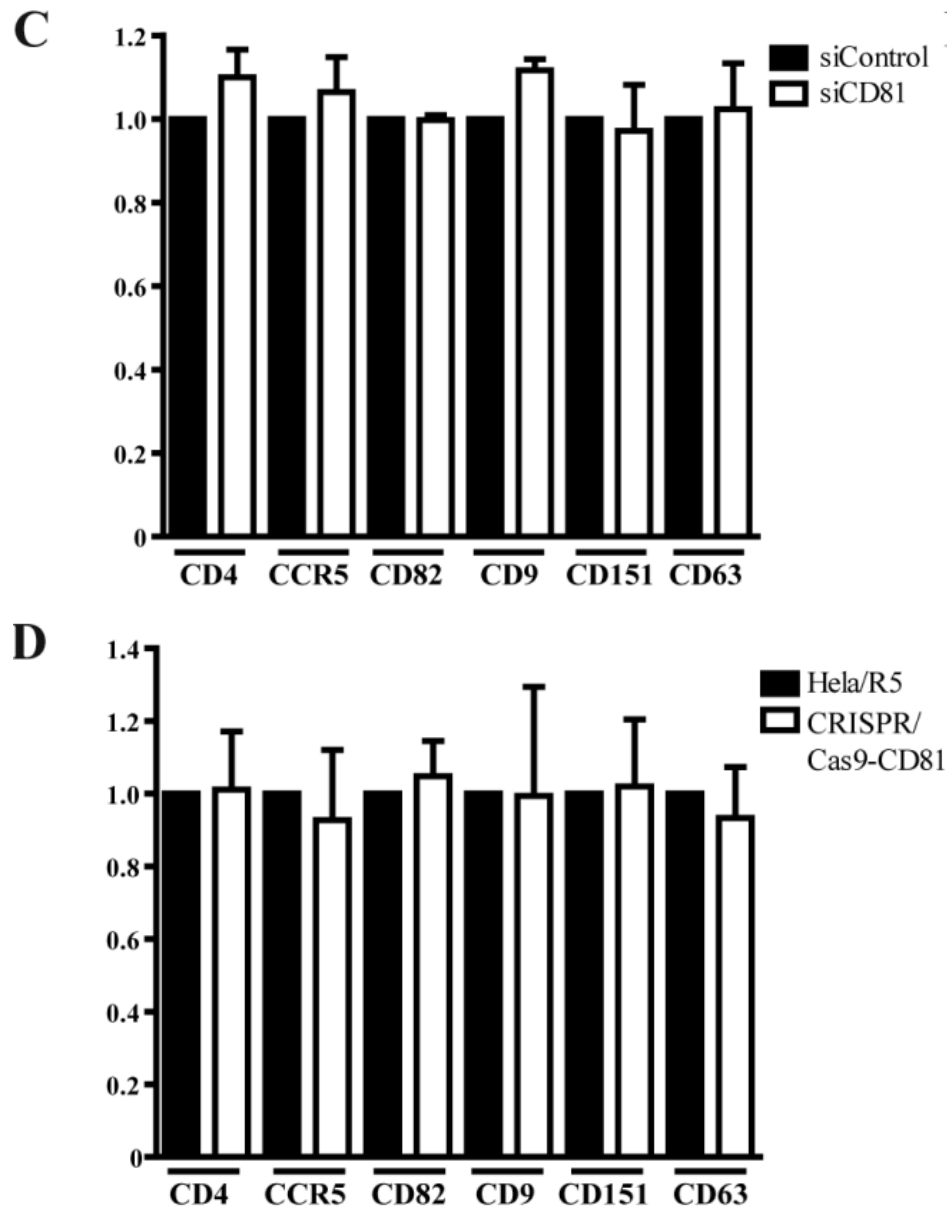


Figura 8

a

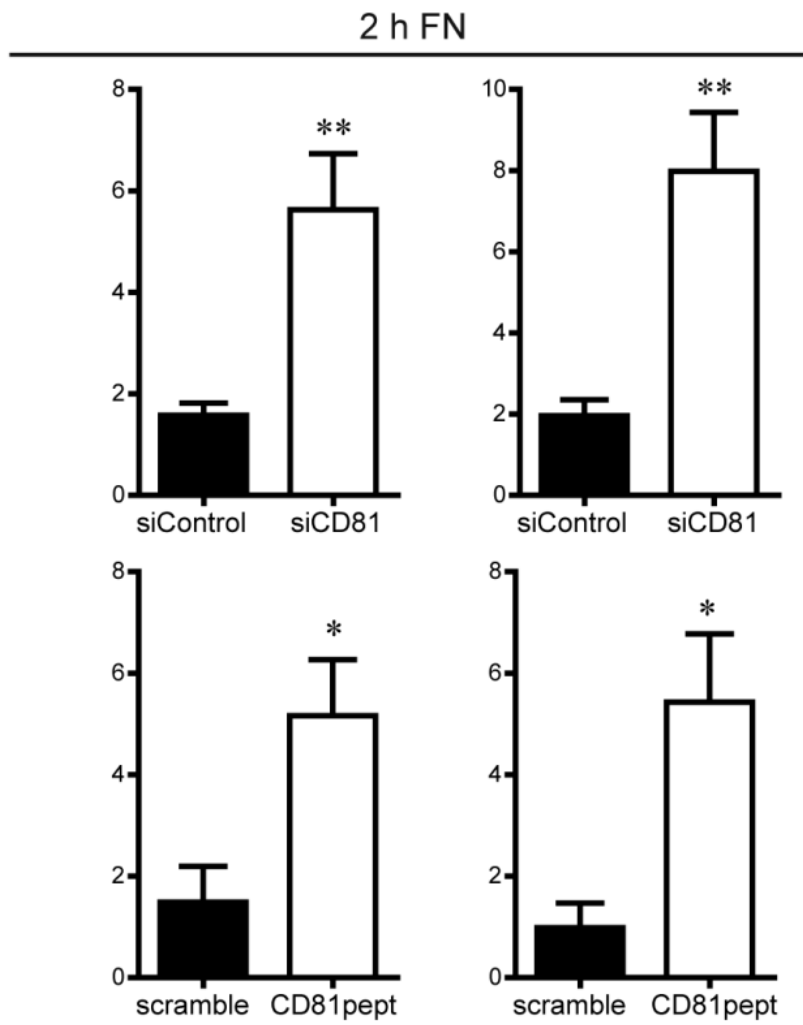
