



## (12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 27868 A1** (51) Cl. internationale : **C07K 7/64; C07K 7/06; A61K 38/08; A61K 38/12**
- (43) Date de publication : **02.05.2006**

- 
- (21) N° Dépôt : **27740**
- (22) Date de Dépôt : **15.06.2004**
- (30) Données de Priorité : **20.12.2001 CU 0309/01**
- (86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/CU02/00010 04.12.2002**
- (71) Demandeur(s) : **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, Ave. 31 entre 158 y 190 Cubanacan Playa Ciudad de la Habana 10600 (CU)**
- (72) Inventeur(s) : **PEREA RODRIGUEZ, Silvio Ernesto ; REYES ACOSTA, Osvaldo ; SANTIAGO VISPO, Nelson Francisco ; PUCHADES IZAGUIRRE, Yaquelin ; SILVA RODRIGUEZ, Ricardo ; MORO SORIA, Alejandro ; SANTOS SAVIO, Alicia ; GONZALEZ LOPEZ, Luis Javier ; GONZALEZ BARRIOS, Belkis**
- (74) Mandataire : **TMP AGENTS**

- 
- (54) Titre : **PEPTIDES POUR LE TRAITEMENT DU CANCER ASSOCIE AU VIRUS DU PAPILOME HUMAIN (VPH) ET D'AUTRES TUMEURS.**
- (57) Abrégé : L'invention se rapporte à des peptides utilisés pour le traitement de tumeurs d'origine épithéliale, et spécifiquement de ceux associés à des types oncogènes du virus du papillome (VPH). L'invention se rapporte également à l'identification de peptides dont la structure permet le blocage du domaine de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII) par le biais de l'interaction directe avec ledit site. Dans la présente invention, on travaille sur onze peptides à structure cyclique et séquence d'acides aminés différentes, lesquels inhibent le site de phosphorylation par CKII in vitro, produisent une cytotoxicité dans les cellules de carcinome du col utérin humain transformées par VPH-16 (CaSki) et augmentent par ailleurs la sensibilité desdites cellules à l'action cytotatique de l'interféron (IFN). L'invention se rapporte de plus à l'usage de ces peptides conjugués ou fusionnés

avec d'autres peptides et composés chimiques à pénétration intracellulaire et à l'utilisation de molécules mimétiques d'origine peptidique et chimique.

**ABREGE**

L'invention se rapporte à des peptides utilisés pour le traitement de tumeurs d'origine épithéliale, et spécifiquement de ceux associés à des types oncogènes du virus du papillome (VPH). L'invention se rapporte également à l'identification de peptides dont la structure permet le blocage du domaine de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII) par le biais de l'interaction directe avec ledit site. Dans la présente invention, on travaille sur onze peptides à structure cyclique et séquence d'acides aminés différentes, lesquels inhibent le site de phosphorylation par CKII in vitro, produisent une cytotoxicité dans les cellules de carcinome du col utérin humain transformées par VPH-16 (CaSki) et augmentent par ailleurs la sensibilité desdites cellules à l'action cytostatique de l'interféron (IFN). L'invention se rapporte de plus à l'usage de ces peptides conjugués ou fusionnés avec d'autres peptides et composés chimiques à pénétration intracellulaire et à l'utilisation de molécules mimétiques d'origine peptidique et chimique.

## SOMMAIRE

### Peptides pour le traitement du cancer associé au virus du Papillome humain (PVH) et d'autres tumeurs épithéliales.

Cette invention est liée au champ de la pharmacologie moléculaire et spécialement au développement des peptides utiles au traitement des tumeurs épithéliales et celles qui sont associées aux types oncogéniques HPV. L'objectif principal de cette invention est d'identifier les peptides dont la structure permet de bloquer le domaine de phosphorylation de la caséine kinase II (CKII) par une intervention directe avec tel site.

Dans cette invention, on montre onze peptides cycliques avec des séquences acides aminés différentes, qui inhibent la phosphorylation du CKII *in vitro*, produisent une cytotoxicité au niveau des HPV-16, transforment les cellules (CASKI) et même augmentent la sensibilité de ces cellules à l'effet cytotoxique de l'interféron (IFN). En plus, l'invention se relie à l'usage de ces peptides conjugués ou fusionnés avec d'autres peptides et composés chimiques qui pénètrent dans les cellules aussi bien que l'usage simultané des peptides et les molécules chimiques mimétiques).

## HISTORIQUE DE L'INVENTION

Cette invention est reliée au champs de la pharmacologie moléculaire et spécialement au développement de peptides utiles au traitement des tumeurs épithéliales associées au HPV en permettant le blocage du domaine de phosphorylation de la caséine kinase (CKII) par une interaction directe avec pareil site .

La CKII est une enzyme thréonine/serine impliquée dans la prolifération cellulaire, et se localise principalement dans le noyau durant le processus de transformation maligne (Tawfic S, Yu S, Wang H, Faust R, Davis A, Ahmed K, 2001, *Histol. Histopathol.* 16:573-582).

En se basant sur les résultats indiquant de hauts niveaux de CKII dans différentes tumeurs épithéliales solides, il a été démontré que la phosphorylation obtenue par cette enzyme est un événement important dans la transformation maligne et le marqueur de progression de la tumeur (Seldin DC, Leder P, 1995, *Science* 267:894-897) (Faust RA, Gapany M, Tristani P, Davis A, Adams GL, Ahmed K, 1996, *Cancer Letters* 101:31-35).

D'autre part, l'expression finie de la CKII sur des souris transgéniques mène à une tumorigénèse dans les glandes mammaires en augmentant les voies de transduction du signal de Wnt/beta-caténine dans ces cellules mammaires épithéliales.

(Landesman-Ballag E, Ramien Mourez R, Sang DH, Sonenshein GE, Cardiff RD, Seldin DC, 2001, *Oncogène* 20:3247-3257).

Entres les tumeurs épithéliales, celles produites par les HPVs représentent une grande fraction.

Pour l'instant, la plupart des tumeurs génito-urinaires sont associées à ces oncovirus et la présence des séquences d'ADN HPVs a été démontrée au taux de 99.7% des tumeurs venant des cellules cervicales squameuses. De même, l'OMS a rapporté environ 500.000 patients de cancer cervical annuellement dans le monde entier.

A Cuba, 370 femmes avec un cancer cervical meurent chaque année à cause de cette maladie (profils de base de santé des pays des Amériques).

Selon que la progression des lésions soit maligne ou non, les HPVs sont classifiés en oncogénique ou en non oncogénique.

Les HPV-16 et -18 sont associés à une néoplasie intra-épithéliale qui progresse généralement vers une tumeur maligne, également les deux types de HPV sont associés à plus de 90% des dysplasies et des carcinomes cervicaux.

