

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
13 février 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/011906 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 14/70

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/02679

(22) Date de dépôt international : 26 juillet 2002 (26.07.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/10117 27 juillet 2001 (27.07.2001) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) :
SABATIER, Jean-Marc [FR/FR]; Chemin de Campbernard, F-13790 Rousset (FR). **DE WAARD, Michel** [NL/FR]; Quartier Valsède, F-13840 Rognes (FR).

(74) Mandataires : **DEMACHY, Charles** etc.; Grosset-Fournier & Demachy S.A.R.L., 20, rue de Maubeuge, F-75009 Paris (FR).

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) **Title:** USE OF PEPTIDE FRAGMENTS OF THE CALCIUM CHANNEL A-1 SUBUNIT, OPTIONALLY COMPRISING MUTATIONS, FOR SCREENING MOLECULES OF THERAPEUTIC INTEREST

(54) **Titre :** UTILISATION DE FRAGMENTS PEPTIDIQUES DE LA SOUS-UNITÉ α -1 DES CANAUX CALCIQUES, COMPORTANT LE CAS ÉCHEANT DES MUTATIONS, POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE

(57) **Abstract:** The invention concerns the use of peptide fragments of the α -1 subunit of calcium channels of mammals, of sequences derived by mutation of said fragments, or cells transformed by sequences encoding said fragments or derived sequences, for screening molecules of therapeutic interest.

(57) **Abstrégé :** La présente invention a pour objet l'utilisation de fragments peptidiques de la sous-unité α -1 des canaux calciques de mammifères, de séquences dérivées par mutation desdits fragments, ou encore de cellules transformés par des séquences codant pour lesdits fragment ou séquences dérivées, pour le criblage de molécules d'intérêt thérapeutique.



WO 03/011906 A2

5 **UTILISATION DE FRAGMENTS PEPTIDIQUES DE LA SOUS-UNITÉ α -1 DES CANAUX CALCIQUES, COMPORTANT LE CAS ECHEANT DES MUTATIONS, POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE.**

10

La présente invention a pour objet l'utilisation de fragments peptidiques de la sous-unité α -1 des canaux calciques de mammifères, de séquences dérivées par mutation desdits fragments, ou encore de cellules transformés par des séquences codant pour lesdits fragment ou séquences dérivées, pour le criblage de molécules d'intérêt thérapeutique.

15

L'importance de la boucle I-II dans la régulation de l'activité du canal est connu depuis 1994, date à laquelle le site d'ancrage de la sous-unité β auxiliaire fut identifié (Pragnell M. et al., (1994), « Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit » Nature 368, 67-70:). Cette sous-unité β produit un nombre impressionnant de modifications fonctionnelles des canaux calciques.

20

La boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité α -1 des canaux calcium haut-seuils dépendants du potentiel relie entre elles le premier et le second des quatre domaines hydrophobes. Elle joue un rôle essentiel dans 1) la régulation de l'activité du canal (propriétés d'activation et d'inactivation), 2) le niveau d'expression membranaire du canal (contrôle du niveau de rétention au sein du réticulum endoplasmique), 3) la régulation par les protéines

25

exogènes (site de fixation du complexe $G\beta\gamma$ des protéines G) et 4) la régulation par les sous-unité β des canaux calciques (site d'ancrage de la sous-unité β et premier site de régulation). D'après les résultats expérimentaux obtenus par les Inventeurs, il apparaît particulièrement

30

intéressant d'utiliser la boucle I-II des canaux calciques pour la compréhension des rôles cellulaires de ces canaux calciques, pour l'inactivation neuronale, ou encore comme une cible pharmacologique pour la modulation de l'activité des canaux calciques.

En effet l'invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que l'expression exogène de la boucle I-II, lorsqu'elle est couplée à un segment transmembranaire, inhibe de manière substantielle l'expression membranaire de canaux calciques natifs. Ce résultat permet de réduire l'expression de canaux calciques dans un tissu

35

donné afin d'appréhender la fonction cellulaire de ces canaux.

Les Inventeurs ont démontré que la boucle I-II est une boucle moléculaire organisatrice. Elle est couplée à d'autres boucles cytoplasmiques du canal calcique (séquences amino et carboxy-terminales, boucles II-III et III-IV). Ces interactions intra-moléculaires ont

5 pour fonction le contrôle de l'inactivation. Par exemple, l'interaction entre boucle I-II et boucle III-IV du canal calcium de type P/Q a joué un rôle primordial dans le contrôle de la cinétique d'inactivation du canal. De façon spectaculaire, ces interactions sont partiellement ou totalement interrompues par l'interaction de la boucle I-II avec la sous-unité β . En d'autres termes, la sous-unité β des canaux calcium entre en compétition avec les interactions intramoléculaires de la boucle I-II. Avec de tels résultats, on peut s'attendre à ce que le complexe $G\beta\gamma$, qui lui aussi se fixe sur la boucle I-II, puisse aussi entrer en compétition avec ces interactions moléculaires. Ce serait par le biais de ces compétitions que le complexe $G\beta\gamma$ provoquerait la régulation du canal calcique (diminution de l'amplitude du courant calcique et ralentissement de la cinétique d'activation).

15 Ainsi, un des principaux buts de la présente invention est de développer un test de criblage visant à identifier des molécules capables de perturber les interactions intramoléculaires et l'activité ionique de la sous-unité α_1 des canaux calciques à hauts-seuils, lesdites molécules étant susceptibles d'être utilisées notamment dans le cadre du traitement de l'ischémie cérébrale ou de la neurodégénérescence

20 La présente invention a pour objet l'utilisation :

- de fragments peptidiques de la sous-unité α_1 des canaux calciques de mammifères, lesdits fragments correspondant à la boucle I-II et/ou à la boucle III-IV de ladite sous-unité α_1 , ou correspondant à une séquence peptidique dérivée de cette boucle I-II ou III-IV, notamment par substitution, et/ou délétion, et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ou correspondant à une partie peptidique de ladite boucle I-II, ou III-IV, ou d'une séquence dérivée de cette dernière, notamment à une partie peptidique d'au moins environ 5 acides aminés, ladite séquence dérivée et ladite partie de la boucle I-II ayant la propriété de ladite boucle I-II de se lier à la sous-unité β et à la boucle III-IV desdits canaux calciques, ladite séquence dérivée et ladite partie de la boucle III-IV ayant la propriété de ladite boucle III-IV de se lier à ladite boucle I-II,

