

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 595**

51 Int. Cl.:

C07K 7/04 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015 PCT/EP2015/054968**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15135942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015 E 15709163 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3116893**

54 Título: **Un péptido químico que interactúa con los gangliósidos de la membrana celular**

30 Prioridad:

11.03.2014 EP 14305353

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

29.04.2020

73 Titular/es:

**FANTINI, JACQUES (50.0%)
51 Bd Elie Corradi
13240 Septèmes-les-Vallons, FR y
YAHY, NOUARA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FANTINI, JACQUES y
YAHY, NOUARA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 757 595 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un péptido quimérico que interactúa con los gangliósidos de la membrana celular

La presente invención se refiere a un péptido quimérico que interactúa con los glucolípidos de la superficie celular y tiene aplicaciones terapéuticas en trastornos neurodegenerativos, enfermedades infecciosas y cánceres.

5 Antecedentes de la invención

Los glucolípidos de la membrana plasmática sirven como principales sitios de unión para una amplia gama de proteínas infecciosas y amiloides (Fantini, 2003). Por ejemplo, tanto los gangliósidos GM1 como los GM3 han estado implicados en la fisiopatología de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Oikawa *et al*, 2009; Wu *et al*, 2012).

10 En un estudio reciente de la especificidad de unión a glucolípidos de la α -sinucleína, la proteína asociada con la enfermedad de Parkinson, Fantini *et al*. identificaron el fragmento 34-45 de la proteína como el dominio de unión a glucolípidos activo más corto (Fantini y Yahí, 2011a). Este motivo lineal corto de 12 restos de aminoácidos confiere a la proteína una alta especificidad de interacción por GM3, un gangliósido expresado preferentemente por astrocitos. Este motivo comparte homología estructural con el fragmento 5-16 del péptido β -amiloide de Alzheimer ($A\beta$). Pero el dominio de unión a glucolípidos de $A\beta$ no reconoce GM3 sino GM1, un gangliósido expresado abundantemente a nivel
15 de membranas post-sinápticas.

Compendio de la invención

Los autores de la presente invención han descifrado ahora el código bioquímico que controla la especificidad de unión con glucolípidos de $A\beta$ y α -sinucleína y han creado un péptido quimérico que muestra las propiedades de unión de gangliósidos de ambas proteínas.

20 Por tanto la presente invención proporciona un péptido que comprende

- a) secuencia de aminoácidos E-X1X2X3-YVGHH-X4 (SEQ ID NO: 9),
en donde al menos uno de X1, X2 o X3, que es un resto glicina o serina, mientras que el otro o los otros de X1, X2 o X3 son cualquier aminoácido; y
X4 es una treonina o glutamina;
- 25 b) una secuencia derivada de SEQ ID NO: 9 mediante una o más modificaciones químicas que protegen el péptido contra la proteólisis, como se describe en la reivindicación 1,

El péptido tiene de 10 a 30 aminoácidos.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un péptido, que preferiblemente comprende de 12 a 20 aminoácidos, que comprende

- 30 a) la secuencia de aminoácidos EGVLYVGHHT (SEQ ID NO: 1), o
b) una secuencia derivada de SEQ ID NO: 1 mediante una o más modificaciones químicas que protegen el péptido contra la proteólisis, como se define en la reivindicación 2.

Un péptido preferido consiste en KEGVLYVGHHTK (SEQ ID NO: 3).

35 Tal péptido es útil para prevenir o tratar cualquier afección que implique gangliósidos como sitios receptores de la superficie celular, incluidos trastornos neurodegenerativos, enfermedades infecciosas o tumores.

Otro sujeto de la invención es un ácido nucleico que codifica el péptido quimérico como se define en el presente documento. Otro sujeto más de la invención es un vector que comprende dicho ácido nucleico, que es preferiblemente un vector adenovirus o lentivirus.

Leyendas de las figuras

40 Las Figuras 1A y 1B muestran que tanto los restos His-13 como His-14 están implicados en la unión de $A\beta$ 5-16 a GM1.

A. Se preparó una monocapa de gangliósido GM1 a una presión superficial inicial de $17,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Después del equilibrado, los péptidos de tipo salvaje $A\beta$ 5-16 (cuadrados abiertos), o mutante $A\beta$ 5-16/H13A (triángulos rellenos), $A\beta$ 5-16/ H14A (círculos rellenos), $A\beta$ 5-16/H13A/H14A (triángulos abiertos) se inyectaron en la subfase acuosa por debajo de la monocapa. Los datos muestran la evolución de la presión superficial después de la inyección de péptidos (10 μM) en la subfase acuosa por debajo de la monocapa. Cada experimento se realizó por triplicado y se muestra una curva representativa (D.E. < 10%). B. Modelo molecular de $A\beta$ 5-16 que interactúa con dos moléculas de GM1 dispuestas en un receptáculo caliciforme.

45

La Figura 1C muestra interacciones moleculares entre el péptido quimérico α -syn34-45/HH y un dímero de GM1 en forma de cáliz.

Figura 2: La introducción de los restos de His dentro del SBD de α -syn no altera el reconocimiento de GM3 y aumenta su afinidad por GM1.

5 Paneles izquierdos. Cinética de interacción de α -syn 34-45 de tipo silvestre (triángulos rellenos) y α -syn34-45/HH mutante doble (cuadrados abiertos) con una monocapa de GM3 (A) o GM1 (C). En cada caso, la monocapa se preparó a una presión superficial inicial de $17,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestra una curva representativa (D.E. < 15%).

10 Paneles derechos. Interacción de α -syn34-45 de tipo silvestre (triángulos rellenos) y doble mutante α -syn34-45/HH (cuadrados abiertos) con monocapas de GM3 (B) o GM1 (D) preparadas a varios valores de la presión superficial inicial. El aumento máximo de la presión superficial ($\Delta\pi_{\text{max}}$) fue determinado después de alcanzar el equilibrio. La presión crítica de inserción se indica mediante la intersección de las pendientes con el eje x.

Las Figuras 3A y 3B muestran el modelado molecular de los péptidos α -syn34-45 de tipo silvestre y quiméricos.

15 A. Visualización de la superficie potencial electrostática positiva de los péptidos de tipo silvestre (panel izquierdo) o quiméricos α -syn34-45/HH (panel derecho). B. Simulaciones de modelado molecular de los péptidos de tipo silvestre (panel izquierdo) o quiméricos α -syn34-45/HH (panel derecho) que interactúan con un monómero o un dímero de gangliósido GM1.

Las Figuras 4A y 4B muestran la validación experimental de los estudios de modelado molecular del complejo α -syn34-45/HH-GM1.

20 A. Interacción del péptido quimérico α -syn34-45/HH con GD1a (cuadrados rellenos), GM1 (cuadrados abiertos), asialo-GM1 (triángulos rellenos), LacCer (círculos abiertos) y GlcCer (triángulos abiertos) en el ensayo de monocapa (las condiciones experimentales fueron las mismas que las de la Figura 1A).

B. Interacción de α -syn34-45/HH con monocapas mixtas de GM1:colesterol o GM1:fosfatidilcolina (1:1, mol:mol).

25 Figura 4C: determinación de la presión crítica de inserción de α -syn34-45/HH para monocapas de GM1. Se prepararon monocapas de GM1 a diversos valores de la presión superficial inicial π_i y se sondaron con el péptido quimérico α -syn34-45/HH añadido en la subfase acuosa. El aumento máximo de la presión superficial $\Delta\pi_{\text{max}}$ se registró en el equilibrio. La presión crítica de inserción π_c ($37,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) se determina como la intersección de la pendiente de la regresión lineal con el eje x.

Figura 5: Efecto de α -syn34-45/HH o α -syn34-45 sobre la formación de poros amiloides.

30 A. En un primer experimento, las células SH-SY5Y se trataron con péptido A β 1-42 (220 nM) y se analizó la fluorescencia dependiente de Ca^{2+} (curva superior). En una segunda serie de experimentos, A β 1-42 y el péptido quimérico α -syn34-45/HH (ambos 220 nM) se mezclaron inyectados directamente en las células de forma extemporánea (curvas C1 y C2 correspondientes a dos experimentos distintos). La curva C3 corresponde a la respuesta del calcio inducida por el péptido quimérico solo. Los resultados se expresan como media \pm D.E. (n = 100).
35 En el panel B, se usaron los mismos colores pero el péptido quimérico se reemplazó por el péptido α -syn34-45 de tipo silvestre.

40 Figura 6: Cinética del pasaje transendotelial del péptido quimérico α -syn34-45/HH a través de una monocapa de células bEnd-3 puras. Las células se cultivaron en el filtro de una cámara de cultivo de dos compartimentos hasta formar una monocapa ajustada con una resistencia eléctrica transendotelial $> 100 \Omega\cdot\text{cm}^2$. En el tiempo 0, el péptido (600 μM) se inyectó en el compartimento inferior y su aparición en el compartimento superior se determinó cuantitativamente mediante espectrofotometría.

45 Figura 7: Cinética del pasaje transendotelial del péptido quimérico α -syn34-45/HH a través de una monocapa de células bEnd-3 que habían sido cocultivadas con células C6. En este caso, las células bEnd-3 se cultivaron en el filtro de una cámara de cultivo de dos compartimentos en presencia de células gliales C6 cultivadas en la pared de plástico del compartimento inferior. Cuando las células bEnd-3 habían formado una monocapa ajustada con una resistencia eléctrica transendotelial $> 100 \Omega\cdot\text{cm}^2$, el filtro se transfirió a nuevas placas de cultivo y el experimento se realizó sin células C6. En el tiempo 0, el péptido (600 μM) se inyectó en el compartimento inferior y su aparición en el compartimento superior se determinó cuantitativamente por espectrofotometría.

50 Figura 8: Cinética del pasaje transendotelial del péptido quimérico α -syn34-45/HH a través de una monocapa de células bEnd-3 que habían sido cocultivadas con células CTX. El mismo experimento que se ha descrito en la Figura 7, pero con células bEnd3 inicialmente cocultivadas en presencia de células CTX astrocíticas.

Figura 9: Cinética del pasaje transendotelial del péptido quimérico α -syn34-45/HH a través de tres modelos *in vitro* de la barrera hematoencefálica. Los modelos celulares de la barrera hematoencefálica fueron: células bEnd-3 solas (b), células bEnd-3 cocultivadas con células C6 (c), o células bEnd-3 cocultivadas con células C6 (d). Se realizó en paralelo

un experimento de control (a) sin péptido agregado (en este caso, se agregó el mismo volumen de PBS a las células). Los histogramas muestran la concentración del péptido quimérico α -syn34-45/HH que ha cruzado la barrera, después de 1 hora (A) o 24 horas (B).

5 Figura 10: Cinética del pasaje transendotelial del péptido quimérico α -syn34-45/HH a través de una monocapa de células bEnd-3. La curva superior muestra la desaparición progresiva del péptido en el compartimento donante (es decir, inferior). La curva inferior muestra la aparición gradual del péptido en el compartimento aceptor (es decir, superior).

Figura 11: Efecto universal anti-Alzheimer y anti-Parkinson del péptido quimérico α -syn34-45/HH sobre la formación de poros amiloides.

10 A. Las células SH-SY5Y se trataron con péptido A β 1-42 (220 nM), y se analizó la fluorescencia dependiente del Ca²⁺. Los histogramas muestran el análisis de 100 células (media \pm D.E.). En ausencia del péptido quimérico (- Pep Chim), la formación de poros amiloides inducida por el péptido A β 1-42 se hizo evidente por un aumento de la fluorescencia de Ca²⁺ dentro de las células. Cuando se añadió A β 1-42 a las células en presencia del péptido quimérico α -syn34-45/HH (ambos 220 nM), no hubo aumento detectable de fluorescencia de Ca²⁺ (+ Pep Chim). Los campos
15 microscópicos representativos de las células tratadas con A β 1-42 (micrografía izquierda) o con A β 1-42 + péptido quimérico α -syn34-45/HH (micrografía derecha) se muestran debajo de los histogramas. Los colores más cálidos corresponden a una fluorescencia más alta (escala izquierda).