Comme aucun vaccin thérapeutique ou prophylactique n'est encore disponible pour l'extirpation des tumeurs associées aux HPVs, l'emploi des inhibiteurs visant la transcription virale et les oncoprotéines virales, devient plus attractif. Des biomodulateurs tels que les IFNs ont été utilisés avec efficacité dans certaines des maladies associées aux HPVs comme condylome, verrues plantar et papillomatosis respiratoire. (Koromilas AE, Li S, Matlashewski G, 2001, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 12:157-170).

Dans des expériences antérieures sur des cellules (HELA), nous avons démontré que l'exposition continue à l'alpha IFN produit un renversement du phénotype maligne de ces cellules avec une inhibition concomitante de l'expression de l'ARNm du HPV (López-Ocejo O, Perea SE, Reyes A, Vigoa L, López-Saura P, 1993, *J. tFN Res* 13:369-375). Dans le même modèle cellulaire, nous avons trouvé que l'alpha IFN régule l'ARNm du HPV à travers la répression de la transcription virale endogène (Perea SE, López-Ocejo O, Garcia-Miliàn R, AraÀa MJ, 1995, *J. IFN & Cytokine Res* 15:495-501). En accord avec les résultats obtenus sur les lignes cellulaires, nous avons observé que le traitement à l'alpha IFN régule l'expression de l'ARNm dans une étude pilote sur des patients avec cancer cervical (Garcia-Miliàn R, Rios MA, Diaz D, Silveira M, Guilar O, Amigé M, AraÀa MJ, Perea SE, 1996, *J. tFN and Cytokine Res* 16:709-713).

Malgré les résultats prometteurs sur l'utilisation de l'IFN comme régulateur de l'expression de l'ARNm du HPV, les données accumulées montrent une réponse variable de l'IFN et le phénomène de résistance envers ces cytokines a été observé dans le cas de 40 et 50% des patients durant les tests cliniques. (Arany I, Tying SK, Stanley<sup>4</sup> MA, Tomai MA, Muter RL, Smith MH, McDermott, DJ, Stade HB, 1999, *Antiviral Res* 43:55-63).

Quelques preuves moléculaires et cliniques montrent que l'oncoprotéine E7 joue un rôle central dans le phénomène de résistance de l'IFN. Par exemple, il a été prouvé que la E7 se lie au facteur de transcription induisant l'IFN (p48) cela affecte la réponse de l'IFN en bloquant l'activation de la transcription. (Barnard P and McMittan NAJ, 1999, *Virology* 259:305-313). De plus, l'altération du facteur de régulation de l'IFN (IRF-1) en présence de E7 a été même signalé (Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ, 2000, *J Biol Chem* 275:6764-6769) (Perea SE, Massimi P, Banks L, 2000, *J Mol Med* 5:661-666 ). Dans les tests cliniques, il a été démontré que la réponse de l'IFN dépend de l'expression de E7 dans les lésions contenant le HPV (Frazer IH, McMillan NAJ, 1997, *Papitlomatosis and condyroma acuminata. Clinical Applications of the Interferons* (R Stuart Harris and RD Penny, eds) Pp 79-90. Chapman and Hatl Medical, London). L'oncoprotéine E7 joue un rôle essentiel dans la transformation maligne provoquée par ces virus oncogéniques. Ainsi, il a été démontré que l'immortalisation des cellules primaires induite par la E7 mène à des mutations et aberrations chromosomiques dès le commencement du processus d'immortalisation (Mouglin C, Humbey O, Gay C, Riethmuller D, 2000, *J. Gynecol Obstet. Biol. Reprod* 29:13-20)

D'autre part, nous avons démontré que la transfection stable avec le gène E7 mène au développement du phénotype résistant de l'IFN dans les cellules tumorales sensibles.

De même, il a été signalé que l'oncoprotéine E7 se lie au gène suppresseur de la tumeur et bloque son fonctionnement comme Retinoblastoma (Rb) et Insuline – comme facteur de croissance liant la protéine – la "Proteine-3" (IGFBP-3) à travers le Cys 24 et le domaine terminal C respectivement (Nevins JR, 1992, *Science* 258:424-429) (Zwerschke W and Jansen-Durr P, 2000, *Advances in Cancer Res* 78:1-29)

Similairement, il a été démontré que les doublets Ser31/Ser 32 dans la protéine E7 sont des substrats de l'enzyme CKII.

Et ce domaine est essentiel pour la capacité de transformation de cette oncoprotéine (Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden K, 1990, *EMBO J* 9:153-160) (Chien W-M, Parker JN, Schmidt-Grimminger D-C, Broker TR, Chow LT, 2000, *Celi Growth & Differentiation* 11:425-435) et pour l'inhibition de la cascade de signallement de l'IFN (Perea SE, López-Ocejo O, Garda Mitián R, Banks L, Arafia MJ, 1996, *Eur. Cytokine Net* 7:503).

En se basant sur le rôle du site de phosphorylation de CKII dans la résistance de HPV et le développement du cancer, la fabrication de drogue bloquant un tel domaine peut devenir un coup de lancement utile pour les thérapies contre le cancer.

Des molécules inhibant le site de phosphorylation du CKII dans les substrats cellulaires E7 ou d'autres substrats cellulaires non pas été décrites 50 far.

En ce qui concerne l'oncoprotéine E7, seulement les peptides bloquant le site de liaison Rb (Cys 24) (Webster KR, Koleman KG, 1997, U55625031)(Oriff AI,

Riemen MW, EP 0412762 A2 910213) et d'autres régions terminales C (39-98) ont été décrites (Pidder J-D, Zwerschke W, 2000, EP0969013).

Quelques vaccins candidats, focalisés sur le développement de la réponse CTL spécifique du E7 HPV ont été décrits (50%) dans des tests cliniques ou précliniques (Chen C, Wang CC, Hung C, Pardoil DM, Wu T, 2000, Vaccine 18:2015-2022) (Chen CH, Ji H, Suh KW, Choti MA, Pardoil DM, Wu TC, 1999, Gene Ther 12:1972-1981).

Cependant, l'approche focalisée sur la réponse du CTL présente différents obstacles liés à la biologie de l'HPV.

Pour l'instant, les types HPV oncogéniques bas régulent les antigènes MHC de classe I qui sont essentiels pour la réponse du CTL.

Par ailleurs, l'expression du E7 a été associée à l'immuno-suppression locale dans l'environnement de la tumeur et cela peut même affecter le développement approprié de la réponse du CTL (Le Buanec H, D'Anna R, Lachgar A, Zagury JF, Bernard J, Ittle D, d'Alessio P, Hallez S, Giannouli C, Burny A, Bizzini B, Gallo RC, Zagury D, 1999, Biomed Pharmacother 53:424-431) (Lee SJ, Cho YS, Shim JH, Lee KA, Ko KK, Choe YK, Park SN, Hoshino T, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY, 2001, J Immunol 167:497-504). Accordé aux différents éléments, il paraît que la combinaison des vaccins CTL et des virus pharmaceutiques E7, peut donner de grandes perspectives.