30 - ou de séquences peptidiques mutées, dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés desdits fragments peptidiques susmentionnés de la boucle I-II de la sous-unité α_1 des canaux calciques dans la mesure où la ou les mutations en question affectent des acides aminés essentiels dans le cadre de l'expression des canaux calciques à la surface membranaire, et/ou de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés desdits fragments peptidiques susmentionnés de la boucle III-IV de la sous-unité α_1 des canaux

- 5 calciques, dans la mesure où la ou les mutations en question affectent des acides aminés essentiels dans le cadre de l'inactivation des canaux calciques,
- ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour les fragments peptidiques susmentionnés de la boucle I-II et/ou de la boucle III-IV de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques, ou codant pour les séquences peptidiques mutées
- 10 susmentionnées,
- pour la mise en œuvre de procédés de criblage :
- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, à savoir du criblage de molécules β like susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies liées à
- 15 une diminution anormale du nombre de canaux calciques telles que l'épilepsie, ou les dégénérescences neuronales,
- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, à savoir du criblage de molécules β like susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une augmentation du nombre de canaux
- 20 calciques à la membrane plasmique aurait un effet bénéfique, telle que la maladie de Parkinson, les diabètes insulino-dépendants, ou le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton,,
- et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, à savoir du criblage de
- 25 molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies liées à une augmentation anormale du nombre de canaux calciques telle que l'hypertrophie cardiaque,
- et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une diminution du nombre de canaux calciques à
- 30 la membrane plasmique aurait un effet bénéfique, telle que l'épilepsie, l'hypertension, l'angine de poitrine, ou l'ischémie cérébrale,
- et/ou de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre de la stimulation ou de l'inhibition de la
- 35 communication neuronale, notamment dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués

5 dans la libération des neurotransmetteurs aurait un effet bénéfique, telles que les épilepsies, les ataxies, les migraines, la maladie de Parkinson, ou les ischémies cérébrales.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de fragments peptidiques correspondant à la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$, ou à une séquence peptidique dérivée, ou à une partie de cette boucle I-II, ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour lesdits fragments, tels que définis ci-dessus, pour la
10 mise en œuvre de procédés de criblage :

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies ci-dessus,
- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes
15 cellulaires, telles que définies ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée :

- de la séquence peptidique correspondant à la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

20 SGFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEVILAEDETDVEQRHPF
DGLRRATIKKSKTDLLHPAEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSFFHKKERR
MRFYIRRMVKTQ

- ou de la séquence peptidique correspondant à la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines, ladite séquence correspondant à la
25 séquence SEQ ID NO : 4 suivante :

SGFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEVILAEDETDGEQRHPF
DGLRRRTTIKKSKTDLLNPAAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSTFFHKKERR
MRFYIRRMVKTQ

- ou de fragments des séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 susmentionnées, comprenant au moins la séquence SEQ ID NO : 15 suivante : QQIERELNGYMEWISKA,

- ou de cellules transformées avec les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 3 suivantes codant respectivement pour les séquences peptidiques SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 susmentionnées, ou transformées avec la séquence nucléotidique comprise dans les séquences SEQ ID NO : 1 et 3 et codant pour la séquence SEQ ID NO : 15
35 susmentionnée :

5 SEQ ID NO : 1 :

tcaggggagtttgccaaagaaagggagcgggtggagaaccggcgcgattcctgaagctcggcggcagcagcagattgaacgc
gagctcaacgggtacatggagtggatctcaaaagcagaagaggtgatcctgcagaggacgagaccgacgtggagcagagacatc
cctttgatggagctctgcggagagccactatcaagaagagcaagacggacctgctccaccagaggaggcggaggatcagctggcc
gacatcgctccgtgggggtctccctttgccgagccagcattaaaagtccaagctggagaactcgagttttccacaaaaaagagag
10 gagaatcggtttctacatccgtcgcgtggtcaaaactcag

SEQ ID NO : 3

tcagggg agtttgccaa agaaaggga cgggtggaga accggcgggc tttctgaag ctgaggcggc aacaacagat
tgaacgtgag ctcaatgggt acatggaatg gatctcaaaa gcagaagagg tgatcctcgc cgaggatgaa actgacgggg
15 agcagaggca tccctttgat ggagctctgc ggagaaccac cataaagaaa agcaagacag atttgcataa cccgaagag
gctgaggatc agctggctga tatagcctct gtgggttctc ccttcgccg agccagcatt aaaagtcca agctggagaa
ctcgaccttt tttcacaaaa aggagaggag gatcggttc tacatcgcc gcgtggtcaa aactcag

De préférence, dans le cas de l'utilisation susmentionnée de fragments peptidiques de
20 la sous-unité α_1 ayant une taille supérieure à environs 5 acides aminés, lesdits fragments
sont fusionnés du côté N-terminal à une séquence peptidique transmembranaire, à savoir
une séquence peptidique ayant pour effet de maintenir lesdits fragments peptidiques dans la
membrane cellulaire, telle que la séquence transmembranaire de la chaîne α du récepteur
CD8 humain contenue dans la séquence SEQ ID NO : 5 suivante :

25 LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR

En variante, l'invention concerne également l'utilisation susmentionnée de cellules
transformées avec une séquence nucléotidique recombinante exogène codant pour une
séquence peptidique transmembranaire telle que définie ci-dessus, cette dernière séquence
étant située en amont de la séquence codant pour le fragment peptidique susmentionné de la
30 sous-unité α_1 .

L'invention a également pour objet tout procédé de criblage de molécules restaurant le
nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a
anormalement diminué, telles que définies ci-dessus, et/ou de molécules augmentant le
nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies ci-dessus,
35 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de fragments peptidiques de la sous-unité α_1 tels que définis ci-
dessus, avec des cellules exprimant des canaux calciques pendant un temps suffisant pour que

5 le nombre de canaux calciques diminue de manière significative à la surface desdites cellules, puis avec des molécules à tester,

- ou mise en présence de cellules transformées à l'aide de séquences nucléotidiques codant pour des fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définis ci-dessus, réduisant ainsi le nombre de canaux calciques à la surface desdites cellules, avec des molécules à tester,

10 - détection d'une éventuelle augmentation du nombre de canaux calciques à la surface des cellules transformées témoignant de l'effet des molécules testées d'augmentation du nombre de canaux calciques à la surface des membranes cellulaire, notamment par mesures électrophysiologiques, ou à l'aide de sondes fluorescentes ou radioactives.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de
15 séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'expression des canaux calciques à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet d'augmenter ou de diminuer l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques,
20 pour la mise en œuvre de procédés de criblage :

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies ci-dessus,

- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies ci-dessus,

25 - et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, telles que définies ci-dessus,

- et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de séquences
30 peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'augmenter l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions 383, 395, 396, 398, 427, et 428 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID
35 NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un au moins de Q en position 24, W en position 36, I en position 37, K en position 39, K en position 68, et K en position 69, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine.