B. Experimento similar realizado con α -sinucleína en lugar de A β 1-42, ya sea en ausencia (- Pep Chim) o en presencia (+ Pep Chim) del péptido quimérico α -syn34-45/HH. ***, Diferencia significativa; P < 0,001.

20 Figura 12: Cinética de interacción del péptido quimérico KEHHGVLYVGTK (SEQ ID NO: 11) (10 μ M) con una monocapa de gangliósido GM1 (cuadrados rellenos) o GM3 (cuadrados abiertos). La interacción se mide por el aumento de la presión superficial (π) en función del tiempo después de la adición del péptido.

Descripción detallada de la invención

25 Los autores de la presente invención han demostrado ahora que tanto A β como α -sinucleína muestran un dominio común de unión a glicolípidos estructuralmente relacionado, con poca homología de secuencia. La alta afinidad de A β por el gangliósido GM1 está determinada por la presencia de un par de restos de histidina (His-13 e His-14). Los autores reemplazaron luego los aminoácidos Ser-42 y Lys-43 del dominio mínimo de unión a glicolípidos de α -sinucleína (α -syn34-45) por dos restos de histidina. El péptido quimérico α -syn/HH resultante retuvo completamente su capacidad de reconocer el gangliósido GM3 y ha adquirido la capacidad de unirse a complejos condensados de
30 GM1 a altas presiones superficiales.

El péptido quimérico α -syn/HH interactuó casi exclusivamente con los gangliósidos, ignorando los glicolípidos neutros que carecen de ácidos siálicos (GalCer, LacCer, asialo-GM1).

La alta afinidad del péptido quimérico de la invención por estos gangliósidos en su entorno lipídico natural abre amplias aplicaciones terapéuticas.

35 Definiciones

El término "paciente" o "sujeto" se refiere a un animal humano o no humano, preferiblemente un mamífero, que incluye machos, hembras, adultos y menores.

40 Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" o "terapia" incluye tratamiento curativo y/o profiláctico. Más concretamente, el tratamiento curativo se refiere a cualquiera de los síntomas de alivio, mejora y/o eliminación, reducción y/o estabilización de un síntoma (p. ej. la falta de progreso a etapas más avanzadas), así como el retraso en la progresión de un síntoma de un trastorno en particular.

45 El tratamiento profiláctico o "prevención" se refiere a cualquiera de las acciones de detener el inicio, reducir el riesgo de desarrollo, reducir la incidencia, retrasar el inicio, reducir el desarrollo, así como aumentar el tiempo de aparición de los síntomas de un trastorno en particular. En el contexto de la presente invención, el término "prevenir" se aplica más en particular a un sujeto que está en riesgo de desarrollar un trastorno particular, es decir, cualquier afección que implique gangliósidos como sitios receptores de la superficie celular, incluyendo trastornos neurodegenerativos, enfermedades infecciosas o tumores.

50 Dos secuencias de aminoácidos son "homólogas", "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando uno o más restos de aminoácidos son reemplazados por un resto biológicamente similar o cuando más del 80% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 90%, preferiblemente más de aproximadamente el 95%, son similares (funcionalmente idéntico). Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineación usando, por ejemplo, el programa de acumulación GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los programas conocidos en la técnica (BLAST, FASTA, etc.). Preferiblemente, estos péptidos homólogos no incluyen dos restos de cisteína, con lo que se evita la

ciclación. Preferiblemente, las secuencias homólogas difieren por mutaciones, tales como sustituciones, inserciones y/o deleciones de uno o varios aminoácidos. Preferiblemente, las secuencias homólogas difieren solo por sustitución/sustituciones conservadora(s).

5 La expresión "sustitución conservadora", como se usa en el presente documento, significa el reemplazo de un resto de aminoácido por otro, sin alterar la conformación y función globales del péptido, incluyendo, pero sin limitarse al mismo, el reemplazo de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, forma, hidrofóbico, aromático y similares). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina son aminoácidos hidrofílicos básicos y pueden ser intercambiables. Del mismo modo, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede reemplazarse con leucina, metionina o valina. Los aminoácidos hidrofílicos neutros, que pueden ser sustituidos entre sí incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina.

15 Un "gangliósido" se refiere a una molécula compuesta por un glicoesfingolípido (ceramida y oligosacárido) con uno o más ácidos siálicos (por ejemplo, ácido n-acetilneuramínico, NANA) unidos en la cadena de azúcar. NeuNAc, un derivado acetilado del ácido siálico de carbohidratos, hace aniónicos a los grupos principales de gangliósidos a pH 7. Los gangliósidos están presentes y concentrados en las superficies celulares, con las dos cadenas de hidrocarburo del resto ceramida incrustadas en la membrana plasmática y los oligosacáridos situados en la superficie extracelular, donde presentan puntos de reconocimiento para moléculas extracelulares o superficies de células vecinas. Las estructuras de gangliósidos comunes (GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1b, GQ1) son conocidas en la técnica.

20 *Péptido quimérico de la invención:*

La presente invención proporciona un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos E-X₁X₂X₃-YVGHH-X₄ (SEQ ID NO: 9), preferiblemente EGVLYVGHHT (SEQ ID NO: 1).

25 La invención proporciona además péptidos resistentes a la proteólisis que muestran una secuencia derivada de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9, mediante una o más modificaciones químicas que protegen el péptido contra la proteólisis, como se define a continuación.

Los péptidos sustancialmente homólogos, que muestran una secuencia derivada de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9 por una o más sustituciones conservadoras, se describen con más detalle en el presente documento.

Todos los péptidos de la invención comprenden dos restos de histidina consecutivos.

30 El péptido de la invención tiene entre 10 y 30 aminoácidos, preferiblemente entre 12 y 20, preferiblemente entre 12 y 16 aminoácidos.

Ventajosamente, ambos aminoácidos, N-term y C-term, son aminoácidos básicos, preferiblemente seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en lisina, arginina e histidina.

En una realización particular, el péptido comprende o consiste en X₅-EGVLYVGHHT-X₆ (SEQ ID NO: 2), en donde X₅ y X₆ son independientemente lisina, arginina o histidina.

35 Un péptido preferido consiste en KEGVLYVGHHTK (SEQ ID NO: 3).

Otros péptidos comprenden o consisten en

REGVLYVGHHTR (SEQ ID NO: 6);

REGVLYVGHHTK (SEQ ID NO: 7);

KEGVLYVGHHTR (SEQ ID NO: 8).

40 *Péptidos invertidos:*

Se describen con más detalle los péptidos en los que el par de restos de histidina se mueve en la parte N-terminal del péptido quimérico.

Dichos péptidos, también denominados en el presente documento péptidos quiméricos "invertidos", tienen una longitud de 10 a 30 aminoácidos.

45 Dichos péptidos comprenden o consisten en X₅-EHHGVLYVGT-X₆ (SEQ ID NO: 10), en donde X₅ y X₆ son independientemente lisina, arginina o histidina.

Un péptido particular es KEHHGVLYVGTK (SEQ ID NO: 11).

Las secciones que siguen se aplican a estos péptidos invertidos, así como a todos los péptidos quiméricos descritos en este documento. Estos péptidos invertidos muestran las propiedades de unión a gangliósidos tanto de la α-

sinucleína como del péptido β -amiloide. Estos péptidos, o los ácidos nucleicos que codifican los péptidos, también se describen para prevenir o tratar cualquier afección que implique gangliósidos como sitios receptores de la superficie celular, incluidos trastornos neurodegenerativos, enfermedades infecciosas o tumores.

Preparación de los péptidos:

5 Los péptidos descritos en el presente documento pueden sintetizarse usando métodos de síntesis estándar conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo síntesis química o recombinación genética. En una realización preferida, los péptidos se obtienen por condensación gradual de restos de aminoácidos, bien sea por condensación de un fragmento preformado que contiene ya una secuencia de aminoácidos en el orden apropiado, o por condensación de
10 varios fragmentos previamente preparados, mientras se protegen los grupos funcionales de aminoácidos excepto los implicados en el enlace peptídico durante la condensación. En particular, los péptidos pueden sintetizarse de acuerdo con el método descrito originalmente por Merrifield.

Son ejemplos de tecnologías de síntesis química la síntesis en fase sólida y la síntesis en fase líquida. Como una síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al extremo C del péptido a sintetizar está unido a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos y, por repetición alternativa de reacciones, uno en el que los aminoácidos con sus grupos amino y los grupos funcionales de cadena lateral protegidos con grupos protectores apropiados se condensan uno por uno en orden desde el extremo C hasta el extremo N, y uno donde los aminoácidos se unen a la resina o al grupo protector de los grupos amino de los péptidos. Cuando se liberan, la cadena peptídica se extiende entonces de esta manera. Los métodos de síntesis en fase sólida se clasifican en gran parte por el método
15 tBoc y el método Fmoc, según el tipo de grupo protector utilizado. Los grupos protectores utilizados habitualmente incluyen tBoc (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxi-carbonilo), Bzl (bencilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Mbh (4, 4'- dimetoxidibenzhidrido), Mtr (4-metoxi-2,3,6- trimetilbencenosulfonilo), Trt (trítulo), Tos (tosilo), Z (benciloxicarbonilo) y Clz-Bzl (2,6-diclorobencilo) para los grupos amino; NO₂ (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidino; y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo). Después de la síntesis del péptido deseado, se somete a la reacción de desprotección y se corta del soporte sólido.
20 Dicha reacción de corte de péptidos puede llevarse a cabo con fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico para el método Boc, y con TFA para el método Fmoc.

Alternativamente, el péptido puede sintetizarse usando técnicas recombinantes. En este caso, un ácido nucleico y/o un constructo genético que comprende o que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de acuerdo con la invención, polinucleótidos con secuencias de nucleótidos complementarias a una de las secuencias anteriores y secuencias que se hibridan con dichos polinucleótidos en condiciones rigurosas.
30

La invención se refiere además a un constructo genético que consiste o comprende un polinucleótido como se define en el presente documento, y secuencias reguladoras (tales como un promotor o promotores adecuados, uno o varios potenciadores, un terminador o terminadores, etc.) que permiten la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de un péptido de acuerdo con la invención en una célula hospedadora.

35 Así pues, la invención se refiere en otro aspecto a un hospedador o una célula hospedadora que expresa (o que bajo circunstancias adecuadas es capaz de expresar) un péptido de la invención; y/o que contiene un polinucleótido de la invención o una construcción genética de la invención.

El método para producir el péptido puede comprender opcionalmente los pasos de purificar dicho péptido, modificar químicamente dicho péptido y/o formular dicho péptido en una composición farmacéutica.

40 *Protección adicional contra la proteólisis:*

Los términos N y C de los péptidos descritos en el presente documento pueden protegerse opcionalmente contra la proteólisis. Por ejemplo, el extremo N puede estar en forma de grupo acetilo, y/o el extremo C puede estar en forma de grupo amida. También se prevén modificaciones internas de los péptidos para que sean resistentes a la proteólisis, por ejemplo, en donde al menos un enlace peptídico -CONH- se modifica y se reemplaza por un enlace reducido
45 (CH₂NH), un enlace retro-inverso (NHCO), un enlace metileno-oxi (CH₂-O), un enlace tiometileno (CH₂-S), un enlace carba (CH₂CH₂), un enlace cetometileno (CO-CH₂), un enlace hidroxietileno (CHOH-CH₂), un enlace (N-N), un enlace alceno E- o también un enlace -CH=CH.