D'autre part, l'approche des vaccins préventifs HPV présente un grand bénéfice et coût des différents aspects biologiques et sociaux : 1) une longue période de latence après l'infection primaire par le HPV, 2) une pauvre compréhension du mécanisme d'infection du HPV, 3) aucun modèle animal pour la propagation appropriée de l'HPV, 4) espèce spécifique, 5) l'évolution de l'impact social des vaccins HPV préventifs peut être lente. En conséquence, l'utilisation de produits pharmaceutiques visant les oncoprotéines virales peut fournir des avantages à ces approches focalisées sur la manipulation du système immunitaire.

### ESSENCE de L'INVENTION

L'essence et la nouveauté de cette invention se base sur la description pour la première fois des peptides cycliques permettant l'inhibition directe de l'emplacement de phosphorylation de CKII comme la cytotoxicité produite in vivo sur les cellules cervicales du carcinome HPV-16. En outre, ces peptides augmentent la sensibilité des cellules à l'effet cytostatique d'IFN.

### DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION :

L'invention vise principalement les peptides capables de se lier à l'emplacement de phosphorylation de CKII qui montre les séquences suivantes :

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

L'invention inclut également n'importe quelle variante homologue ou mimétique des peptides mentionnés, celui a été obtenu par la synthèse ou la manière de recombinaison comme n'importe quel peptide de fusion contenant les peptides décrits dans la liste. N'importe quel peptide, dont la structure permet de bloquer l'emplacement de phosphorylation de CKII en leurs substrats respectifs, est assumé en tant que variante homologue. De même, n'importe quelle molécule chimique (non peptidique) dont la structure permet de bloquer un tel emplacement de phosphorylation, est assumée comme variante mimétique.

L'autre objet de l'invention est la composition pharmaceutique qui comporte un ou plusieurs des peptides décrits dans l'invention aussi bien qu'un porteur approprié.

De même, l'invention comporte l'utilisation des peptides mentionnés réconcilies ou combinés avec n'importe quelle autre molécule appropriée comme cytokines et interférons :

- 1) empêchent la prolifération des tumeurs cellulaires
- 2) traitement du cancer associé au HPV et du cancer non associé
- 3) traitement des lésions associées au HPV aux étapes pré-malignes.



En outre, les peptides de l'invention peuvent être utilisés pour traiter des patients infectés par les HPV's résistants envers le traitement de l'interféron.

D'autre part, l'invention comporte un vecteur d'expression pour des cellules mammifères contenant une séquence d'ADN qui code pour n'importe quel peptide de ceux cités au-dessus.

Les peptides de l'invention ont une structure cyclique et ils sont principalement caractérisés par la capacité de se lier à l'emplacement de phosphorylation de CKII et abrogent un tel événement biochimique. Les peptides sont décrits sur la liste jointe. D'autre part, les effets **in vivo** produits par les peptides sur des cellules transformées par HPV-16 sont également montrés.

Les peptides décrits ont été définis par leur double capacité d'empêcher la phosphorylation de la séquence RRREEETEEE précédemment rapportée comme domaine optimal de consensus pour la phosphorylation de CKII (Promega Cat:V5661) et d'empêcher l'emplacement de phosphorylation contenu dans la région 28-38 de l'incorporation de HPV-16 E7.

Pour définir les peptides décrits dans l'invention, une bibliothèque cyclique de peptide de 11-aminoacide a été construite et exprimée sur la région P8 des bactériophages filamenteux. Le criblage de la bibliothèque a été effectué en utilisant la région 28-38 synthétique d'E7 comme cible, qui a été également conjuguée à la biotine pour la fixer sur une surface pleine.

Le choix de ces bactériophages liés à la région 28-38 d'E7 a été effectué par immunodétection en utilisant un anticorps spécifique contre la région P8 dans le bactériophage. En conclusion, l'ADN correspondant aux onze bactériophages à capacité élevée pour se lier à la région 28-38 d'E7, a été ordonnancée et les peptides respectifs ont été chimiquement synthétisés par la méthode de phase pleine. Les peptides synthétiques ont été encore purifiés par HPLC, analysés par spectrométrie de masse et finalement évalués eu égard à l'efficacité **in vitro** et **in vivo**.

Selon cette invention, malgré les différentes séquences des acides aminés parmi les peptides cycliques décrits ici, ils empêchent également l'événement de phosphorylation de CKII. Ce fait dénote que l'interaction de ces peptides avec l'emplacement de phosphorylation de CKII est principalement basée sur leur structure plutôt que sur la séquence elle-même.

Dans cette invention, on démontre également que les peptides linéaires montrent une capacité inférieure d'empêcher l'emplacement de phosphorylation de CKII. Ceci renforce l'importance de la structure dans la capacité de liaison de ces peptides à un tel domaine. Même, suggère l'efficacité d'autres molécules mimétiques, qui se lient à l'emplacement de phosphorylation de CKII.

Afin de réaliser l'action intracellulaire sur les substrats endogènes de CKII, les peptides décrits peuvent être chimiquement conjugués ou génétiquement fondus aux peptides pénétrants de cellules appartenant aux protéines comme le virus humain

d'immunodéficience (HIV-1) Tat 1 (Schwarze SR, Dowdy SF, 2000, Trends Pharmacol 21:45-48) le facteur de transcription codé par le gène de Drosophyla Antennapedia (Derossi D, et al, 1996, J. Biol Chem 271:18188-18193), la protéine VP22 recto du virus d'herpès (HSV) (Lindgreen M, et al, 2000, tend Pharmacol Sci 21:99-103) le pénétrant et transportant (Gariépy J, Kawamura K, 2001, tend Biotech 19:21-28 ), entre autres.

Pour évaluer l'hypothèse *in vivo* dans cette invention, les peptides cycliques ont été synthétisés, fondus au peptide pénétrant des cellules rapportées pour la protéine de HIV-1 Tat 1 (GRKKRRQRRRPPQC) et un signal nucléaire de localisation appartenant au SV le grand antigène de 40T (KKKRKVE).

Les données montrées dans cette invention indiquent clairement que les peptides cycliques montrent la cytotoxicité d'une façon dépendante de la dose sur les cellules cervicales de carcinome transformées par HPV-16 (CaSki). Ces résultats suggèrent l'emploi de ces peptides comme outil thérapeutique pour traiter des tumeurs de la même origine histologique aussi bien que des étapes pré-malignes comme le néoptasia intra épithéliale cervical. De même, les données expérimentales *in vivo* ont prouvé que les peptides cycliques étaient plus efficaces que leur forme linéale respective renforçant de ce fait l'importance de la structure sur l'effet lui-même.

De même, les peptides cycliques décrits dans cette invention sont efficaces sur de cellules **Hela** contenant le HPV-18 comme sur les cellules dérivées des cellules cancéreuses non petites du poumon HPV négatives H-82. Ces résultats se corrént avec ceux obtenus *in vitro* en cette invention où les peptides bloquent non seulement l'emplacement de phosphorylation de CKII sur le HPV-16 E7 mais également ils le bloquent en d'autres protéines contenant un tel emplacement.