5 L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet de diminuer l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions 387, 422, et 423 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, 10 ou aux positions équivalentes de la sous-unité Cav2.1 humaine, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un au moins de R en position 28, R en position 63, et R en position 64, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine.

L'invention concerne également tout procédé de criblage :

- 15 - de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies ci-dessus,
- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies ci-dessus,
- et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les 20 membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, telles que définies dans la revendication 1,
- et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies ci-dessus,
- caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 25 - mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définies ci-dessus, avec des molécules à tester déjà sélectionnées pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles I-II,
- sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles I-II et ne 30 se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées, notamment par l'utilisation de la technique de Biacore (O'Shannessy DJ et al. (1992) « Immobilization chemistries suitable for use in the Biacore surface plasmon resonance detector » Anal Biochem. 205, 132-136) basée sur un principe physique et optique d'interaction moléculaire,
- le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente 35 avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur l'augmentation ou la diminution du nombre de canaux calciques à

5 la surface desdites cellules, notamment par mesures électrophysiologiques, ou à l'aide de sondes fluorescentes ou radioactives.

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'inactivation des canaux calciques
10 présents à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet de moduler l'activité des canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions 387 et 388, et plus particulièrement par la seule mutation de l'acide aminé situé en position 388, de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques
20 de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un au moins de R en position 28, et E en position 29, substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment R28 est substitué par une alanine ou par E, et E29 est substitué par une alanine.

L'invention concerne également tout procédé de criblage de molécules régulant l'état
25 d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définies ci-dessus, avec des molécules à tester déjà sélectionnées pour leur
30 capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles I-II,

- sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles I-II et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées, notamment par la technique Biacore susmentionnée,

35 - le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur la régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques

5 neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs desdites cellules, notamment par mesures électrophysiologiques.

10 L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée de fragments peptidiques correspondant à la boucle III-IV de la sous-unité α_1 , ou à une séquence peptidique dérivée, ou à une partie de cette boucle III-IV, ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour lesdits fragments, tels que définis ci-dessus, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement l'utilisation susmentionnée :

15 - de la séquence peptidique correspondant à la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines ou de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7 suivante :

ITFQEQGDKMMEEYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNKQSFQYRMWQFVVSP

20 - ou des cellules transformées avec la séquence nucléotidique codant pour la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 6 suivante :

at caccttcag gagcaagggg acaagatgat ggaggaatac agcctggaga aaaatgagag ggctgcatt gatttcgcca
tcagcgcaa gccgctgacc cgacacatgc cgcagaacaa gcagagcttc cagtaccgca tgtggcagtt cgtggtgtct
ccg

25 - ou de cellules transformées avec la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 6 et SEQ ID NO : 8 codant respectivement pour les séquences peptidiques SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 9 susmentionnées codant pour la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 8 suivante :

30 atcacct tccaggagca gggcgacaag atgatggagg agtacagctt ggagaaaaac gagagggcct gcatcgactt
cgccatcagt gccaagccgc tgaccaggca catgccccag aacaagcaga gcttcagta ccgcatgtgg cagttcgtgg
tgtccccg

35 De préférence dans le cas de l'utilisation de fragments peptidiques de la sous-unité α_1 ayant une taille supérieure à environ 5 acides aminés, lesdits fragments sont fusionnés ou non du côté N-terminal à une séquence peptidique transmembranaire, à savoir une séquence peptidique ayant pour effet de maintenir lesdits fragments peptidiques dans la membrane

5 cellulaire, telle que la séquence transmembranaire de la chaîne α du récepteur CD8 humain contenue dans la séquence SEQ ID NO : 5 suivante :

LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR

10 En variante, l'invention concerne également l'utilisation susmentionnée de cellules transformées avec une séquence nucléotidique recombinante exogène codant pour une séquence peptidique transmembranaire telle que définie ci-dessus, cette dernière séquence étant située en amont de la séquence codant pour le fragment peptidique susmentionné de la sous-unité $\alpha 1$.

15 L'invention a également pour objet tout procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ tels que ci-dessus, avec des cellules exprimant des canaux calciques pendant un temps suffisant pour que l'état d'inactivation des canaux soit modifié, puis avec des molécules à tester,
- 20 - ou mise en présence de cellules transformées à l'aide de séquences nucléotidiques codant pour des fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définis ci-dessus, avec des molécules à tester,
- détection de l'effet des molécules testées sur l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, notamment par
- 25 mesures électrophysiologiques.

30 L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle III-IV de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'inactivation des canaux calciques présents à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet de moduler l'activité des canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus.

35 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés de la séquence peptidique correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7.

5 A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés entre les positions 8 et 19 de la séquence peptidique correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7, à savoir d'un au moins des acides aminés compris dans la
10 séquence : DKMMEEYSLEKN.

L'invention concerne également tout procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15 - mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle III-IV de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définies ci-dessus, avec des molécules à tester déjà sélectionnées pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles III-IV,

20 - sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles III-IV et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées, notamment selon la technique Biacore susmentionnée,

- le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur la régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs desdites cellules, notamment
25 par mesures électrophysiologiques.

L'invention a également pour objet les séquences peptidiques suivantes :

30 - les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de Q en position 24, W en position 36, I en position 37, K en position 39, K en position 68, et K en position 69, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine,

- les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de R en position 28, R en position 63, et R en position 64, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine,

35 - les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de R en position 28, et E en position 29, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment R28 est substitué par une alanine ou par E, et E29 est substitué par une alanine,

- la séquence SEQ ID NO : 15 suivante : QQIERELNGYMEWISKAE.

5 L'invention sera davantage illustrée à l'aide des résultats expérimentaux qui suivent :

I- Démonstration de la diminution du nombre de canaux calciques à la surface membranaire des cellules chromaffines bovins et des cellules granulaires du cervelet de rat.