Por ejemplo, el péptido puede modificarse mediante acetilación, acilación, amidación, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, formación de enlaces reticulados covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, fosforilación y similares.
50

Los péptidos de la invención pueden estar compuestos de aminoácidos en configuración D, que hacen que los péptidos sean resistentes a la proteólisis. También pueden estabilizarse mediante reticulación intramolecular, por ejemplo modificando al menos dos restos de aminoácidos con cadenas secundarias olefínicas, preferiblemente cadenas alquenilo C3-C8, preferiblemente cadenas penten-2-ilo) seguido de reticulación química de las cadenas, de acuerdo con la denominada tecnología "grapa" descrita en Walensky *et al*, 2004. Por ejemplo, los aminoácidos en la posición i
55

e i + 4 a i + 7 pueden sustituirse por aminoácidos no naturales que muestran restos olefinicos reactivos. Todos estos péptidos modificados químicamente y resistentes a la proteólisis están comprendidos en la presente invención.

5 En otro aspecto de la invención, los péptidos se unen covalentemente a una molécula de polietilenglicol (PEG) por su extremo C-terminal o un resto de lisina, especialmente un PEG de 1500 o 4000 MW, para una disminución en el aclaramiento urinario y en las dosis terapéuticas utilizadas y para un aumento de la vida mitad en el plasma sanguíneo. En otra realización más, la vida mitad del péptido aumenta al incluir el péptido en un material polimérico biodegradable y biocompatible para el sistema de administración de fármacos que forman microesferas. Los polímeros y copolímeros son, por ejemplo, poli (D,L-lactida-co-glicólido) (PLGA) (como se ilustra en el documento US2007/0184015, SoonKap Hahn *et al*).

10 En otras realizaciones, los péptidos de la invención pueden estar protegidos por dendrímeros u otras moléculas ramificadas, o por nanopartículas o nanoportadores, que pueden encapsularlos o a los que pueden estar acoplados opcionalmente.

Ácidos nucleicos

15 La invención también se refiere a un polinucleótido que comprende o que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de acuerdo con la invención.

La invención se refiere además a una construcción genética que consiste o comprende un polinucleótido como se define en el presente documento, y secuencias reguladoras (tales como los promotor(es) adecuados, potenciador(es), terminador(es), etc.) que permiten la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de un péptido de acuerdo con la invención en una célula hospedadora.

20 Las construcciones genéticas de la invención pueden ser ADN o ARN, preferiblemente ADNc, y son preferiblemente ADN bicatenario. Las construcciones genéticas de la invención también pueden estar en una forma adecuada para la transformación de la célula hospedadora u organismo hospedador pretendido, en una forma adecuada para la integración en el ADN genómico de la célula hospedadora prevista o en una forma adecuada para la replicación independiente, el mantenimiento y/o la herencia en el organismo hospedador pretendido. Por ejemplo, las
25 construcciones genéticas de la invención pueden estar en forma de vector, como por ejemplo un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral o un transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que puede proporcionar expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula hospedadora, un organismo hospedador y/o un sistema de expresión adecuados).

30 En un aspecto preferido pero no limitante, una construcción genética de la invención comprende i) al menos un ácido nucleico de la invención; conectado operativamente a ii) uno o más elementos reguladores, tales como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado; y opcionalmente también iii) uno o más de otros elementos de construcciones genéticas tales como secuencias 3'- o 5'-UTR, secuencias líderes, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes informadores, y/o elementos que pueden facilitar o aumentar la eficiencia de la transformación o la integración.

35 El ácido nucleico puede ser transportado especialmente por un vector viral, tal como un adenovirus o un lentivirus, para infección y expresión *ex vivo* o *in vivo* del péptido de la invención.

Aplicaciones terapéuticas:

El péptido o ácido nucleico como se define en el presente documento es útil como medicamento.

40 Se proporciona en el presente documento un método para prevenir o tratar una afección que implica la adhesión a un gangliósido de la membrana celular en un paciente, el cual método comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un péptido de la invención, o de un ácido nucleico que codifica dicho péptido. En una realización preferida, se proporciona un método para prevenir o tratar un trastorno neurodegenerativo en un paciente, el cual método comprende administrar a dicho paciente con una cantidad eficaz de un péptido de la invención, o de un ácido nucleico que codifica tal péptido.

45 El trastorno neurodegenerativo incluye la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), que se sabe que implican la adhesión a gangliósidos GM1 y/o GM3.

50 El trastorno neurodegenerativo también puede ser el síndrome de Guillain-Barré, que implica a los gangliósidos GM1 y GD1a. En otra realización, se proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa en un paciente, método que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un péptido de la invención, o un ácido nucleico que codifica dicho péptido. En términos generales, todos los microorganismos patógenos parecen usar gangliósidos como sitios receptores en la superficie de las células infectadas.

La enfermedad infecciosa es ventajosamente una infección por un virus, por ejemplo, HIV, virus de la gripe, HCV, HBV, rotavirus, virus BK, virus de Ébola, o una infección por bacterias, por ejemplo *Helicobacter pylori* o *Mycoplasma pneumoniae*. La enfermedad infecciosa puede involucrar toxinas bacterianas, como *Escherichia coli*, *Clostridium tetani*,

Clostridium botulinum, *Clostridium perfringens* o *Vibrio cholerae*. También se incluyen las enfermedades priónicas, así como las infecciones por parásitos, como *Plasmodium falciparum* (que implica la adhesión a GM1a).

5 Los expertos en la técnica pueden medir las interacciones entre las proteínas del microorganismo (como las glucoproteínas de superficie del virus, por ejemplo, gp120 de HIV-1) y los gangliósidos de la membrana celular (por ejemplo, GM3), y la inhibición de estas interacciones por el péptido quimérico de la invención. Con este fin, los gangliósidos pueden exponerse en la superficie de una fase acuosa para formar una monocapa lipídica en la interfaz agua-aire. Las proteínas de los microorganismos se inyectan entonces en la subfase acuosa y su interacción con los gangliósidos se determina midiendo la tensión superficial. Se pueden realizar pruebas de infección para confirmar la capacidad del péptido para bloquear la infección.

10 En otra realización más, se proporciona un método para prevenir o tratar un tumor en un paciente, método que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un péptido de la invención, codificando dicho péptido un ácido nucleico.

15 Las funciones de los gangliósidos como determinantes específicos sugieren de hecho su importante papel en el crecimiento y la diferenciación de los tejidos, así como en la carcinogénesis. Véase también Daniotti *et al*, 2013 para una revisión de los gangliósidos asociados a tumores.

La terapia antitumoral de la invención es útil para erradicar cualquier malignidad microscópica persistente y/o prevenir o retrasar las recidivas.

Además, el péptido (o el ácido nucleico que codifica dicho péptido) puede usarse para prevenir o tratar la metástasis.

20 El péptido de la invención (o el ácido nucleico que codifica dicho péptido) es en realidad particularmente útil para prevenir la propagación o proliferación de células metastásicas, en particular a través de la barrera hemato-encefálica.

El tumor puede ser cáncer, como un cáncer sólido o un cáncer hematológico. En una realización preferida, el tumor se selecciona entre el grupo que consiste en melanoma, neuroblastoma, glioma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica aguda de células T, leucemia de células T adultas, carcinoma de mama, o carcinoma renal.

25 *Composiciones farmacéuticas:*

Los péptidos de la invención (o el ácido nucleico que codifica dicho péptido) pueden administrarse por cualquier vía conveniente que incluya la vía intravenosa, oral, transdérmica, subcutánea, mucosa, intramuscular, intrapulmonar, intranasal, parenteral, rectal, vaginal y tópica.

Los péptidos se formulan en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Por lo tanto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido como se definió anteriormente (o un ácido nucleico que codifica dicho péptido), en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica también puede incluir cualquier otro principio activo.

35 La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma se entiende bien en la técnica y no necesita ser limitada basándose en la formulación. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensiones, en líquido antes del uso. La preparación también se puede emulsionar. En particular, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de dosificación sólida, por ejemplo cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, grageas o gránulos.

40 La elección del vehículo y el contenido de sustancia activa del vehículo se determinan generalmente de acuerdo con la solubilidad y las propiedades químicas del compuesto activo, el modo de administración en particular y las disposiciones que deben observarse en la práctica farmacéutica. Por ejemplo, se pueden utilizar excipientes como lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dicálcico y agentes desintegrantes como almidón, ácidos alginicos y ciertos silicatos complejos combinados con lubricantes, como estearato de magnesio, laurilsulfato sódico y talco para preparar comprimidos. Para preparar una cápsula, es ventajoso usar lactosa y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se usan suspensiones acuosas, pueden contener agentes emulsionantes o agentes que facilitan la suspensión. También pueden usarse diluyentes tales como sacarosa, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol y cloroformo o mezclas de los mismos.

45 La preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto.

50 En una realización particular, el péptido (o ácido nucleico que codifica dicho péptido) puede administrarse mediante electroporación. La electroporación, también conocida como electroporación o electroinyección, es la

permeabilización de las membranas celulares como consecuencia de la aplicación de ciertos campos eléctricos cortos e intensos a través de la membrana celular, las células o los tejidos.

La dosificación es elegida por la persona experta y depende de la vía de administración y la forma de dosificación que se utiliza. La dosis diaria total de péptidos administrados a un sujeto en dosis únicas o divididas puede ser, por ejemplo, cantidades de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día y preferiblemente de 0,01 a 10 mg/kg/día. Se prefiere una dosis diaria de aproximadamente 5 mg/kg. Las composiciones de unidades de dosificación pueden contener tales cantidades de tales submúltiplos de las mismas como puedan usarse para completar la dosis diaria. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para un paciente en particular dependerá de diversos factores que incluyen el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo y la vía de administración, las tasas de absorción y excreción, la combinación con otros fármacos y la gravedad de la enfermedad concreta que se está tratando.

Preferiblemente, el péptido se administra una vez al día durante un período de al menos una semana, preferiblemente al menos dos semanas.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán en la sección experimental que sigue, que debe considerarse como ilustrativa y no limitante del alcance de la presente solicitud.

Ejemplos

Ejemplo 1: interacción del péptido quimérico de la invención con los gangliósidos de la membrana celular.

Materiales y métodos.

Materiales. Los péptidos sintéticos con una pureza > 95% se obtuvieron de Schafer-N (Copenhague, Dinamarca). El agua apirógena ultrapura era de Biorad (Marnes La Coquette, Francia). Todos los lípidos se adquirieron de Matreya (Pleasant Gap, PA).

Modelado molecular. Los estudios *in silico* de las interacciones péptido-gangliósido se realizaron con el programa Hyperchem 8 (ChemCAD, Obernay, Francia) como se describe (Fantini y Yahi, 2011a). Las moléculas se visualizaron con software Hyperchem 8, PDB-viewer (Guex *et al*, 1997) y Molegro Molecular Viewer (Thomsen *et al*, 2006).

Ensayo de la monocapa lipídica. Las interacciones péptido-colesterol se estudiaron con la técnica de equilibrio de película de Langmuir utilizando un microtensiómetro Kibron como se describió anteriormente (Fantini y Yahi, 2011a).