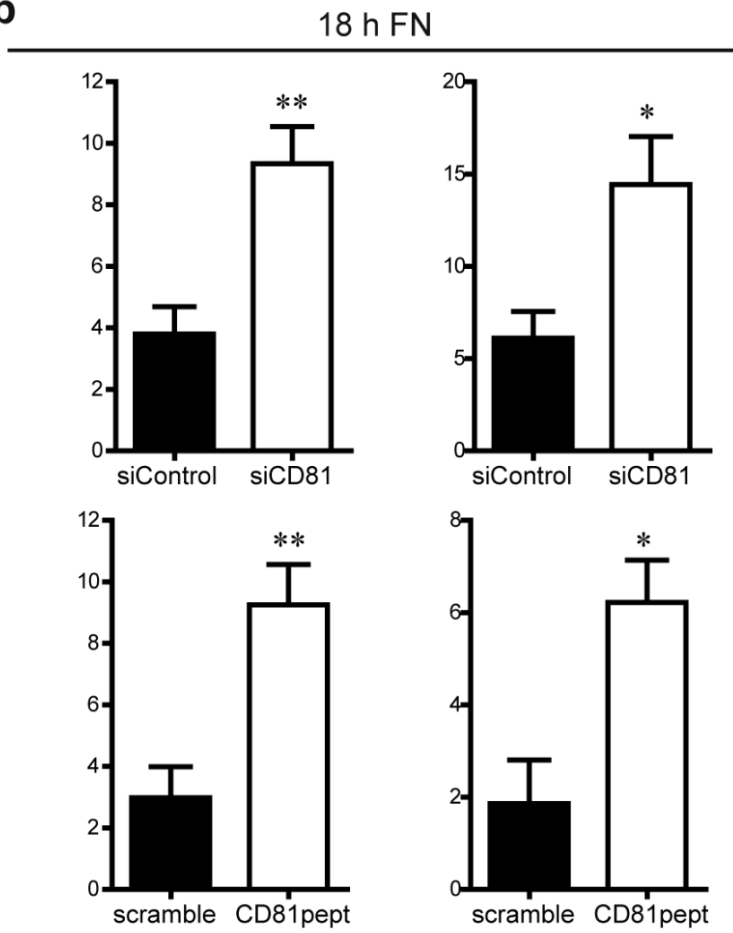


Figura 8 (continuación)