10 Les résultats des Inventeurs démontrent que l'expression de la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 dans les cellules chromaffines de bovins ou les cellules granulaires de cervelet induit une diminution notable des canaux calciques haut-seuils à la surface membranaire de ces cellules. Les mesures effectuées montrent que plus de 50% du courant calcique haut-seuil est diminué dans ces cellules suite à l'expression de cette séquence.

15 L'expression de la boucle I-II du canal $Ca_v2.1$ est induite suite à une méthode de transfection cellulaire (grâce à un agent de transfection : lipofectamine, fugène, etc...). Afin d'avoir la capacité de fixer les sous-unités β endogènes à ces cellules, nous avons constaté que la capacité de cette séquence I-II à réduire l'expression à la membrane plasmique des canaux calciques haut-seuils endogènes est facilitée par son couplage à un segment transmembranaire.

20 Les Inventeurs ont utilisé pour leurs expériences le segment transmembranaire de la chaîne α du récepteur CD8 humain, couplé à la partie amino-terminale de la boucle I-II. Afin de faciliter la détection des cellules transfectées, la partie carboxy-terminale de la boucle I-II a été couplée à la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) qui possède la propriété de fluorescence verte (facilement détectable en microscopie à fluorescence). La figure 1A illustre la construction
25 utilisée pour ces expériences. En figure 1B, est illustrée la séquence en acide-aminés de la séquence transmembranaire de la chaîne α du récepteur CD8.

Séquence transmembranaire de la chaîne α du récepteur CD8 humain (contenu dans) :

LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR

30 **II- Démonstration de l'importance des acides aminés Arg 387 et Glu 388 de la séquence $Ca_v2.1$ de lapin dans l'inactivation de ce canal.**

Les résultats expérimentaux obtenus démontrent que les acides aminés de la boucle I-II du canal calcique $Ca_v2.1$ interviennent dans l'inactivation de ce canal. Deux modes de participation sont possibles :

35 1- En absence de sous-unité β , ces deux acides aminés sont impliqués dans une interaction moléculaire avec la boucle III-IV de la sous-unité $Ca_v2.1$ (Figures 2 et 3). Si ces interactions sont interrompues, soit par mutagenèse des acides aminés Arg

387 ou Glu 388 (Figure 4), soit en exprimant la boucle III-IV (qui peut alors entrer en compétition avec l'interaction naturelle entre les boucles I-II et III-IV du canal $\text{Ca}_v2.1$; Figure 5), l'inactivation du canal calcique est facilitée. Une inactivation facilitée représente, soit une transition accélérée de l'état ouvert du canal vers son état inactivé, soit une diminution du nombre de canaux activables à un potentiel membranaire donné de la cellule. Les méthodologies permettant la mesure des courants calciques et l'analyse de l'inactivation sont données en annexe A.

2- En présence de sous-unité β (la configuration normale du canal à la membrane plasmique), la charge électrique portée par les chaînes radicales de ces acides aminés (charge + pour Arg 387 et charge - pour Glu 388) joue un rôle dans l'inactivation de ce canal.

Les résultats démontrent que dans ces deux cas de figures, ces acides aminés peuvent être prises comme cible d'une intervention pharmacologique directe pour moduler l'inactivation des canaux calciques. La présence de ces acides aminés dans la plupart des canaux calciques neuronaux ($\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$ et $\text{Ca}_v2.3$), et chez la plupart des espèces, y compris chez l'homme suggère fortement que ces acides aminés interviennent également dans l'inactivation de ces canaux.

Figure 2 : Fixation de la boucle I-II de $\text{Ca}_v2.1$ sur différentes boucles intracellulaires. Une fixation de I-II est évidente sur la boucle III-IV de $\text{Ca}_v2.1$. Cette boucle III-IV a été exprimée et purifiée comme une protéine de fusion GST (Glutathion-S-Transférase). La protéine I-II du canal a été traduite in vitro et marquée par un acide aminé radioactif (^{35}S -methionine) pour suivre sa fixation sur la protéine de fusion GST-III-IV.

Figure 3 : Représentation schématique démontrant les interactions intramoléculaires entre les différentes boucles du canal $\text{Ca}_v2.1$. La flèche verte illustre l'interaction entre la boucle I-II et la boucle III-IV de ce canal. PM = membrane plasmique.

Figure 4 : Démonstration de la perte de fixation de la boucle I-II du canal $\text{Ca}_v2.1$ sur la protéine de fusion GST-III-IV suite à la mutation des acides aminés Arg 387 ou Glu 388. Ces deux acides aminés sont donc indispensables à la fixation de la boucle I-II sur la boucle III-IV en absence de la sous-unités β du canal calcium.

Figure 5 : L'expression de la boucle III-IV accélère la cinétique d'inactivation du canal $\text{Ca}_v2.1$. Cette accélération est similaire si la boucle III-IV exprimée est associée à la membrane plasmique (gauche, via un couplage en position amino-terminale avec la chaîne α

- 5 du récepteur CD8 humain) ou est libre dans le cytoplasme (droite, injection d'un peptide représentant les 40 acides aminés carboxy-terminal de la boucle III-IV).

10 **III- Démonstration de l'importance de plusieurs acides aminés de la boucle I-II de la séquence $\text{Ca}_v2.1$ de lapin dans la rétention de ce canal au niveau du réticulum endoplasmique.**

Les résultats de mutagenèse de la boucle I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v2.1$ et de l'expression dans l'ovocyte de Xénope des mutants correspondants démontrent qu'un certain nombre d'acide aminés de la boucle I-II peuvent être choisies comme cible pour augmenter l'adressage membranaire des canaux calciques haut-seuils. Nous pouvons classer ces acides aminés en deux catégories : (i) les acides aminés dont la fonction est indépendante de la sous-unité β des canaux calciques et dont la mutation induit une augmentation d'expression des canaux calciques à la surface de la membrane, et (ii) les acides aminés dont la mutation seule ne contribue pas à une expression de surface facilitée du canal $\text{Ca}_v2.1$ lorsqu'il est exprimé seul, mais plutôt à une facilitation de l'action des sous-unités β . L'action desdites sous-unités β étant justement de faciliter l'expression des canaux calciques haut-seuils, l'expression à la surface cellulaire de l'ensemble du complexe $\text{Ca}_v2.1/\beta$ est également facilitée par la mutagenèse de ces résidus. L'importance des acides aminés β -indépendant est démontrée dans la figure 6, alors que celle des résidus β -dépendants est illustrée en figure 7. La figure 8 récapitule la position des acides aminés de la boucle I-II dont la mutation peut faciliter l'expression des canaux calciques

Figure 6 : Expression de sous-unités $\text{Ca}_v2.1$ mutés augmentant l'expression du canal (en absence de sous-unité β). Mesure en densité de courants à la surface de la membrane plasmique des ovocytes de Xénopes. Voir annexe A ci-après pour la méthodologie d'expression et d'enregistrement des courants électriques.