Medidas de calcio. Las células se sembraron en placas de cultivo de 35 mm, se cultivaron durante 72 h y se cargaron con Fluo-4 AM 5 μ M (Invitrogen-Life Technologies, Saint Aubin, Francia) durante 30 minutos en la oscuridad, se lavaron tres veces con HBSS (Gibco-Life Technologies, Saint-Aubin, Francia), y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C. Los flujos de calcio se estimaron midiendo la variación de la intensidad de fluorescencia celular después de la inyección de péptidos en la cámara de grabación directamente encima de un objetivo de microscopio vertical (BX51W Olympus, Rungis, Francia) equipado con un módulo de sistema de iluminación MT20. La emisión de fluorescencia a 525 nm fue convertida en imagen por una cámara digital CDD (ORCA-ER Hamamatsu, Japón) después de la excitación de fluorescencia a 490 nm. Las imágenes de lapso de tiempo (1 cuadro/10s) se obtuvieron utilizando el software CellR (Olympus). Las señales se expresaron como fluorescencia después del tratamiento (Ft) dividido por la fluorescencia antes del tratamiento (F0) multiplicado por 100. Los resultados se promedian y el porcentaje de fluorescencia de control se resta para cada valor, como se describió anteriormente (Di Scala *et al*, 2014; Fantini *et al*, 2014).

Resultados

Las secuencias de aminoácidos del dominio mínimo de unión a glicolípidos de α -sinucleína y A β se indican a continuación:

A-sinucleína humana 34-45 : KEGVLYVGSKTK (SEQ ID NO: 4)

A β 5-16 humano: RHDSGYEVHHQK (SEQ ID NO: 5)

α -syn34-45/ HH quimérico: KEGVLYVGHHTK (SEQ ID NO: 3)

El reemplazo de los dos restos de histidina en A β 5-16 por alanina produjo una pérdida total de interacción con GM1 (Figura 1A). En este experimento, se preparó una monocapa de gangliósido GM1 en la interfaz aire-agua y se inyectó el péptido en la subfase acuosa. La interacción del péptido con el gangliósido se evidenció por un aumento en la presión superficial de la monocapa, que fue seguida en tiempo real con una sonda de platino (véase Thakur *et al*, 2009 para una descripción completa de la técnica y su aplicación a proteínas amiloides). Para el péptido A β 5-16 de tipo silvestre, la presión superficial comenzó a aumentar inmediatamente después de la inyección del péptido, alcanzando un máximo al cabo de 30 minutos de incubación. En cambio, el doble mutante His-13Ala/His-14Ala no interactuó con GM1 (Figura 1A). Luego, se analizaron mutantes individuales para identificar cuál de las dos His son realmente críticas para el reconocimiento de GM1. Sorprendentemente, ambos parecían estar implicados, ya que se observó una pérdida total de interacción para cada mutante (His-13Ala e His-14Ala). Las simulaciones de modelado

molecular arrojan algo de luz sobre este resultado (Figura 1B). La formación de un complejo estable entre A β 5-16 y GM1 requirió dos moléculas de GM1 que formaban un receptáculo de tipo cáliz para el péptido. En este modelo, His-13 interactuó con un GM1 y His-14 con el segundo. Claramente, la cooperación entre ambas moléculas de GM1 permitió una interacción óptima con el péptido A β 5-16 conducido por restos de histidina. Por el contrario, debido a que carece de estos restos de histidina, el dominio de unión a glicolípidos de α -sinucleína (α -syn34-45) tiene una marcada preferencia por el gangliósido GM3 en vez de GM1.

Dado el papel crítico de los restos de histidina para la interacción de alta afinidad de A β 5-16 con el dímero GM1, los autores de la presente invención decidieron introducir un par similar de restos de His adyacentes en α -syn34-45 y sintetizaron un α -syn34-45Ser-42His/Lys-43His quimérico (denominado α -syn/HH, Figura 1C). Como ni Ser-42 ni Lys-43 parecían estar implicados en la unión de GM3, los autores de la presente invención supusieron que esta doble mutación no interferiría con la interacción del péptido quimérico α -syn/HH con una monocapa de GM3. Como se muestra en la Figura 2, el péptido α -syn/HH se comportó exactamente como se predijo. La cinética de su interacción con GM3 era exactamente la misma que la del péptido α -syn34-45 de tipo silvestre (Figura 2A) y la presión crítica de inserción (π_c) se estimó en 37,5 mN.m⁻¹ tanto para el tipo silvestre como para los péptidos quiméricos (Figura 2B). π_c es proporcional a la afinidad de unión; este parámetro corresponde a la presión superficial de la monocapa por encima de la cual no se produce interacción porque los glicolípidos son demasiado densos (Thakur *et al*, 2009; Fantini *et al*, 2011b). Así pues, la introducción del par de restos de His en α -syn34-45 no interfirió en absoluto con la capacidad de unión a GM3 del péptido. En cambio, el péptido quimérico α -syn/HH ha ganado notablemente afinidad por GM1, lo que se observó claramente en estudios de cinética en tiempo real (Figura 2C). Además, el valor de π_c medido con monocapas GM1 aumentó de 25 mN.m⁻¹ para el péptido α -syn34-45 de tipo silvestre a 37,5 mN.m⁻¹ en el caso de α -syn/HH, lo que indica una afinidad significativamente más fuerte del péptido quimérico para GM1 (Figura 2D).

El análisis *in silico* de los péptidos de tipo silvestre y α -syn/HH indicó que ocupan el mismo volumen molecular. Sin embargo, la introducción del par de restos de His en el péptido α -syn/HH dio como resultado una distribución más simétrica del potencial electrostático (Figura 3A). Por lo tanto, los péptidos α -syn34-45 de tipo silvestre y los péptidos α -syn/HH quiméricos diferían en gran medida en la forma en que interactuaban con el grupo aniónico de glicona de GM1. Como se muestra en la Figura 3B (panel izquierdo), α -syn34-45 adoptó una forma curva alrededor de la parte de azúcar que sobresale de un monómero de GM1. Debido a su distribución más equilibrada del campo electrostático, el péptido quimérico podría formar un complejo estable con un dímero de moléculas GM1 dispuestas en un receptáculo caliciforme típico (Figura 3B, panel derecho). En cuanto al complejo A β 5-16/GM1, cada uno de los restos His de α -syn/HH interactuó con su propio gangliósido GM1, de manera que podría compararse con las alas de una mariposa en el cáliz de una flor. Se proporciona una descripción detallada de las interacciones moleculares entre α -syn/HH y el dímero GM1 en la Figura 1C. En general, estos datos apoyan firmemente la noción de que los restos de His son críticos para reclutar las moléculas GM1 en un dímero funcional en forma de cáliz capaz de acomodar el dominio de unión a glicolípidos de las proteínas amiloides.

Se realizaron varios experimentos para validar esta conclusión. Primero, los autores de la presente invención analizaron la interacción del péptido α -syn/HH con una serie de glicolípidos. De hecho, este péptido quimérico mostró una afinidad selectiva por los gangliósidos (GM1, GM3, GM4, GD1a, GD3 y GT1b) y reaccionó muy mal con los glicolípidos neutros (GalCer, LacCer, asialo-GM1) (Figura 4A y Tabla 1).

Tabla 1. Especificidad de gangliósido de los péptidos α -syn34-45 de tipo silvestre y α -syn34-45/HH quiméricos.

| Gangliósido | α -syn34-45 | α -syn34-45/HH (SEQ ID NO:3) |
|-------------|--------------------|-------------------------------------|
| GM1 | + | +++ |
| GM3 | +++ | +++ |
| GM4 | + | +++ |
| GD1a | + | +++ |
| GD3 | + | +++ |
| GT1b | + | +++ |

Todas las interacciones se midieron con monocapas de gangliósidos. Los péptidos se añadieron en la subfase acuosa a una concentración de 10 μ M. (+) significa una presión crítica de inserción < 25 mN.m⁻¹ y (+++) una presión crítica de inserción > 25 mN.m⁻¹.

Esto indica que se requiere la presencia de al menos un siálico en la parte de glicona del glicolípidos para la unión, de acuerdo con los datos de modelado molecular (Figura 1C). Luego, los autores de la presente invención analizaron el impacto del entorno lipídico en la interacción entre GM1 y el péptido quimérico α -syn/HH. En este experimento, los autores de la presente invención prepararon monocapas mixtas de GM1/colesterol y GM1/fosfatidilcolina y siguieron la cinética de interacción de α -syn/HH con estas monocapas. Como se muestra en la Figura 4B, el colesterol aceleró considerablemente la interacción del péptido α -syn/HH con GM1, mientras que la fosfatidilcolina tendió más bien a ralentizar la reacción. Esto está en línea con el efecto bien conocido del colesterol para formar complejos condensados con GM1 (Radhakrishnan *et al*, 2000), lo que permite un control de esteroides en la conformación de glicolípidos (Yahi *et al*, 2001; Lingwood *et al*, 2011). Además, se ha demostrado que la interacción del colesterol con GM1 estabiliza la conformación tipo cáliz de los dímeros de GM1 (Fantini *et al*, 2013). A este respecto, se espera que el colesterol acelere la interacción sin aumentar la afinidad de α -syn/HH por GM1 (la conformación activa puede conseguirse sin

colesterol, pero con una cinética retardada, como se muestra en la Figura 4B). La determinación experimental de π para monocapas mixtas de GM1/colesterol ($37,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) respalda firmemente este aspecto (Figura 4C).

5 Cuando el péptido neurotóxico A β 1-42 se incubó con células SH-SY5Y de neuroblastoma humano precargadas con el colorante fluorescente sensible Fluo-4 AM, se observó un aumento drástico de los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Figura 5). Este aumento de los niveles de Ca^{2+} inducido se redujo significativamente en presencia de cantidades equimolares del péptido quimérico α -syn/HH (Figura 5A). Este efecto era altamente dependiente de la presencia del par de restos de His, ya que en comparación el péptido quimérico α -syn34-45 de tipo silvestre tenía muy poca actividad inhibidora (Figura 5B). Esto es consistente con el papel prominente desempeñado por GM1, y no por GM3, en la neurotoxicidad de los péptidos β -amiloides de Alzheimer (Fantini *et al*, 2010; Fantini *et al*, 2013). Finalmente, se debe señalar que el péptido quimérico α -syn/HH por sí solo tuvo poco efecto sobre los flujos de Ca^{2+} , lo que indica una falta de neurotoxicidad intrínseca.

Ejemplo 2: transporte a través de la barrera hematoencefálica.

15 Con el fin de estudiar el transporte del péptido quimérico α -syn34-45/HH: KEGVLYVGHHTK (SEQ ID NO: 3) a través de la barrera hematoencefálica (BBB), los autores de la presente invención han reconstituido un sistema celular funcional basado en una monocapa de células endoteliales (células murinas bEnd-3, ATCC # CRL-2299). Estas células se cultivan en placas a diversas densidades que van desde 10.000 a 50.000 células por pocillo en cámaras celulares de dos compartimentos (Greiner Bio-one). El compartimento inferior de la cámara es un pocillo que forma parte de una placa de cultivo de 12 pocillos. La cámara superior está equipada con un filtro permeable (diámetro medio de poro de $0,4 \mu\text{m}$) sobre el que se siembran las células. Las células se cultivan en suero de ternera fetal al 10% DMEM/F12.

20 En la confluencia, las células formaron una monocapa uniforme con una resistencia transendotelial de $150 - 200 \Omega\cdot\text{cm}^2$ (medida con el aparato EVOM, WPI). La resistencia transendotelial refleja la presencia de uniones ajustadas globales en el cultivo. Estas uniones ajustadas evitan eficazmente el paso paracelular de moléculas. Se considera que el endotelio es ajustado cuando este valor es $> 100 \Omega\cdot\text{cm}^2$. Por tanto, todos los experimentos se realizan con barreras endoteliales funcionales.

30 Se han utilizado tres modelos de barreras: i) monocapas de células bEnd-3 puras, ii) monocapas de células bEnd-3 cocultivadas con células astrocíticas CTX-TNA2 (ATCC #CRL-2006) cultivadas en placa en el compartimento inferior de las cámaras de cultivo, y iii) monocapas de células bend-3 cocultivadas con células gliales C6 (ATCC #CCL-107) cultivadas en placa en el compartimento inferior de las cámaras de cultivo. La razón para usar el sistema de cocultivo es mejorar la diferenciación del endotelio reconstituido debido a la secreción de factores tróficos por las células gliales. En todos los casos, los valores de resistencia transendotelial en estos diferentes sistemas de cultivo siempre estuvieron por encima de $150 - 200 \Omega\cdot\text{cm}^2$.