Le fait que les peptides décrits ici sont efficaces sur les cellules HPV - négatives de la tumeur fournit un argument pour son emploi potentiel dans d'autres tumeurs épithéliales. D'autres résultats dans cette invention indiquent que le traitement des cellules de CaSki avec des peptides cycliques décrits ici augmente la sensibilité des cellules à l'effet cytostatique de l'alpha d'IFN.

Vu des évidences précédentes prouvant que l'emplacement de phosphorylation de CKII sur le HPV-16 E7 est exigé pour bloquer l'IFN signalant la cascade (Se de Perea, Lôpez-Ocejo O, Garda Miliân R, banques L, AraÂa MJ, 1996, Eur. Cytokine Net 7:503), les peptides décrits ici peuvent être utiles en déviant la résistance commune de l'IFN observée sur l'infection du HPV.

L'objet de cette invention peut être également lié au codage d'ADN pour chaque peptide décrit ici. Cet ADN a pu être présenté dans un vecteur mammifère d'expression et transfecté dans des cellules transformées HPV16 et des cellules non transformées. Le vecteur contenant l'oligonucléotide qui code pour chaque peptide peut être également employé comme alternative pour la thérapie de gène dans le cancer associé au HPV. En principe, les peptides décrits ici peuvent être employés dans les maladies associées au HPV avec d'autres agents comme avec les vaccins thérapeutiques basés sur la réponse cellulaire contre l'HPV.

Cette invention est illustrée par les exemples suivants :

**Exemple 1 :** Effet des peptides sur l'emplacement de la phosphorylation de CKII

Cette analyse est basée sur une réaction *in vitro* de phosphorylation en utilisant la séquence RRREEETEEE du substrat qui représente le domaine optimisé de consensus pour la phosphorylation de CKII. La réaction est exécutée dans 50  $\mu$ l de Tris:HCL 25 millimètres de pH 7.5,  $\gamma$ ATP de 1  $\mu$ mol de 32P-, triphosphate d'adénosine de 100  $\mu$ M, 2 mg/ml du peptide de substrat, 0.2 M NaCl, 10 millimètres MgCl et unité de 1 de l'enzyme de CKII (Promega). La réaction est incubée à 37°C pendant 10 minutes.

Après, le jour 5 de la réaction ont été repérés sur le papier de la chromatographie PE-81 (Whatmann) et quatre lavages avec 10 millimètres H3P04 ont été faits. En conclusion, la radioactivité associée aux assembleurs a été mesurée et les niveaux de CPM montrent au CKII l'activité enzymatique dans chaque échantillon. Simultanément, un inhibiteur spécifique de CKII comme l'héparine est inclus dans l'analyse comme commande d'internat. Les données montrées dans la figure 1, démontrent que les peptides cycliques empêchent la phosphorylation de CKII de 80%. En outre, peptides linéaires inhibent la phosphorylation CKII de la région 28-38 sur E7 bien qu'à un moindre degré comparé à la forme cyclique. Ces évidences indiquent que les peptides décrits ici empêchent l'emplacement de phosphorylation de CKII et suggèrent que la structure joue un rôle essentiel sur leur interaction avec les ordres de cible.

**Exemple 2 :** Effet des peptides sur la phosphorylation de HPV-16 E7 :

Cette analyse est basée sur la réaction *in vitro* de phosphorylation de l'oncoprotéine de HPV-16 E7 exprimé en *E. Coli* comme protéine de fusion à la transférase du glutathion S (GST). Avant la réaction enzymatique, la protéine de fusion d'E7-GST a été épurée par la chromatographie d'affinité en utilisant des perles de sépharose de glutathion (Pharmacie). La réaction de mélange est exécutée dans 50  $\mu$ l de l'amortisseur Tris:HCL 25 millimètres de pH 7.5,  $\gamma$ ATP de 1  $\mu$ mol de 32P-, triphosphate d'adénosine de 100  $\mu$ M, 40  $\mu$ l des perles contenant E7-GST, 0.2 M NaCl, 10 millimètres MgCl et 1 unité de CKII (Promega). La réaction est incubée à 37°C pendant 40 minutes.

Après, les perles sont lavées séparément trois fois avec 0.5 ml de l'amortisseur et finalement le niveau de phosphorylation de l'E7-GST est analysé par l'électrophorèse de 10% SDS-PAGE. La visualisation des protéines phosphorylées a été exécutée en développant des films radiographiques précédemment exposés aux gels secs. La quantification de la phosphorylation E7 a été faite par densimétrie. Les données sur le schéma 2 indiquent que les peptides décrits ici sont également efficaces en termes d'inhibition de l'emplacement de phosphorylation de CKII sur le HPV-16 E7.

**Exemple 3 :** Effet des peptides sur la prolifération des cellules de HPV-16 et de HPV18-transformés (CaSki et hela respectivement) : Dans cette analyse, CaSki ou cellules **hela** ont été semées à  $2 \times 10^4$  cellules/ml dans des plats 96-well (Costar) employant DMEM fourni avec 10% du sérum foetal du veau (FCS) (Gibco). Après 24 heures, des peptides ont été ajoutés au milieu de culture aux doses comportant une gamme entre 15  $\mu$ M et 500  $\mu$ M. L'incubation a été effectuée pendant 96 heures dans 5% CO<sub>2</sub> et finalement 20  $\mu$ l d'une solution de mis (1.90 mg/ml) Promega ont été bien ajoutés à chacun. Des plats ont été plus tard maintenus pendant une heure aux mêmes

conditions d'incubation et l'absorbance à 490 nm a été finalement analysée. Les résultats sont exprimés comme pourcentage de croissance respectant la commande sans peptides. À cette fin, les peptides cycliques et linéaux, ont été chimiquement synthétisés, fondu au peptide pénétrant les cellules du 1V-i Tat-1 de H qui peut pénétrer dans le cytoplasme et le noyau (le SR de Schwarze, SF sans élégance, 2000. tend Pharmacol 21:45-48).

Les données obtenues à partir de cette expérience ont démontré que les peptides décrits ici produisent un effet dépendant de la dose sur CaSki (HPV-16) et sur les cellules (HPV-1B) **hela** (les schémas 3 A et 3 B). Cet exemple prouve que les peptides de cette invention sont efficaces non seulement vis-à-vis des HPV-16 mais également eu égard aux HPV-18.

**Exemple 4 : Effet des peptides sur la prolifération des cellules HPV-négatives de la tumeur :** Dans cette analyse, les cellules H-82 (petit cancer de cellules du poumon) ont été semées à  $2 \times 10^4$  cellules/ml dans des plats 96-well (Costar) employant DMEM fourni avec 10% du sérum foetal de veau (FCS) (Gibco). Après 24 heures, des peptides ont été ajoutés au milieu de culture aux doses comportant une gamme entre 15 j.iM et 500 j.iM.