30 **Figure 7 :** Expression de sous-unités $\text{Ca}_v2.1$ mutés facilitant l'action de stimulation d'expression de la surface membranaire des canaux calciques par la sous-unité β . Voir annexe A pour la méthodologie d'expression et d'enregistrement des courants électriques.

Ci-après sont représentées les positions des acides aminés dont la mutation favorise l'expression à la surface de la membrane plasmique du canal $\text{Ca}_v2.1$. En gras, acides aminés β -indépendant, et souligné, les acides aminés β -dépendants.

5

SGEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAAEEVILAEDETDVEQRHP

| // |
383 395 396 398

10 FDGALRRATIKKSKTDLHPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSFFHKKERR

|
427 + 428 (double mutation)

MRFYIRRMVKTQ

15 On peut aussi identifier la position des acides aminés dont la mutation entraîne une diminution de l'expression à la surface des cellules. Cette information est donnée à titre d'exemple ci-après.

Position des acides aminés dont la mutation entraîne une diminution notable d'expression du canal Ca_v2.1 à la membrane (en présence et absence de sous-unité β).

20 SGEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAAEEVILAEDETDVEQRHP

|
387

FDGALRRATIKKSKTDLHPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSFFHKKERR

25 |
422 - 423

MRFYIRRMVKTQ

30 Afin d'étendre la validité de nos résultats, nous avons aligné la séquence de la boucle I-II du canal Ca_v2.1 de lapin à celle de la séquence I-II du canal Ca_v2.1 humain. Les positions des acides aminés essentiels à l'ensemble des fonctions citées sont indiquées en gras ci-après.

Alignement des séquences de Ca_v2.1 de lapin et humain. En gras, acide aminés essentiels. Souligné : les acides aminés différents entre les deux séquences.

35

5

Cav2.1

humain

SGEFAKERERVENRRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEVIL

Cav2.1

lapin

SGEFAKERERVENRRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEVIL

10

AEDETDGEQRHPFDGALRRTTIKKSKTDLLNPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAEDETDVEQRHPFDGALRRATIKKSKTDLLHPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKS

15

AKLENSTFFHKKERRMRFYIRRMVKTQ

AKLENSSFFHKKERRMRFYIRRMVKTQ

Annexe A

20

Expression du canal Ca_v2.1 dans l'ovocyte de Xénope, mesure électrophysiologique des courants calciques et analyse des propriétés d'inactivation du canal calcique.

Expression

25

Les ovocytes de Xénopes sont prélevés aux stades V et VI à partir d'ovaires de grenouille *Xenopus laevis* d'Afrique du sud et maintenus en solution saline classique (milieu de Barth). Les cellules sont traitées à la collagenase type IA (2 mg/ml) pendant deux heures et les membranes folliculaires sont éliminées manuellement. Les ovocytes sont maintenus en milieu DNOM (defined nutrient oocyte medium) durant 2 jours avant injection de cRNA codant pour le canal Cav2.1. L'injection de ce cRNA codant pour le canal sauvage ou muté est effectuée à une concentration de 0.3 µg/µl. Dans les cas de coinjection d'autres cRNA (exemple : CD8-III-IV, III-IV, etc...), ces cRNA sont injectés à une concentration de 0.1 µg/µl. Les injections de peptide III-IV sont effectuées à une concentration finale intracellulaire de 10 µM. Dans tous les cas de figure, le volume d'injection n'excède pas 50 nl par ovocyte. Suite aux injections de cRNA, les cellules sont conservées à 16°C en milieu DNOM pendant au minimum 4-5 jours avant de poursuivre avec les enregistrements électrophysiologiques.

35

5 *Mesures électrophysiologiques*

Nous avons appliqué la technique de voltage-clamp à deux électrodes pour les enregistrements de courants Ba^{2+} (le Ba^{2+} est plus perméable que le Ca^{2+} au travers des canaux calcium à haut-seuils et facilite nos analyses). Les enregistrements sont effectués avec un amplificateur GeneClamp de chez Axon Instruments (Foster City, CA). Le milieu
10 d'enregistrement extracellulaire contient (en mM): $Ba(OH)_2$ 40, NaOH 50, KCl 3, HEPES 5, acide niflumique 1, pH 7.4 avec l'acide méthane sulfonique. Les électrodes sont remplies avec (en mM) KCl 140, EGTA 10 et HEPES 10 (pH 7.2 avec du KOH) et ont des résistances électriques comprises entre 0.5 et 1 M Ω . Les enregistrements de courant électriques sont filtrés
15 « on-line » à 2 kHz, le courant de fuite est soustrait par un protocole P/6, et échantillonné à 5-10 kHz. Les données sont analysées avec le suite de logiciels pCLAMP version 6.03 (Axon Instruments).

Analyse des propriétés d'inactivation du canal $Ca_v2.1$

Afin d'établir des courbes d'inactivation en fonction du potentiel membranaire de
20 cellule, les ovocytes sont dépolarisés pendant au moins 30 secondes à une valeur de potentiel donnée (entre -100 et 10 mV ; potentiel de maintien), puis le courant calcique est déclenché par une dépolarisation cellulaire à +20 mV. Cette procédure est répétée plusieurs fois pour des valeurs de potentiel de maintien croissant (de 10 mV en 10 mV). L'amplitude maximale des courants Ba^{2+} ainsi obtenues pour chaque dépolarisation à +20 mV est comparée à l'amplitude
25 du courant maximal obtenu par une dépolarisation à partir du potentiel de -100 mV vers +20 mV (valeur référence correspondant à 0% d'inactivation des canaux). L'inactivation des canaux calciques est aussi déclenchée par une dépolarisation maintenue à +20 mV (à partir d'une valeur de maintien de -100 mV). Le décours cinétique décroissant du courant illustre le processus d'inactivation des canaux calciques qui est déclenché par la dépolarisation à +20
30 mV. Pour comparer les différences en cinétiques d'inactivation, nous avons choisi le temps nécessaire à la demi-inactivation des canaux calciques comme valeur de référence.