Los valores típicos de la resistencia transendotelial son:

- monocapas bEnd-3 puras: $185 \Omega\cdot\text{cm}^2$.

35 - bEnd-3/CTX-TNA2: $153 \Omega\cdot\text{cm}^2$.

- bEnd-3/C6: $186 \Omega\cdot\text{cm}^2$.

40 El péptido quimérico se inyectó en el compartimento inferior de las cámaras de cultivo y se analizó su concentración en función del tiempo, tanto en el compartimento inferior como en el superior. El pasaje del péptido a través de la barrera endotelial se sigue así en tiempo real. La concentración del péptido quimérico se determina por espectrofotometría. Se recogió una parte alícuota de $2 \mu\text{L}$ de los medios de cultivo en diferentes momentos después de la adición del péptido, de modo que al final del experimento el volumen total cosechado era $< 10\%$ del volumen inicial. Se realizó un espectro completo del péptido para determinar la relación A230/A275 que muestra el valor característico de 6 (el péptido tiene 11 enlaces peptídicos que absorben a 230 nm y restos de tirosina con un pico a 275 nm).

45 2. 1. Cinética del pasaje a través de una barrera bend-3 pura

50 En este experimento, el péptido se inyectó debajo de una monocapa ajustada de células bend-3 puras con una resistencia transendotelial media de $185 \Omega\cdot\text{cm}^2$. Las células se enjuagaron dos veces en PBS- Ca^{2+} y luego se incubaron sin péptido (compartimento superior, PBS- Ca^{2+} solo) o $600 \mu\text{M}$ de péptido quimérico (compartimento inferior). El uso de un tampón que contiene calcio, como PBS- Ca^{2+} fue necesario para mantener la integridad de las uniones ajustadas durante todo el experimento (después de 24 horas de incubación, la resistencia transendotelial era aún tan alta como $162 \Omega\cdot\text{cm}^2$). Por lo tanto, el péptido no indujo ninguna toxicidad a las células endoteliales y, lo que es más importante, no afectó a la función de barrera de las células a través de un efecto directo sobre las uniones ajustadas).

55 El péptido quimérico apareció gradualmente en el compartimento superior, como estableció el análisis espectrofotométrico.

La relación A230/A275 fue igual a 6 para todos los espectros, lo que indicó que el péptido quimérico, y no las proteínas celulares, se recuperó realmente del compartimento superior. La cinética del pasaje del péptido quimérico a través de la barrera endotelial se encuentra en la Figura 6.

2. 2. Cinética del pasaje a través de una barrera bEnd-3/C6

5 Se obtuvieron datos similares con el sistema bEnd-3/C6. En este caso, las células bend-3 fueron cocultivadas durante 6 días en presencia de células C6 puestas en las placas en el compartimento inferior de las cámaras de cultivo. Para el experimento, los compartimentos superiores se transfirieron a una nueva placa de forma que las células gliales cocultivadas no estuvieran presentes durante el análisis de transporte. De hecho, las células cocultivadas estaban presentes solo durante el crecimiento y la diferenciación de las células bEnd-3.

10 En este sistema de cocultivo, los valores de la resistencia transendotelial fueron $186 \Omega \cdot \text{cm}^2$ a t_0 (tiempo de inyección del péptido) y $152 \Omega \cdot \text{cm}^2$ después de 24 horas de incubación con el péptido. Por lo tanto, la presencia del péptido no afectó significativamente a la funcionalidad de las uniones ajustadas ya que la resistencia transendotelial permaneció $> 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Las concentraciones de los péptidos recuperados en el compartimento superior se presentan en la Figura 7.

15 2. 3. Cinética del pasaje a través de una barrera bEnd-3/CTX-TNA2

Finalmente, los autores de la presente invención han estudiado el pasaje transendotelial del péptido quimérico a través del sistema bend-3/CTX. En este caso, las células bEnd-3 se cocultivaron durante 6 días en presencia de células CTX-TNA2 sembradas en el compartimento inferior de las cámaras de cultivo. Los compartimentos superiores se transfirieron a una nueva placa y el experimento se realizó como se indica en el párrafo 2 (sistema bEnd-3/C6).

20 En este caso, los valores de la resistencia transendotelial fueron $154 \Omega \cdot \text{cm}^2$ a t_0 (tiempo de inyección del péptido) y $153 \Omega \cdot \text{cm}^2$ después de 24 horas de incubación con el péptido. Una vez más, la presencia del péptido no afectó significativamente a la funcionalidad de las uniones ajustadas ya que la resistencia transendotelial se mantuvo $> 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

25 Las concentraciones de péptidos recuperados en el compartimento superior se presentan en la Figura 8. Se ha de observar, en el caso del sistema de barrera bEnd-3/CTX, un proceso de transporte bifásico con una tasa muy alta en los dos primeros minutos seguido de una cinética más clásica.

2.4. Conclusión

30 Con el fin de comparar la eficiencia de los tres sistemas BBB utilizados para estudiar el pasaje del péptido quimérico, los autores de la presente invención han representado la concentración de péptido recuperado en el compartimento superior después de 1 h y 24 h de incubación. Los histogramas mostrados en las Figuras 9A y 9B indicaron que los resultados obtenidos son notablemente convergentes.

El experimento con solo PBS mostró que las células no producen ningún contaminante que pueda interferir con el método de dosificación para el péptido quimérico (A230/A275). En general, el sistema de cocultivo bEnd-3/C6 dio los mejores resultados combinados al cabo de 1 h y de 24 h.

35 Finalmente, como se muestra en la Figura 10, los autores de la presente invención han comprobado que la aparición del péptido quimérico en el compartimento superior (aceptor, triángulos) a través de la barrera endotelial reconstituida fue contrarrestada por su desaparición progresiva del compartimento inferior (donante, redondos).

En conclusión, estos datos indicaron que el péptido quimérico se transporta de un lado al otro de un BBB reconstituido (células bEnd-3 bien sea puras o cocultivadas con dos tipos de células gliales).

40 Ejemplo 3: El péptido quimérico bloquea los flujos de Ca^{2+} inducidos por la formación de poros amiloides oligoméricos de α -sinucleína, la proteína asociada con la enfermedad de Parkinson.

45 En el Ejemplo 1 (Figura 5), los autores de la presente invención mostraron que el péptido quimérico curaba las células neurales (células SH-SY5Y) intoxicadas por los péptidos β -amiloides de Alzheimer. Concretamente, mostraron que tras la incubación con el péptido β -amiloide de Alzheimer 1-42 (220 nM), estas células sufrieron la formación de poros amiloides oligoméricos en sus membranas plasmáticas. Estos poros indujeron una entrada masiva de iones Ca^{2+} desde el medio extracelular. En presencia de una concentración equimolar de péptido quimérico ("Pep Chim", 220 nM), ya no se pudieron formar estos poros porque el péptido evitó eficazmente que el péptido 1-42 β -amiloide de Alzheimer interactuase con el gangliósido GM1 en la superficie celular neuronal. Esto se ilustra en la Figura 11A.

50 En contraste con el péptido β -amiloide 1-42 de Alzheimer, la α -sinucleína asociada a la enfermedad de Parkinson interactúa con el gangliósido GM3, no el GM1. El péptido quimérico es un péptido de unión a gangliósido universal que interactúa con afinidad similar tanto con GM1 como con GM3. Sobre esta base, los autores de la presente invención anticiparon que el péptido quimérico podría curar las células neurales de los poros amiloides tóxicos formados por oligómeros de α -sinucleína.

Las células SH-SY5Y se cargaron primero con la sonda sensible al Ca^{2+} FLUO4-AM y luego se incubaron con 220 nM de α -sinucleína. Esto indujo la formación de poros amiloides permeables al Ca^{2+} que indujeron una entrada masiva de Ca^{2+} al interior de las células (Figura 11B). Cuando se inyectó el péptido quimérico (220 nM) en el cultivo celular junto con α -sinucleína, dejó de producirse la formación de poros porque el péptido quimérico impidió que la α -sinucleína interactuase con GM3 en la membrana celular neuronal. Por lo tanto, el péptido quimérico anuló totalmente los flujos de Ca^{2+} inducidos por α -sinucleína.

En conclusión, se ha demostrado ahora que el péptido quimérico presenta propiedades anti-Alzheimer y anti-Parkinson en cultivos de células neurales.

Ejemplo 4: Síntesis y prueba de péptidos "invertidos"

10 Dado que el péptido quimérico de SEQ ID NO : 3 interactúa con un dímero de gangliósidos formando una superficie de interacción simétrica caliciforme, los autores de la presente invención probaron la capacidad de unión a gangliósido de un péptido quimérico en el que el par de restos de histidina se trasladó a la parte N-terminal del péptido quimérico. Por tanto, la secuencia de aminoácidos de este denominado péptido quimérico "inverso" es KEHHGVLYVGTK (SEQ ID NO: 11).

15 Se extendió una monocapa de gangliósido GM1 o GM3 en la interfaz aire-agua y se inyectó el péptido quimérico invertido en la subfase acuosa a una concentración de 10 μM . La interacción del péptido con estos gangliósidos se evaluó mediante mediciones en tiempo real de la presión superficial (\square) de la monocapa, expresada en mN/m. La cinética de interacción del péptido quimérico invertido con monocapas de gangliósidos GM1 y GM3 se muestra en la Figura 12.

20 Estos datos indican que el péptido quimérico invertido reconoce tanto los gangliósidos GM1 como los GM3. Este doble reconocimiento es conferido por el par de restos de histidina introducidos en el marco de la secuencia alfa-sinucleína 34-45. En comparación con el prototipo de péptido quimérico de SEQ ID NO: 3 descrito en esta invención, el "péptido quimérico invertido" de SEQ ID NO: 11 tiene una localización diferente del par de restos de histidina. Dado que la actividad biológica del péptido quimérico se basa en las propiedades de unión universal a los gangliósidos conferidas por el par de restos de histidina, los autores de la presente invención esperan que el péptido quimérico invertido muestre también interesantes propiedades anti-Alzheimer, anti-Parkinson, anti-Creutzfeldt-Jakob, anti-virales, antibacterianas y antitumorales.

Referencias

- Daniotti *et al*, *Frontiers in Oncology*, 2013, vol 3, artículo 306:1-12;
- 30 - Di Scala C, Troadec JD, Lelièvre C, Garmy N, Fantini J, Chahinian H (2014). Mechanism of cholesterol-assisted oligomeric channel formation by a short Alzheimer β -amyloid peptide. *J Neurochem* 128: 186-195.
- Fantini J (2003) How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains. *Cell Mol Life Sci* 60: 1027-1032.
- Fantini J, Yahi N (2010) Molecular insights into amyloid regulation by membrane cholesterol and sphingolipids: common mechanisms in neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med* 12:e27.
- 35 - Fantini J, Yahi N (2011a) Molecular basis for the glycosphingolipid-binding specificity of α -synuclein: key role of tyrosine 39 in membrane insertion. *J Mol Biol* 408: 654-669.
- Fantini J, Carlus D, Yahi N (2011b) The fusogenic tilted peptide (67-78) of α -synuclein is a cholesterol binding domain. *Biochim Biophys Acta* 1808: 2343-2351.
- 40 - Fantini J, Yahi N, Garmy N (2013) Cholesterol accelerates the binding of Alzheimer's β -amyloid peptide to ganglioside GM1 through a universal hydrogen-bond-dependent sterol tuning of glycolipid conformation. *Front Physiol* 4: 120.
- Fantini J, Di Scala C, Yahi N, Troadec JD, Sadelli K, Chahinian H, Garmy N (2014). Bexarotene blocks calcium-permeable ion channels formed by neurotoxic Alzheimer's β -amyloid peptides. *ACS Chem Neurosci*, 2 de enero. [Epub antes de la impresión]
- 45 - Guex, N. y Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Lingwood D, Binnington B, Róg T, Vattulainen I, Grzybek M, Coskun U, Lingwood CA, Simons K (2011) Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity. *Nat Chem Biol* 7: 260-262.