L'incubation a été effectuée pendant 96 heures dans 5%CO<sub>2</sub> et finalement 20 pi d'une solution de mis (1.90 mg/ml) Promega ont été bien ajoutés à chacun. Des plats ont été plus tard maintenus pendant une heure aux mêmes conditions d'incubation et l'absorbance à 490 nm a été finalement analysée. Des résultats sont exprimés comme pourcentage de croissance respectant la commande sans peptides. Pour cette analyse, les peptides cycliques décrits dans l'invention fondus au peptide pénétrant des cellules du HIV-1 Tat-1 ont été utilisés comme référé ci-dessus.

Les résultats obtenus à partir de cette expérience ont démontré que les peptides de cette invention produisent un effet dépendant de la dose sur la prolifération de cellules H-82. Sur le schéma 4 on démontre que les peptides de l'invention sont efficaces non seulement pour les cellules HPV-transformées mais également pour des cellules de la tumeur d'autres localisations et types histologiques comme le petit Cancer des cellules du poumon.

**Exemple 5 : Effet des peptides sur la réponse HPV-16 vers le traitement d'IFN à cellules de CaSki :**

Dans cette analyse, des cellules de CaSki ont été semées à  $2 \times 10^4$  cellules/ml dans des plats 96-well (Costar) employant DMEM complétées avec 10% F05 (Gibco). Après 24 heures, le  $\sim 120$  de chaque peptide a été ajouté au milieu de culture. Vingt quatre heures plus tard, l'alpha IFN a été ajouté dans la gamme entre 1000 et 31.5 U/ml. L'incubation a été effectuée pendant 96 heures dans 5% CO<sub>2</sub> et 20 pi de mis 1.90 mg/ml ont été ajoutés après. En outre, des plats ont été maintenus pendant une heure aux mêmes conditions et l'absorbance à 490 nm a été finalement lue. Des données sont montrées comme pourcentage de croissance vis-à-vis de la commande. Dans ces expériences, les peptides décrits dans l'invention ont été employés dans leur variante cyclique fondue au peptide pénétrant de cellules appartenant à la protéine de l'HIV Tat-1 comme mentionné ci-dessus. Les résultats observés sur le schéma 5 démontrent que l'incubation précédente des cellules de CaSki avec des peptides décrits dans l'invention rend ces cellules sensibles à l'effet anti-prolifératif de l'alpha IFN. Ces données

suggèrent l'utilité des peptides décrits dans l'invention pour traiter les patients infectés par le HPV qui sont réfractaires à la thérapie d'IFN.

**Exemple 6 :** Effet anti-tumoral du peptide inhibiteur de phosphorylation de CKII dans les tumeurs humaines implanté dans les modèles de souris nues: Pour ces expériences, des souris nues femelles de BalbO âgées de 6 à 8 semaines ont été employées. L'implantation de la tumeur a été effectuée en utilisant les cellules H-125 (Cancer de Cellules de poumon) qui ont été re-suspendues dans la solution de saline (PBS) à 1000 000 cellules/ml. La suspension de cellules a été inoculée en sous-cutanée dans l'abdomen. L'administration du peptide (ordre I sur la liste) a été faite ainsi que les cellules et a continué chaque autre jour jusqu'à finir un mois de traitement. Dans cette analyse, des doses s'étendant entre 1 et 10 mg/Kg de poids ont été évaluées. Pour examiner l'effet anti-tumoral, progression de paramètres. Ces données montrent l'efficacité anti-tumorale du peptide inhibiteur de phosphorylation de CKII dans un modèle de tumeur humaine implanté chez des animaux BalbO de l'expérience.

**Avantages de l'invention :**

1. Fournit des pharmaceutiques à large spectre d'application qui sont utiles non seulement dans les maladies associées à l' HPV, mais aussi bien dans lesdites tumeurs dont le niveau d'activité endogène de CKII est élevé.
2. Le fait que la région 28-38 est conservée parmi les HPVs, elle fournit la possibilité d'employer ces pharmaceutiques dans les maladies associées aux différents types de HPV.
3. Les peptides en tant que molécules thérapeutiques montrent la basse antigénicité une fois administrés aux êtres humains.
4. c'est un pharmaceutique dont la fabrication est facile et le coût est de 10w.

**Courte description des figures**

Le schéma 1 : Effet des peptides sur la phosphorylation de CKII

Le schéma 2 : Effet des peptides sur la phosphorylation de CKII de la HPVE7.

Le Schéma 3 A : Effet des peptides sur la prolifération des cellules de CaSki

Le Schéma 3 B : Effet des peptides sur la prolifération des cellules hela

Le schéma 4 : Effet des peptides sur la prolifération des cellules de tumeur de poumon

Le schéma 5 : L'effet des peptides sur la réponse des cellules transformées HPV-16 envers l'action d'IFN

Le schéma 6 : Effet antitumoral du peptide inhibiteur de phosphorylation de CKII dans les tumeurs humaines implanté chez les souris nues

SeqListPatentInPeptides.txt  
 SEQUENCE LISTING

<110> Center for Genetic Engineering and Biotechnology

<120> Peptides for treatment of the Human Papillomavirus (HPV)-associated cancer and other epithelial tumors

<130> Sequences

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 1

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<400> 1

Cys Ser Val Arg Gln Gly Pro Val Gln Lys Cys  
 1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 2

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<400> 2

Cys Ser Ser Cys Gln Asn Ser Pro Ala Leu Cys  
 1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 3

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<400> 3

SeqListPatentInPeptides.txt

Cys Gln Ile Pro Gln Arg Thr Ala Thr Arg Cys  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 4

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(11)

<400> 4  
 Cys Ala Lys Gln Arg Thr Asp Pro Gly Tyr Cys  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 5

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(11)

<400> 5  
 Cys Trp Met Ser Pro Arg His Leu Gly Thr Cys  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 6

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(11)

<400> 6  
 Cys Arg Asn Cys Thr Val Ile Gln Phe Ser Cys  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 7

SeqListPatentInPeptides.txt

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> ()..(11)

<400> 7  
 Cys His Tyr Ile Ala Gly Thr Val Gln Gly Cys  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 8

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(11)

<400> 8  
 Cys Pro Leu Val Ser Leu Arg Asp His Ser Cys  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 9

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(11)

<400> 9  
 Cys Lys Gln Ser Tyr Leu His His Leu Leu Cys  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 10

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(11)

<400> 10  
 Cys Phe Gln Pro Leu Thr Pro Leu Cys Arg Cys  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 11  
 <212> PRT



SeqListPatentInPeptides.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of the Artificial Sequence: Peptide 11

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(11)