REVENDICATIONS

1. Utilisation :

- de fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques de mammifères, lesdits fragments correspondant à la boucle I-II et/ou à la boucle III-IV de ladite sous-unité $\alpha 1$, ou correspondant à une séquence peptidique dérivée de cette boucle I-II ou III-IV, notamment par substitution, et/ou délétion, et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ou correspondant à une partie peptidique de ladite boucle I-II, ou III-IV, ou d'une séquence dérivée de cette dernière, notamment à une partie peptidique d'au moins environ 5 acides aminés, ladite séquence dérivée et ladite partie de la boucle I-II ayant la propriété de ladite boucle I-II de se lier à la sous-unité β et à la boucle III-IV desdits canaux calciques, ladite séquence dérivée et ladite partie de la boucle III-IV ayant la propriété de ladite boucle III-IV de se lier à ladite boucle I-II,

- ou de séquences peptidiques mutées, dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés desdits fragments peptidiques susmentionnés de la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques dans la mesure où la ou les mutations en question affectent des acides aminés essentiels dans le cadre de l'expression des canaux calciques à la surface membranaire, et/ou de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés desdits fragments peptidiques susmentionnés de la boucle III-IV de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques, dans la mesure où la ou les mutations en question affectent des acides aminés essentiels dans le cadre de l'inactivation des canaux calciques,

- ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour les fragments peptidiques susmentionnés de la boucle I-II et/ou de la boucle III-IV de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques, ou codant pour les séquences peptidiques mutées susmentionnées,

pour la mise en œuvre de procédés de criblage :

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, à savoir du criblage de molécules β like susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies liées à une diminution anormale du nombre de canaux calciques telles que l'épilepsie, ou les dégénérescences neuronales,

- et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, à savoir du criblage de molécules β like susceptibles d'être utilisées dans le cadre

5 du traitement de pathologies contre lesquelles une augmentation du nombre de canaux calciques à la membrane plasmique aurait un effet bénéfique, telle que la maladie de Parkinson, les diabètes insulino-dépendants, ou le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton,,

10 - et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies liées à une augmentation anormale du nombre de canaux calciques telle que l'hypertrophie cardiaque,

15 - et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une diminution du nombre de canaux calciques à la membrane plasmique aurait un effet bénéfique, telle que l'épilepsie, l'hypertension, l'angine de poitrine, ou l'ischémie cérébrale,

20 - et/ou de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, à savoir du criblage de molécules susceptibles d'être utilisées dans le cadre de la stimulation ou de l'inhibition de la communication neuronale, notamment dans le cadre du traitement de pathologies contre lesquelles une régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs aurait un effet bénéfique, telles que les épilepsies, les ataxies, les migraines, la maladie de Parkinson, ou les ischémies cérébrales.

25

2. Utilisation selon la revendication 1 de fragments peptidiques correspondant à la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$, ou à une séquence peptidique dérivée, ou à une partie de cette boucle I-II, ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour lesdits fragments, tels que définis dans la revendication 1, pour la mise en œuvre de procédés de
30 criblage :

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies dans la revendication 1,

35 - et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1.

5 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2 :

- de la séquence peptidique correspondant à la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

SGEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAAEEVILAEDETDVEQRHPF
10 DGALRRATIKKSKTDLLHPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSFFHKKERR
MRFYIRRMVKTQ

- ou de la séquence peptidique correspondant à la boucle I-II de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 4 suivante :

15 SGEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAAEEVILAEDETDGEQRHPF
DGALRRRTTIKKSKTDLLNPEEAEDQLADIASVGSPFARASIKSAKLENSTFFHKKERR
MRFYIRRMVKTQ

- ou de fragments des séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 susmentionnées, comprenant au moins la séquence SEQ ID NO : 15 suivante : QQIERELNGYMEWISKAEE,

20 - ou de cellules transformées avec les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 3 suivantes codant respectivement pour les séquences peptidiques SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 susmentionnées, ou transformées avec la séquence nucléotidique comprise dans les séquences SEQ ID NO : 1 et 3 et codant pour la séquence SEQ ID NO : 15 susmentionnée :

25

SEQ ID N°1 :

tcaggggagtttgccaaagaaaggagcgggtggagaaccggcgcgattcctgaagctgcggcggcagcagcagattgaacgc
gagctcaacgggtacatggagtggatctcaaaagcagaagaggtgatcctcgagaggacgagaccgacgtggagcagagacatc
cctttgatggagctctgcggagagccactatcaagaagagcaagacggacctgctccaccagaggaggcggaggatcagctggcc
30 gacatgcctccgtgggtctccctttgcccagccagcattaaaagtccaagctggagaactcgagttttccacaaaaagagag
gagaatgcgtttctacatccgtcgcatggtcaaaactcag

SEQ ID N°3

tcagggg agtttgccaa agaaaggga cgggtggaga accggcgggc tttctgaag ctgaggcggc aacaacagat
35 tgaacgtgag ctcaatgggt acatggaatg gatctcaaaa gcagaagagg tgatcctcgc cgaggatgaa actgacgggg
agcagaggca tccctttgat ggagctctgc ggagaaccac cataaagaaa agcaagacag atttgctcaa cccogaagag
gctgaggatc agctggctga tatagcctct gtgggttctc ccttcgccc agccagcatt aaaagtgcc agctggagaa
ctcgacctt tttcacaaaa aggagaggag gatgcgtttc tacatccgcc gcatggtcaa aactcag

5

4. Utilisation de fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ selon l'une des revendications 1 à 3, lesdits fragments étant fusionnés du côté N-terminal à une séquence peptidique transmembranaire, à savoir une séquence peptidique ayant pour effet de maintenir lesdits fragments peptidiques dans la membrane cellulaire, telle que la séquence transmembranaire de la chaîne α du récepteur CD8 humain contenue dans la séquence SEQ ID NO : 5 suivante :

LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR

ou de cellules transformées avec une séquence nucléotidique recombinante exogène codant pour une séquence peptidique transmembranaire telle que définie ci-dessus, cette dernière séquence étant située en amont de la séquence codant pour le fragment peptidique susmentionné de la sous-unité $\alpha 1$.

5. Procédé de criblage de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies dans la revendication 1, et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définis dans l'une des revendications 2 à 4, avec des cellules exprimant des canaux calciques pendant un temps suffisant pour que le nombre de canaux calciques diminue de manière significative à la surface desdites cellules, puis avec des molécules à tester,

- ou mise en présence de cellules transformées à l'aide de séquences nucléotidiques codant pour des fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définis dans l'une des revendications 2 à 4, réduisant ainsi le nombre de canaux calciques à la surface desdites cellules, avec des molécules à tester,

- détection d'une éventuelle augmentation du nombre de canaux calciques à la surface des cellules transformées témoignant de l'effet des molécules testées d'augmentation du nombre de canaux calciques à la surface des membranes cellulaire.