- Oikawa, N., Yamaguchi, H., Ogino, K., Taki, T., Yuyama, K., Yamamoto, N., Shin, R.W., Furukawa, K. & Yanagisawa, K. (2009). Gangliosides determine the amyloid pathology of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 20, 1043-1046.
- 5 - Radhakrishnan A, Anderson TG, McConnell HM (2000) Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12422-12427.
- Thakur G, Micic M, Leblanc RM (2009) Surface chemistry of Alzheimer's disease: A Langmuir monolayer approach. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 74: 436-456.
- Thomsen R, Christensen MH (2006) MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J Med Chem* 49: 3315-3321.
- 10 - Yahi N, Aulas A, Fantini J (2010) How cholesterol constrains glycolipid conformation for optimal recognition of Alzheimer's beta amyloid peptide (A β 1-40). *PLoS One* 5: e9079.
- Wu G, Lu ZH, Kulkarni N, Ledeen RW (2012) Deficiency of ganglioside GM1 correlates with Parkinson's disease in mice and humans. *J Neurosci Res* 90, 1997-2008.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universite d'Aix Marseille

5 <120> Un péptido quimérico que interactúa con los gangliósidos de la membrana celular

<130> B1788PC

<160> 11

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

15 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido quimérico

20 <400> 1

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Gly | Val | Leu | Tyr | Val | Gly | His | His | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido quimérico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(1)

35 <223> Xaa en posición 1 (X1) puede ser una lisina, una arginina o una histidina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (12)..(12)

40 <223> Xaa en posición 12 (X2) puede ser una lisina, una arginina o una histidina

<400> 2

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Glu | Gly | Val | Leu | Tyr | Val | Gly | His | His | Thr | Xaa |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | |

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido quimérico

<400> 3

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Glu | Gly | Val | Leu | Tyr | Val | Gly | His | His | Thr | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | |

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

60 <400> 4

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Glu | Gly | Val | Leu | Tyr | Val | Gly | Ser | Lys | Thr | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | |

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 5
 Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10

 10 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 15 <220>
 <223> péptido quimérico

 <400> 6
 Arg Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly His His Thr Arg
 1 5 10

 20 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 25 <220>
 <223> péptido quimérico

 <400> 7
 Arg Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly His His Thr Lys
 1 5 10

 30 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido quimérico

 40 <400> 8
 Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly His His Thr Arg
 1 5 10

 <210> 9
 <211> 10
 45 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido quimérico

 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa en posición 2 (X1) es cualquier aminoácido

 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa en posición 3 (X2) es cualquier aminoácido

 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (4)..(4)
 <223> Xaa en posición 4 (X3) es cualquier aminoácido

<220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa en posición 10 (X4) es una treonina o glutamina

<400> 9
 Glu Xaa Xaa Xaa Tyr Val Gly His His Xaa
 10 1 5 10

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido quimérico invertido

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en posición 1 es K, R, o H

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa en posición 12 es K, R, o H

30 <400> 10
 Xaa Glu His His Gly Val Leu Tyr Val Gly Thr Xaa
 1 5 10

<210> 11
 <211> 12
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido quimérico invertido

40 <400> 11
 Lys Glu His His Gly Val Leu Tyr Val Gly Thr Lys
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de 10 a 30 aminoácidos, que comprende
 - a) la secuencia de aminoácidos E-X₁X₂X₃-YVGHH-X₄ (SEQ ID NO: 9),
 en donde al menos uno de los restos X₁, X₂ o X₃, que es un resto glicina o serina, mientras que el otro o los otros de los restos X₁, X₂ o X₃ son cualquier aminoácido; y
 X₄ es una treonina o glutamina; o
 - b) una secuencia derivada de SEQ ID NO: 9 mediante una o más modificaciones químicas que protegen el péptido contra la proteólisis, en donde dicha modificación se selecciona entre el grupo consistente en i) el término N que está en forma de grupo acetilo, ii) el término C que está en forma de grupo amida, y iii) un enlace peptídico -CONH- que está modificado y reemplazado por un enlace reducido (CH₂NH), un enlace retro-inverso (NHCO), un enlace metileno-oxi (CH₂-O), un enlace tiometileno (CH₂-S), un enlace carba (CH₂CH₂), un enlace cetometileno (CO-CH₂), un enlace hidroxietileno (CHOH-CH₂), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o un enlace -CH=CH-.
2. El péptido según la reivindicación 1, que tiene entre 12 y 20 aminoácidos, y que comprende
 - a) la secuencia de aminoácidos EGVLYVGHHT (SEQ ID NO: 1), o
 - b) una secuencia derivada de SEQ ID NO: 1 por una o más modificaciones químicas que protegen el péptido contra la proteólisis, en donde dicha modificación se selecciona entre el grupo que consiste en i) el término N que está en forma de grupo acetilo, ii) el término C que está en forma de grupo amida, y iii) un enlace peptídico -CONH- que está modificado y reemplazado por un enlace reducido (CH₂NH), un enlace retro-inverso (NHCO), un enlace metileno-oxi (CH₂-O), un enlace tiometileno (CH₂-S), un enlace carba (CH₂CH₂), un enlace cetometileno (CO-CH₂), un enlace hidroxietileno (CHOH-CH₂), un enlace (N-N), un enlace E-alceno o un enlace -CH=CH-.
3. El péptido según la reivindicación 1 o 2, en donde los aminoácidos de los extremos N-terminal y C-terminal son aminoácidos básicos seleccionados del grupo que consiste en lisina, arginina o histidina.
4. El péptido según la reivindicación 3, que comprende, o que consiste en X₅-EGVLYVGHHT-X₆ (SEQ ID NO: 2), en donde X₅ y X₆ son independientemente lisina, arginina o histidina.
5. El péptido según la reivindicación 4, que consiste en KEGVLYVGHHTK (SEQ ID NO: 3).
6. El péptido según la reivindicación 4, que consiste en
 REGVLYVGHHTR (SEQ ID NO: 6);
 REGVLYVGHHTK (SEQ ID NO: 7); o
 KEGVLYVGHHTR (SEQ ID NO: 8).
7. Un ácido nucleico que codifica el péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una composición farmacéutica que comprende el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el ácido nucleico según la reivindicación 7, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. El péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el ácido nucleico según la reivindicación 7, para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección que implica la adhesión a un gangliósido de la membrana celular, en donde la afección es un trastorno neurodegenerativo, una enfermedad infecciosa o un tumor.
10. El péptido o ácido nucleico para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección que implica la adhesión a un gangliósido de la membrana celular según la reivindicación 9, en donde la afección es un trastorno neurodegenerativo seleccionado del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) o síndrome de Guillain-Barré.
11. El péptido o ácido nucleico para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección que implica la adhesión a un gangliósido de la membrana celular según la reivindicación 9, en donde la afección es una enfermedad infecciosa.
12. El péptido o ácido nucleico para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad infecciosa según la reivindicación 11, en donde dicha enfermedad infecciosa es una infección por un virus, por ejemplo, HIV o virus de la gripe, o una infección por una bacteria, por ejemplo *Helicobacter pylori* o *Vibrio cholerae*.

13. El péptido o ácido nucleico para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección que implica la adhesión a un gangliósido de la membrana celular según la reivindicación 9, en donde la afección es cáncer.

14. El péptido o el ácido nucleico para su uso según la reivindicación 13, para su uso en la prevención de la propagación o proliferación de células metastásicas.