<400> 11

Cys Gln Ser Tyr His Glu Leu Leu Leu Gln Cys  
1 5 10

**REVENDICATIONS**

**PEPTIDES POUR LE TRAITEMENT DU PAPILLOMAVIRUS HUMAIN  
CANCER ASSOCIE AU HPV ET D'AUTRES TUMEURS ÉPITHÉLIALES**

1) peptides qui lient et empêchent l'emplacement de phosphorylation de la caséine kinase II (CKII) et qui présentent les séquences suivantes :

- a. CSVRQGPVQKC;
- b. CSSCQNSPALC;
- c. CQIPQRTATRC;
- d. CAKQRTPDGYC;
- e. CWMSPRHLGTC;
- f. CRNCTVIQFSC;
- g. CLIIYIAGTVQGC
- h. CPLVSLRDHSC;
- i. CKQSYLHLLC;
- j. CFQPLTPLCRC;
- k. CQSYHELLLQS

Aussi bien que toute variante homologue ou mimétique à (synthétique ou de recombinaison) ces peptides

2) peptides selon le but 1 qui présentent une structure cyclique

3) peptides selon les objectifs 1 et 2 qui sont contenus dans un polypeptide de fusion

4) une composition pharmaceutique qui comporte un ou différents peptides des objectifs 1-3 aussi bien qu'un porteur approprié

5) une composition pharmaceutique selon le but 4 qui contient en plus une cytokine

6) une composition pharmaceutique selon le but 5 dont la cytokine est un interféron (IFN)

7) l'utilisation des peptides des objectifs 1-3 pour la cellule empêchant la prolifération des cellules tumorales.

8) l'utilisation selon le but 7 pour traiter les tumeurs associées aux HPV et non associées.

9) l'utilisation des peptides pour traiter les lésions associées aux HPVs aux étapes pré-malignes.

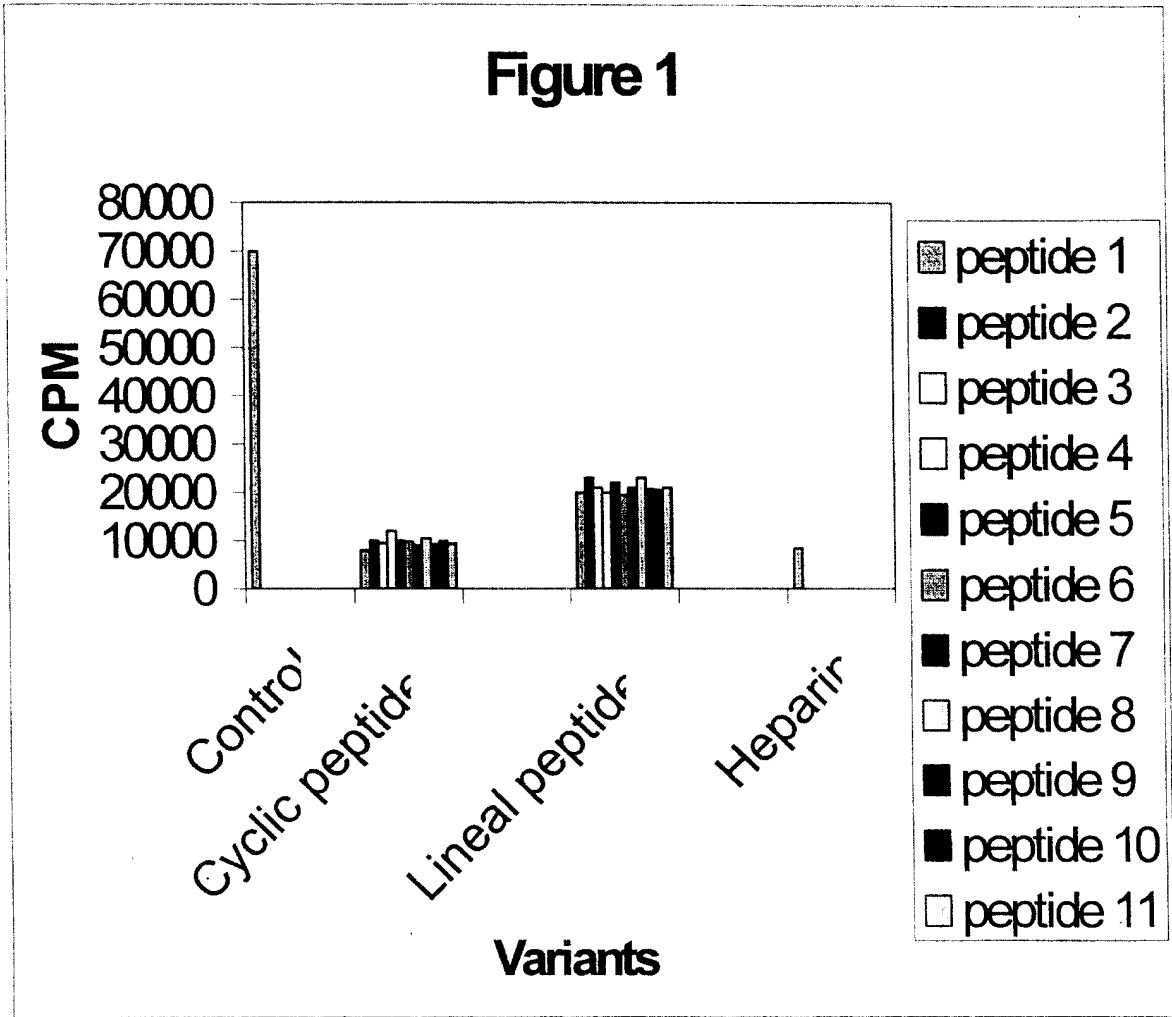
10) l'utilisation selon les objectifs 7 - 9 dans laquelle des peptides sont utilisés avec des cytokines

11) l'utilisation selon le but 10 dont la cytokine en est un IFN

12) l'utilisation selon les objectifs 7-9 dans laquelle les peptides sont employés pour traiter les patients HPV - résistants envers le vecteur mammifère d'expression du traitement d'IFN.

13) un vecteur mammifère d'expression contenant les ordres d'ADN qui codent pour n'importe lequel de ces peptides présentés dans les revendications 1-3.