b



c

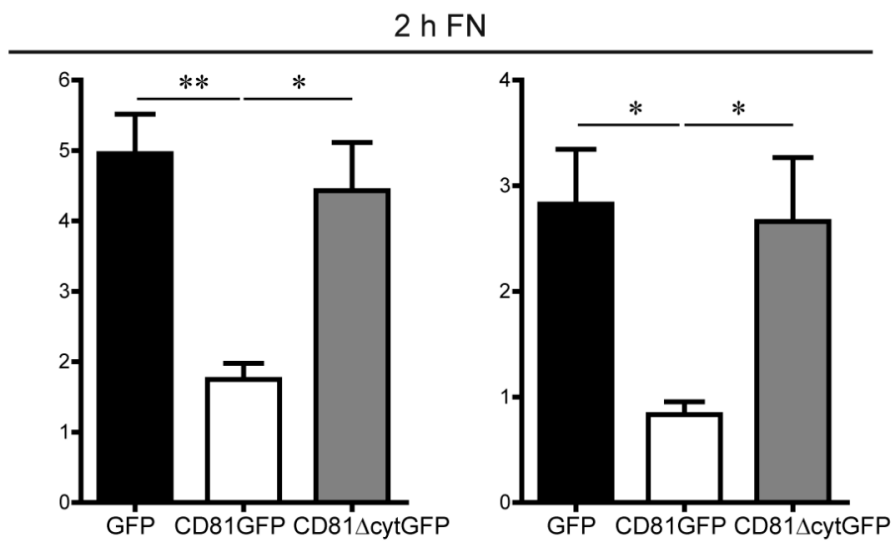
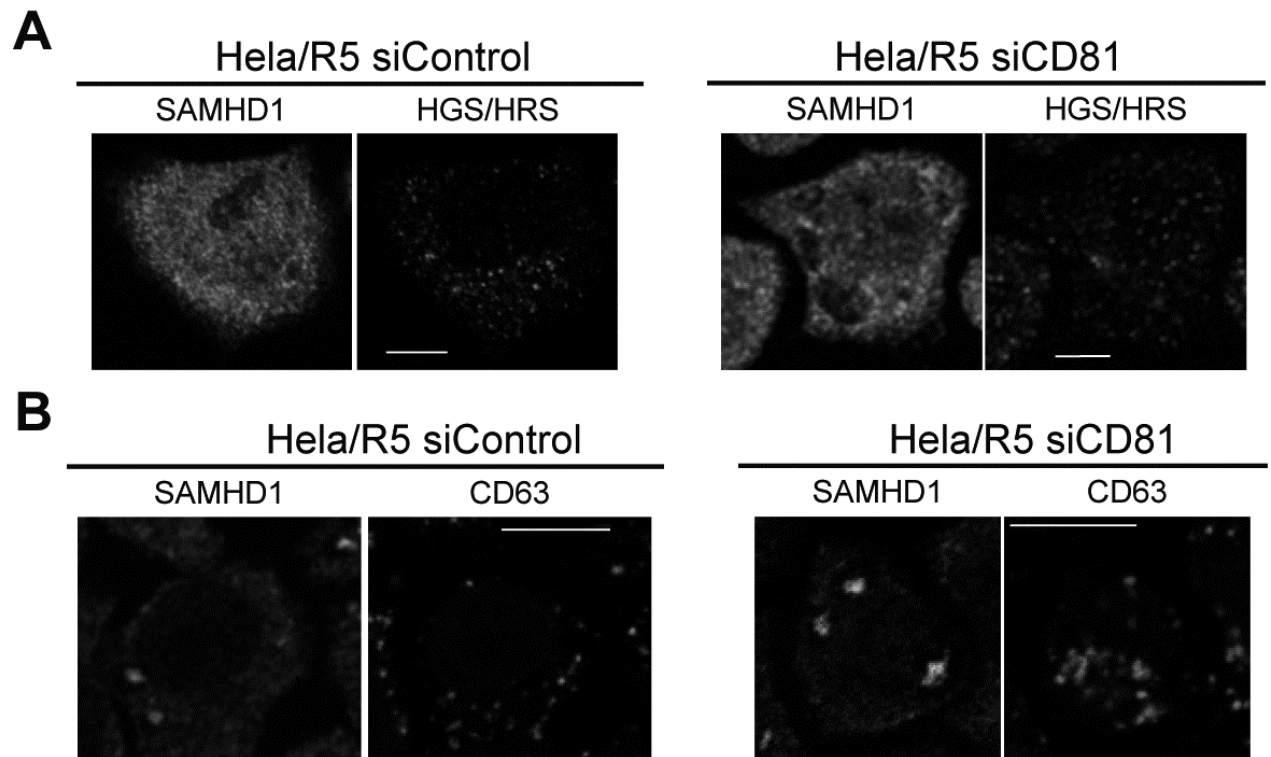


Figura 9



Listado de secuencias

<110> UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
Fundación del Hospital de la Princesa

<120> Uso de CD81 como diana terapéutica para regular los niveles intracelulares de dNTPs

<130> 901 949

<160> 13

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD81pept

<400> 1

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys Cys Gly Ile Arg Asn Ser Ser Val
1 5 10 15
Tyr

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Scrambled

<400> 2

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Tyr Ser Val Asn Ile Cys Arg Gly Cys
1 5 10 15
Ser Ser

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siCD81

<400> 3

caatttggtg ccctcgggc 19

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

caggattctt gcctggagct g 21

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 5
 ggagcagcag gaagcactat g 21

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 6
 tgtgtgccccg tctgttgtgt 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 7
 cgagtcctgc gtcgagagat 20

<210> 8
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ARNip

<400> 8
 caccttctat gtaggcac 19

<210> 9
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ARNip

<400> 9
 cacgtcgcct tcaactgta 19

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Péptido CD81

<400> 10

Cys Cys Gly Ile Arg Asn Ser Ser Val Tyr
1 5 10

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Secuencia diana CRISP/Cas9

<400> 11

caccggctgg ctggaggcgt gatccgt

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Secuencia diana CRISP/Cas9

<400> 12

caccggcgcc caacaccttc tatgtgt

27

<210> 13

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siControl

<400> 13

aaucucccg aacgugucac gu

22