6. Utilisation selon la revendication 1 de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés

- 5 essentiels dans le cadre de l'expression des canaux calciques à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet d'augmenter ou de diminuer l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage :
- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies dans la
10 revendication 1,
 - et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1,
 - et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, telles que définies dans la
15 revendication 1,
 - et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1.

20 7. Utilisation selon la revendication 6 de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'augmenter l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions 383, 395, 396, 398, 427, et 428 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4,
25 dans laquelle l'un au moins de Q en position 24, W en position 36, I en position 37, K en position 39, K en position 68, et K en position 69, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine.

30 8. Utilisation selon la revendication 6 de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet de diminuer l'expression à la surface de la membrane plasmique des canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés aux positions 387, 422, et 423 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un
35 au moins de R en position 28, R en position 63, et R en position 64, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine.

5 **9. Procédé de criblage :**

- de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement diminué, telles que définies dans la revendication 1,

10 - et/ou de molécules augmentant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1,

- et/ou de molécules restaurant le nombre de canaux calciques à la normale dans les membranes cellulaires où ce nombre a anormalement augmenté, telles que définies dans la revendication 1,

15 - et/ou de molécules réduisant le nombre de canaux calciques dans les membranes cellulaires, telles que définies dans la revendication 1,

caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20 - mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définies dans la revendication 1, 6 ou 7, avec des molécules à tester déjà sélectionnées pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles I-II,

- sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles I-II et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées,

25 - le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur l'augmentation ou la diminution du nombre de canaux calciques à la surface desdites cellules.

30 **10. Utilisation selon la revendication 1 de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'activité des canaux calciques à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet de moduler l'activité des canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1.**

11. Utilisation selon la revendication 10 de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences

5 peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins un des acides aminés situés aux positions 387 et 388 de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ou humaines, à savoir des séquences peptidiques correspondant à la séquence SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 4, dans laquelle l'un au moins de R en position 28, et E en position 29, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment R28 est substitué par une alanine ou par E et E29 est substitué par une alanine.

12. Procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 15 - mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle I-II de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définies dans la revendication 10 ou 11, avec des molécules à tester déjà sélectionnées pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles I-II,
- sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles I-II et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées,
- 20 - le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur la régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs desdites cellules.

25

13. Utilisation selon la revendication 1 de fragments peptidiques correspondant à la boucle III-IV de la sous-unité $\alpha 1$, ou à une séquence peptidique dérivée, ou à une partie de cette boucle III-IV, ou de cellules transformées par des séquences nucléotidiques codant pour lesdits fragments, tels que définis dans la revendication 1, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1.

14. Utilisation selon la revendication 1 ou 13 :

- 35 - de la séquence peptidique correspondant à la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines ou de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7 suivante :

ITFQEQGDKMMEEYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNKQSFQYRMWQFVVSP

- 5 - ou des cellules transformées avec la séquence nucléotidique codant pour la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales humaines, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID NO : 6 suivante :

10 at caccttcag gagcaagggg acaagatgat ggaggaatac agcctggaga aaaatgagag ggcctgcatt gatttcgcca
tcagcgccaa gccgctgacc cgacacatgc cgcagaacaa gcagagcttc cagtaccgca tgtggcagtt cgtggtgtct
ccg

- 15 - ou de cellules transformées avec la séquence nucléotidique codant pour la boucle III-IV de la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de cellules neuronales de lapin, ladite séquence correspondant à la séquence SEQ ID N°8 suivante :

20 atcacct tccaggagca gggcgacaag atgatggagg agtacagctt ggagaaaaac gagagggcct gcatcgactt
cgccatcagt gccaaagccgc tgaccaggca catgccccag aacaagcaga gcttcagta ccgcatgtgg cagttcgtgg
tgtccccg

- 25 15. Utilisation de fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ selon l'une des revendications 1, 13 et 14, lesdits fragments étant fusionnés du côté N-terminal à une séquence peptidique transmembranaire, à savoir une séquence peptidique ayant pour effet de maintenir lesdits fragments peptidiques dans la membrane cellulaire, telle que la séquence transmembranaire de la chaîne α du récepteur CD8 humain contenue dans la séquence SEQ ID NO : 5 suivante :

LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR

- 30 ou de cellules transformées avec une séquence nucléotidique recombinante exogène codant pour une séquence peptidique transmembranaire telle que définie ci-dessus, cette dernière séquence étant située en amont de la séquence codant pour le fragment peptidique susmentionné de la sous-unité $\alpha 1$.

- 35 16. Procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définis dans l'une des revendications 13 à 15, avec des cellules exprimant des canaux calciques pendant un temps suffisant pour que l'état d'inactivation des canaux soit modifié, puis avec des molécules à tester,

- 5 - ou mise en présence de cellules transformées à l'aide de séquences nucléotidiques codant pour des fragments peptidiques de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définis dans l'une des revendications 13 à 15, avec des molécules à tester,
- détection de l'effet des molécules testées sur l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs.

10

17. Utilisation selon la revendication 1 de séquences peptidiques dérivées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés des fragments peptidiques de la boucle III-IV de la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques, la ou les mutations en question affectant des acides aminés essentiels dans le cadre de l'inactivation des canaux calciques à la surface membranaire, dans la mesure où leur mutation a pour effet d'activer ou d'inactiver les canaux calciques, pour la mise en œuvre de procédés de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1.

20

18. Utilisation selon la revendication 17 de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés de la séquence peptidique correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7.

25

19. Utilisation selon la revendication 18 de séquences peptidiques comportant une ou plusieurs mutations ayant pour effet d'inactiver les canaux calciques, lesdites séquences peptidiques étant dérivées par mutation d'un au moins des acides aminés situés entre les positions 8 et 19 de la séquence peptidique correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7, à savoir d'un au moins des acides aminés compris dans la séquence : DKMMEEYSLEKN.