Figure 1



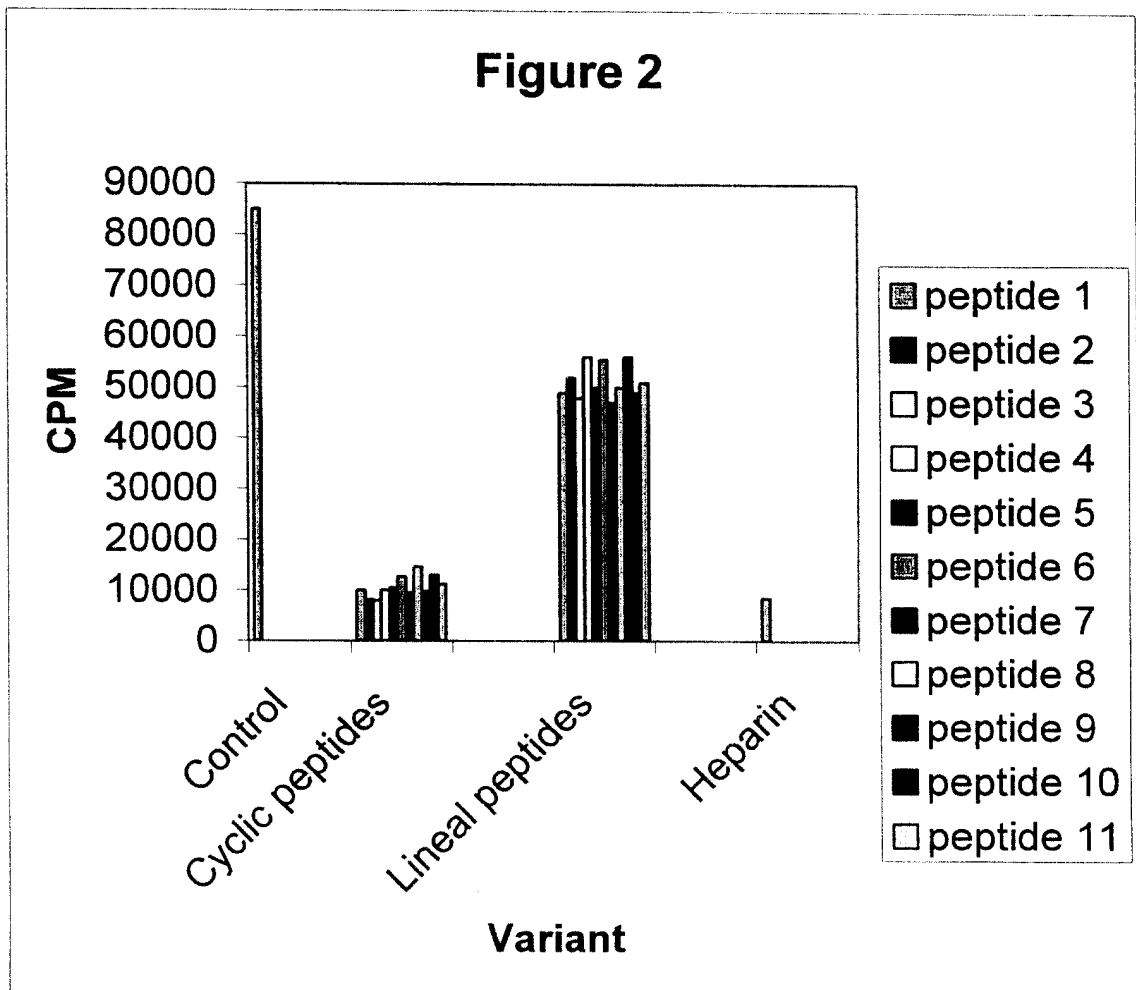


Figure 3A

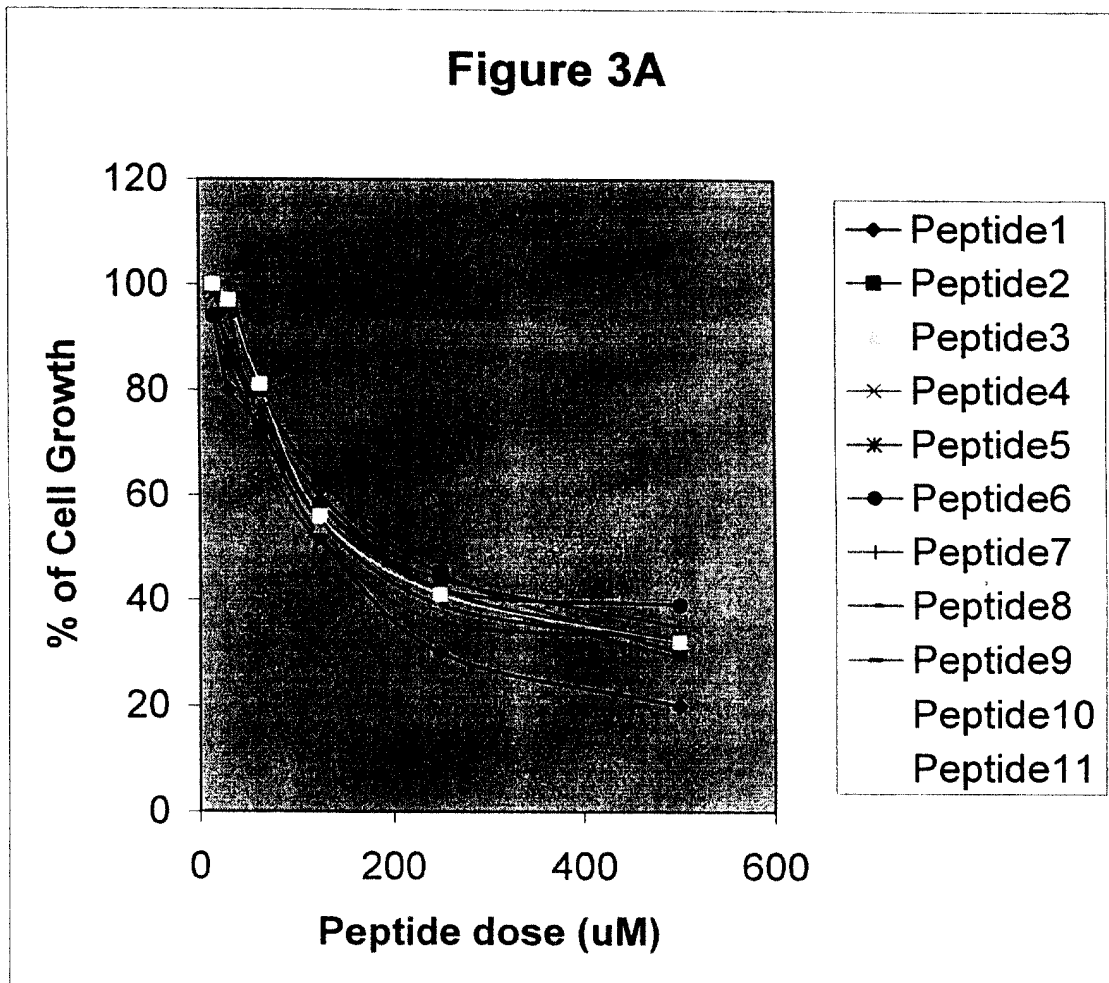


Figure 3B