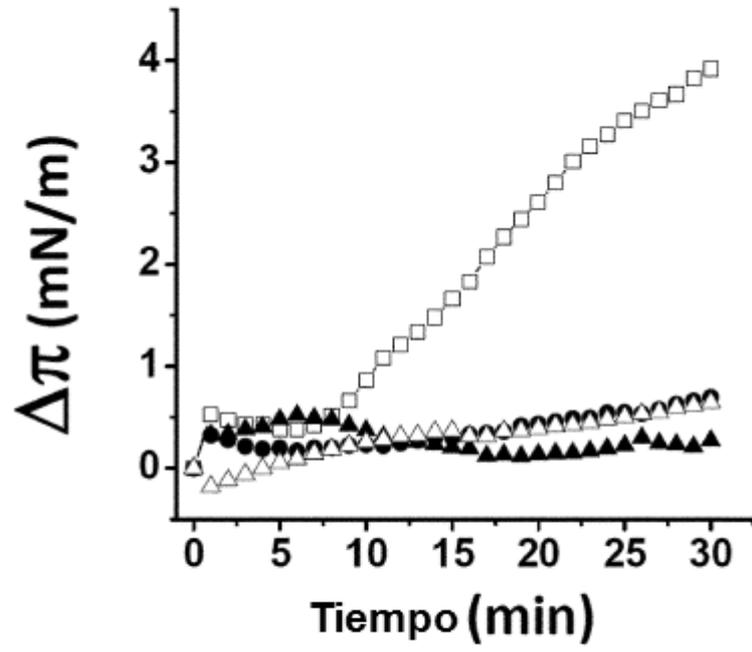


Figura 1A

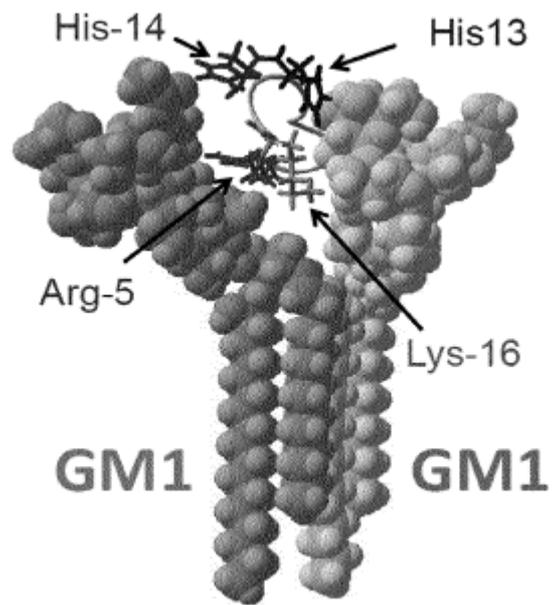


Figura 1B

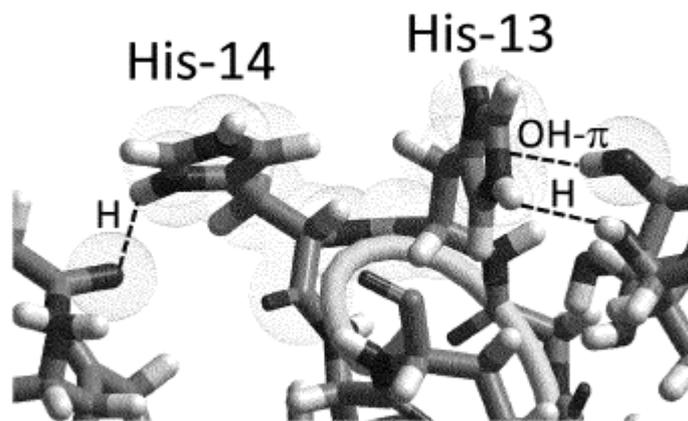


Figura 1C

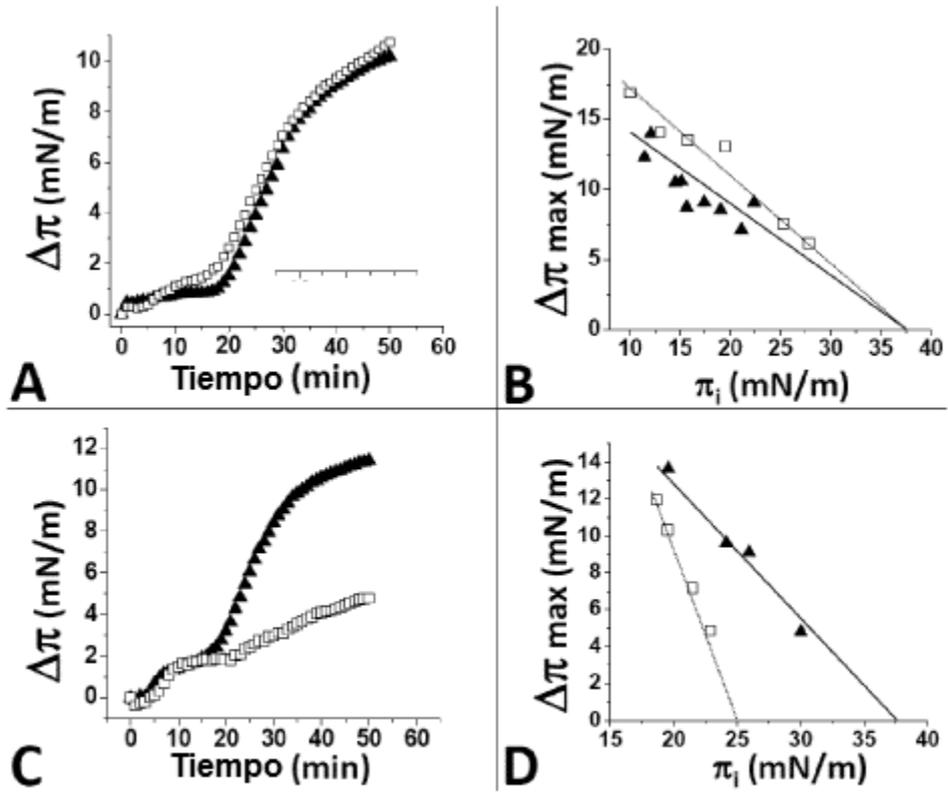


Figura 2

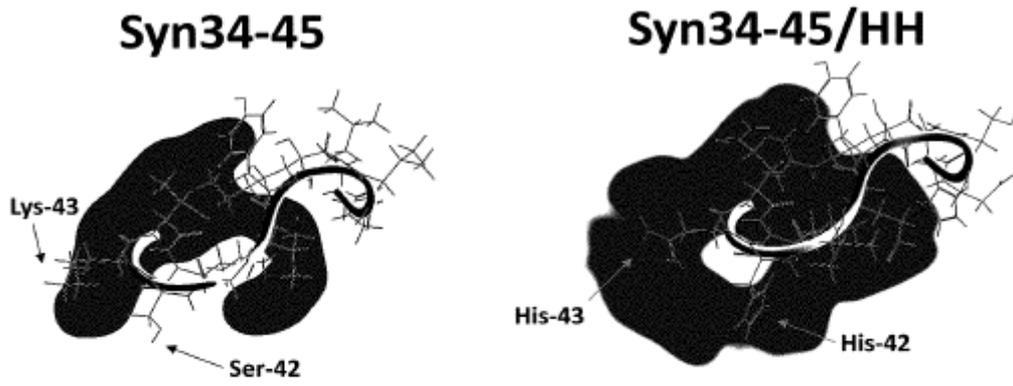


Figura 3A

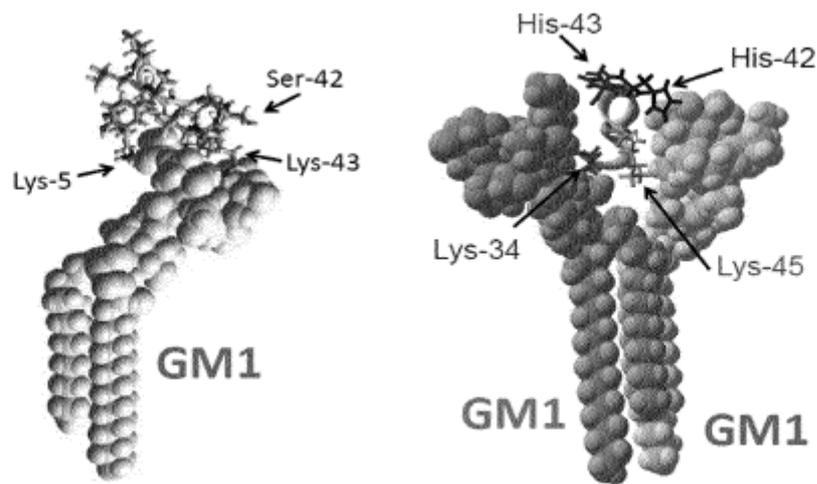


Figura 3B

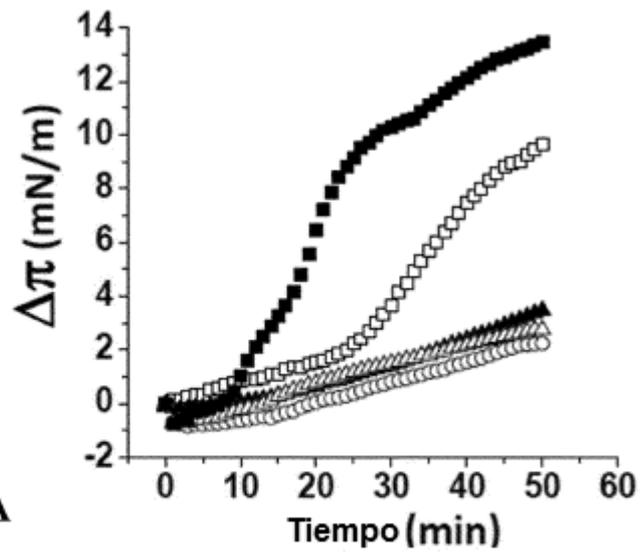


Figura 4A

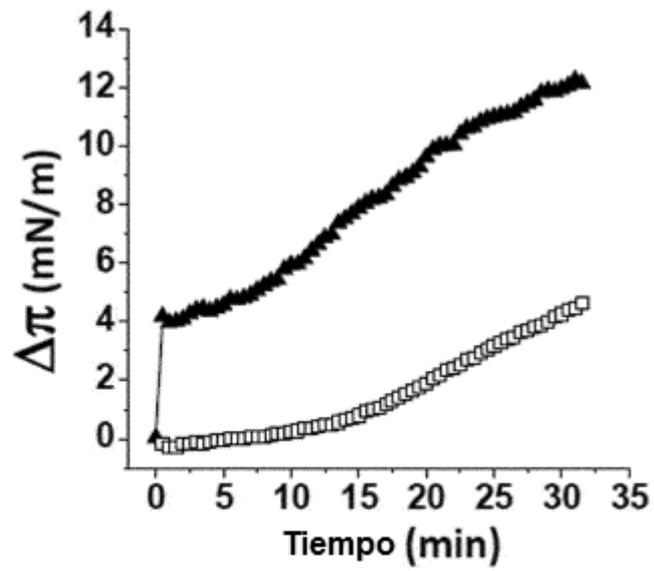


Figura 4B

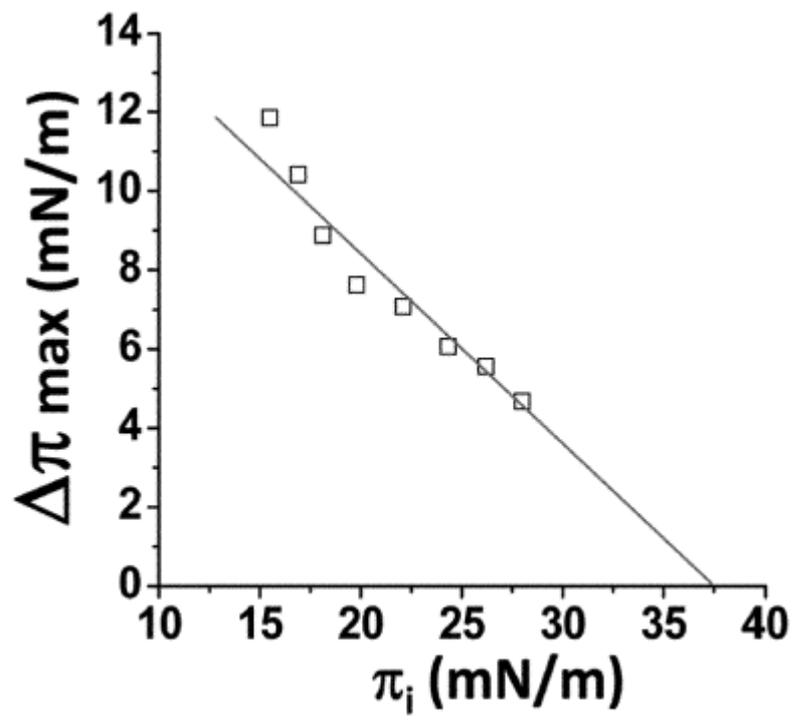