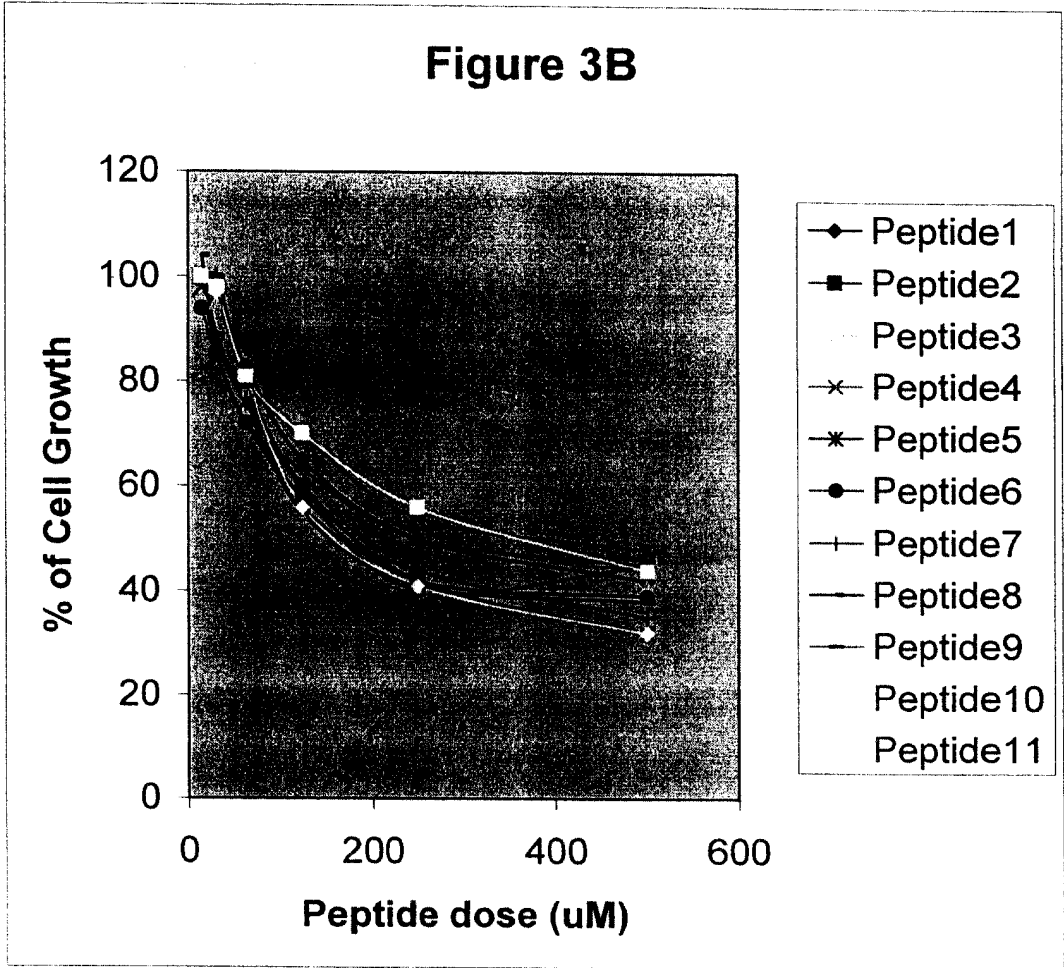


Figure 4

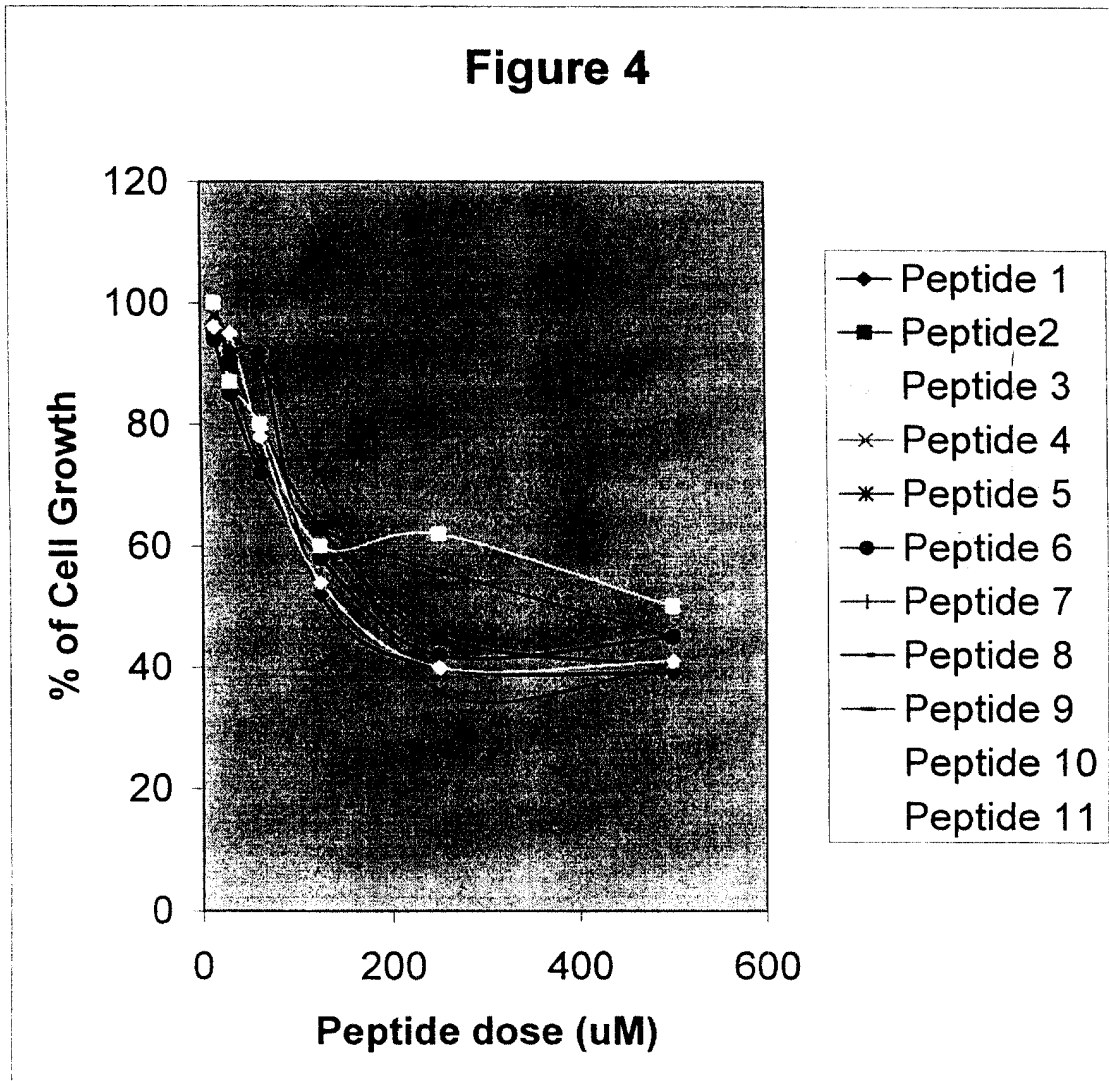






Figure 6