Figura 4C

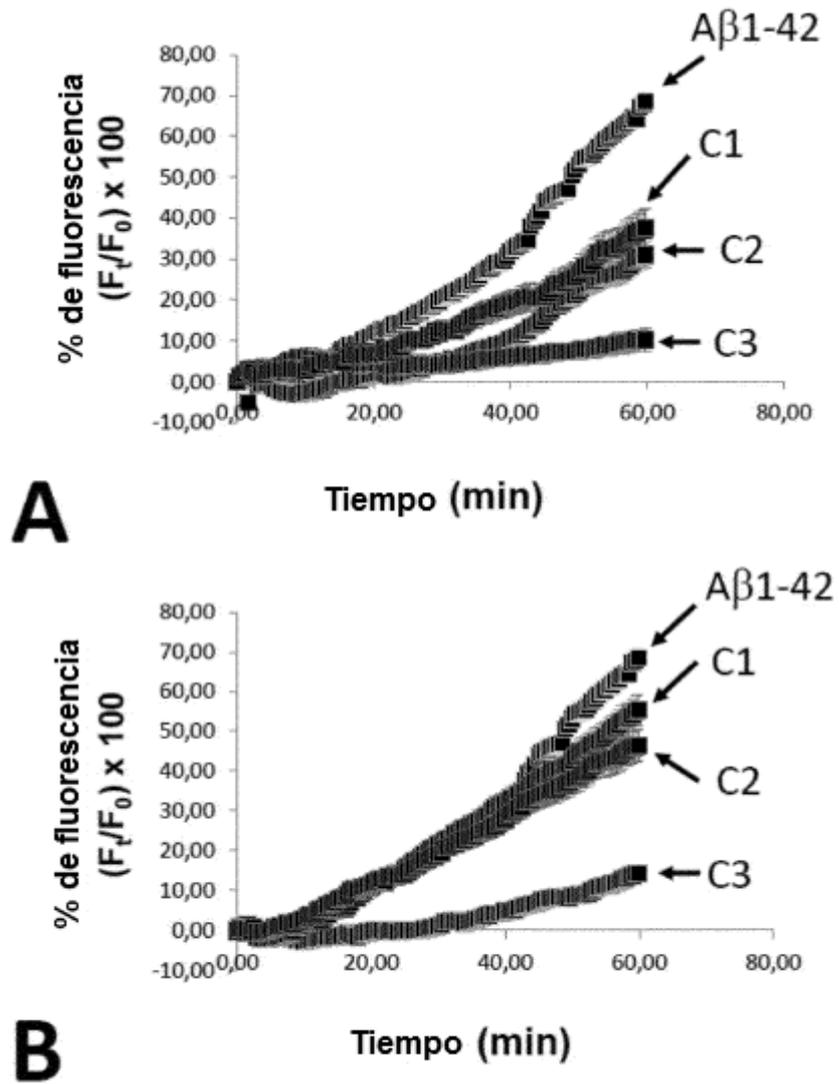


Figura 5

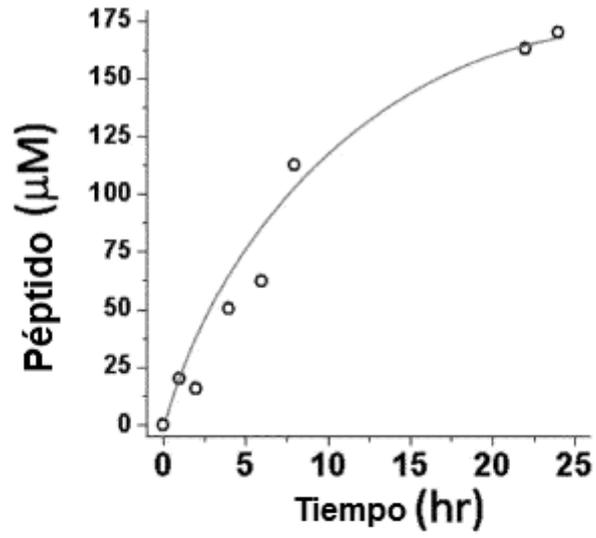


Figura 6

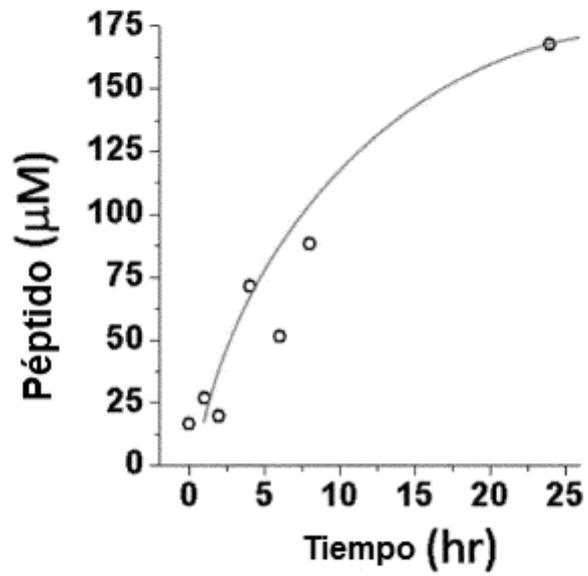


Figura 7

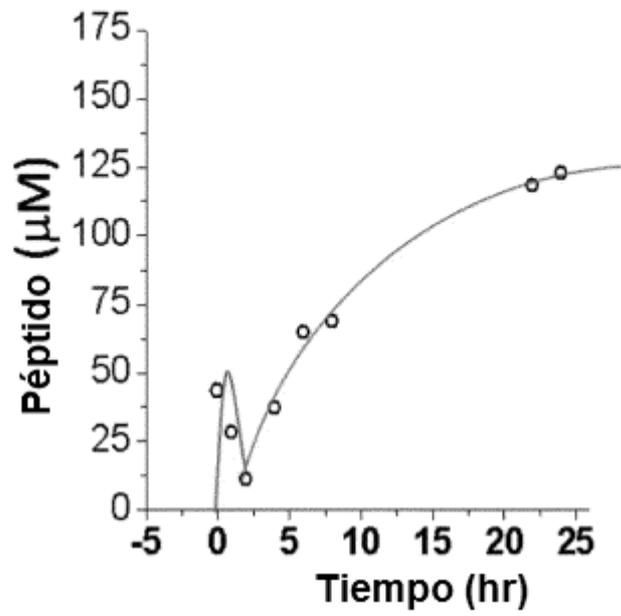


Figura 8

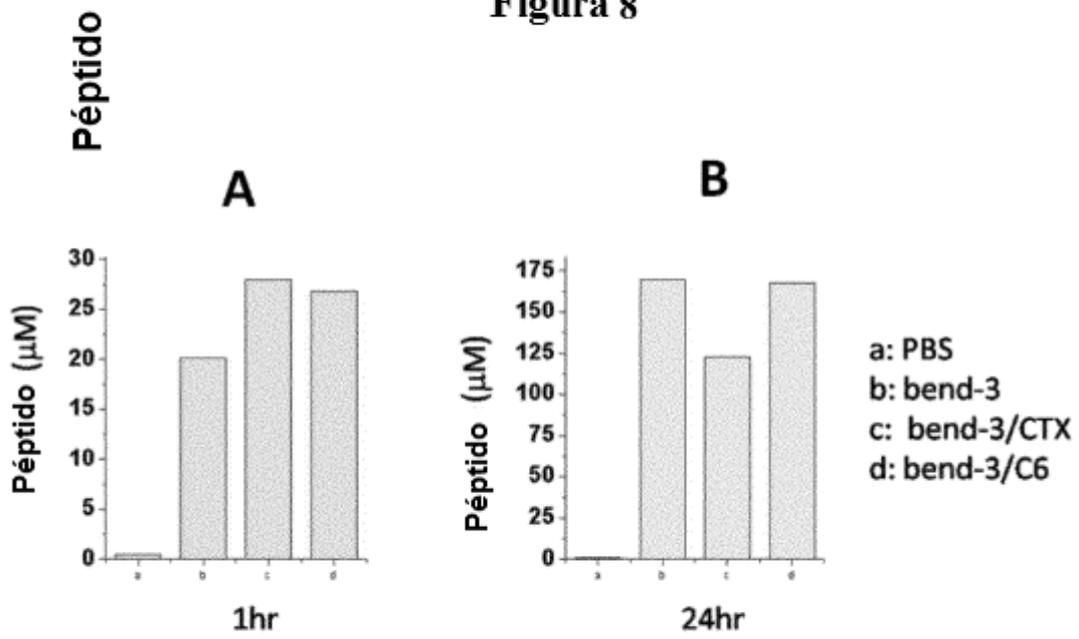


Figura 9

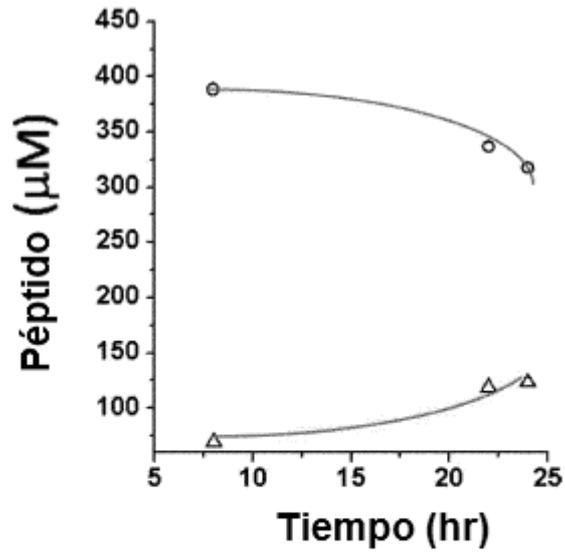


Figura 10

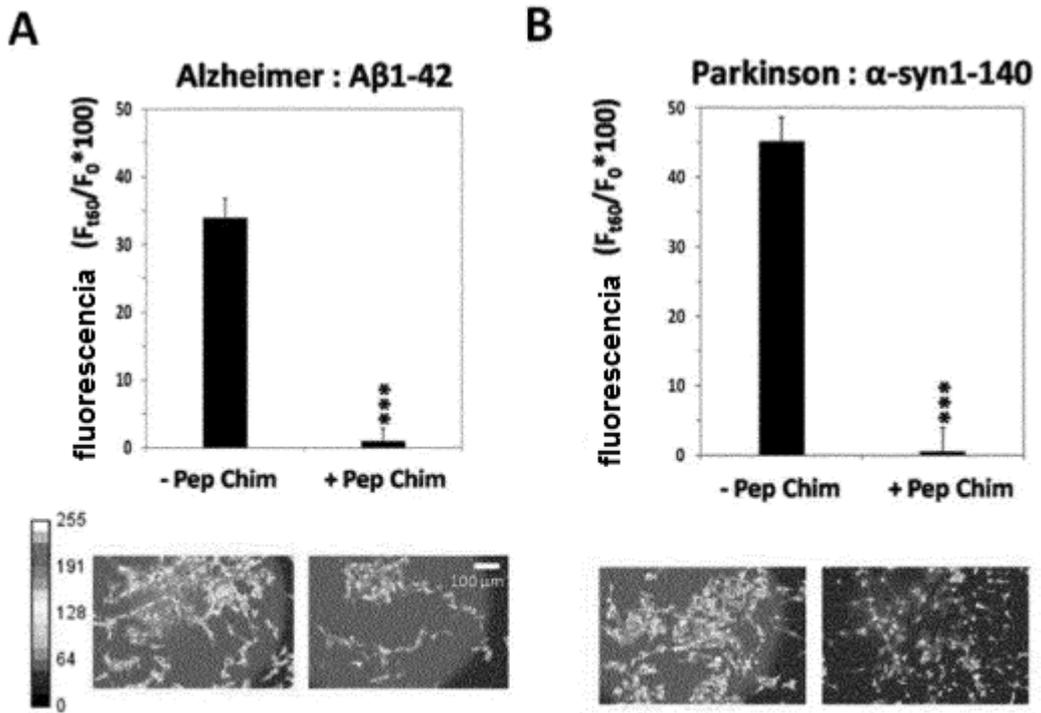


Figura 11

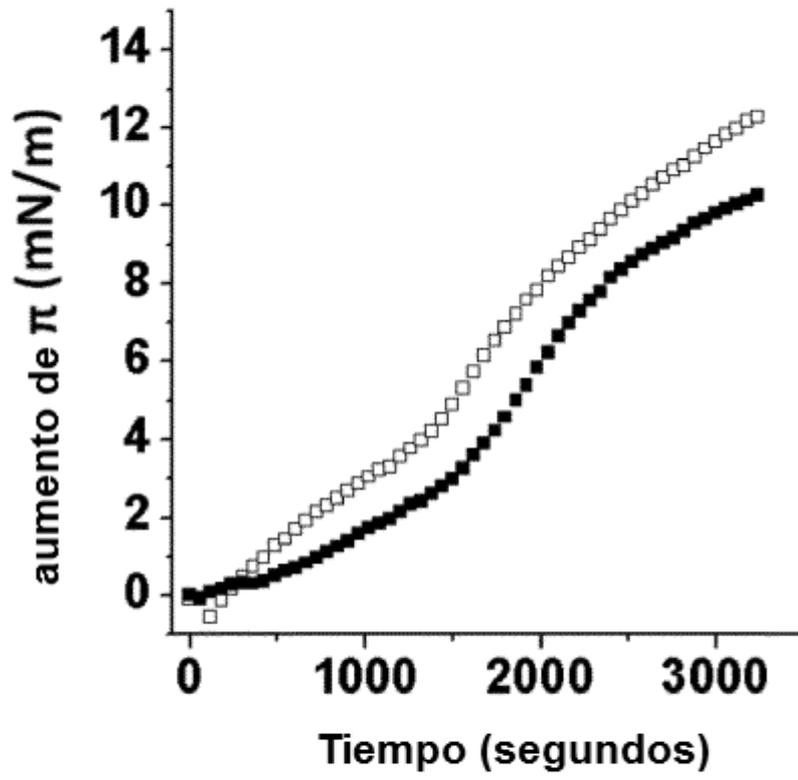


Figura 12