30

20. Procédé de criblage de molécules régulant l'état d'inactivation des canaux calciques neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs, telles que définies dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mise en présence de séquences peptidiques dérivées de la boucle III-IV de la sous-unité $\alpha 1$ tels que définies dans l'une des revendications 17 à 19, avec des molécules à tester déjà sélectionnées pour leur capacité à se lier spécifiquement aux séquences peptidiques non mutées correspondant auxdites boucles III-IV,

35

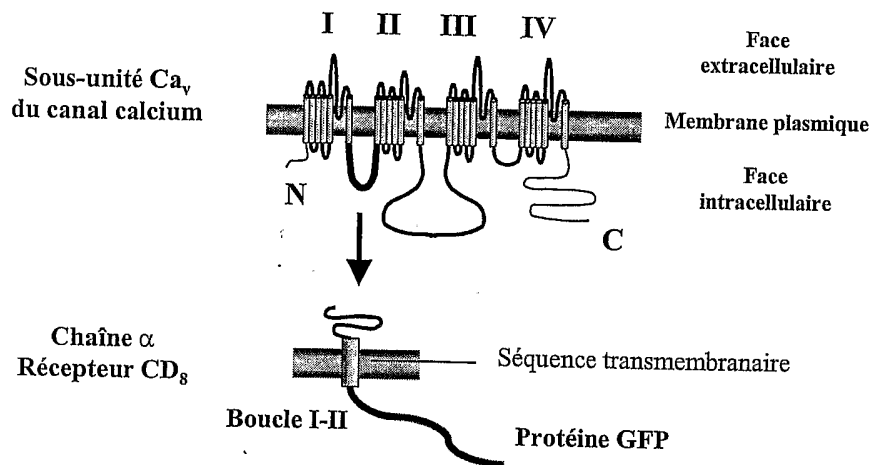
- 5 - sélection des molécules susmentionnées se liant spécifiquement aux boucles III-IV et ne se liant pas aux séquences peptidiques dérivées susmentionnées,
- le cas échéant, mise en présence des molécules sélectionnées à l'étape précédente avec des cellules exprimant des canaux calciques, et observation de l'éventuel effet des molécules sélectionnées sur la régulation de l'état d'inactivation des canaux calciques
- 10 neuronaux impliqués dans la libération des neurotransmetteurs desdites cellules.

21. Séquences peptidiques choisies parmi :

- les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de Q en position 24, W en position 36, I en position 37, K en position 39, K en position 68, et K en
- 15 position 69, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine,
- les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de R en position 28, R en position 63, et R en position 64, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment par une alanine,
- les séquences SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4 dans lesquelles l'un au moins de R
- 20 en position 28, et E en position 29, est substitué par un acide aminé naturel ou non, notamment R28 est substitué par une alanine ou par E, et E29 est substitué par une alanine,
- la séquence SEQ ID NO : 15 suivante : QQIERELNGYMEWISKAE.

FIGURE 1

A



B

FIGURE 2

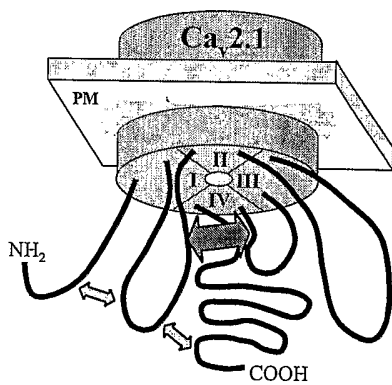
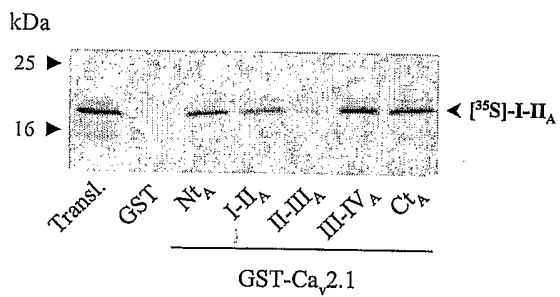


FIGURE 3

FIGURE 4

Autoradiogram

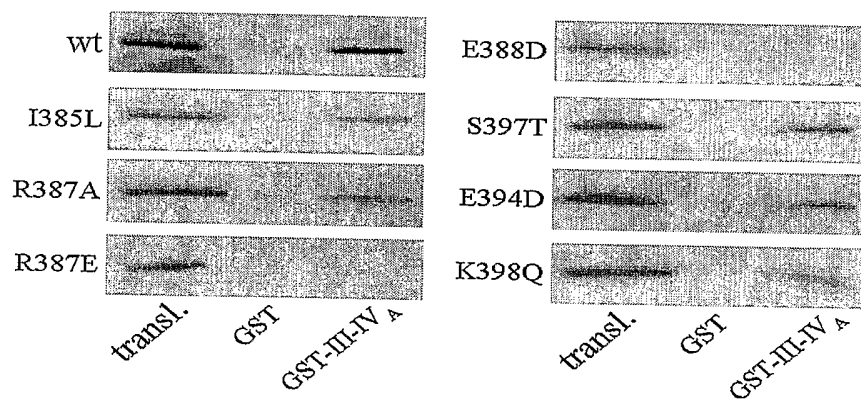


FIGURE 5 :

Boucle III-IV associée à la membrane

Boucle III-IV en forme libre

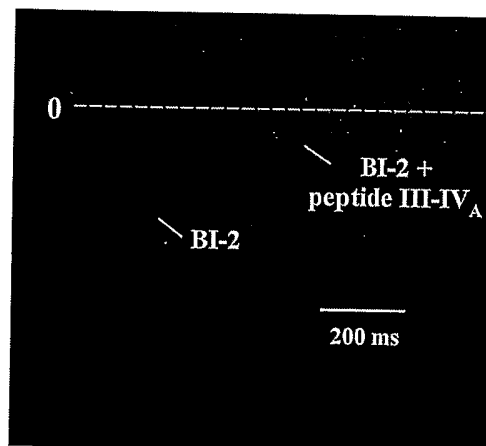
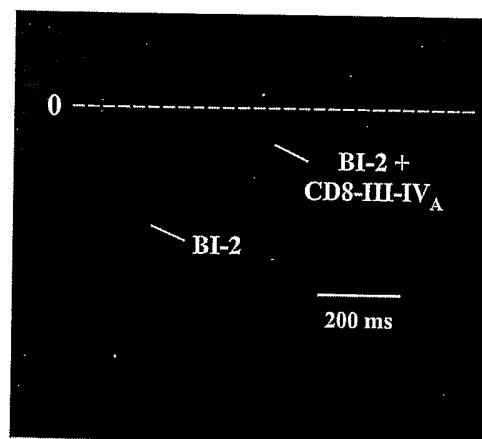


FIGURE 6 :

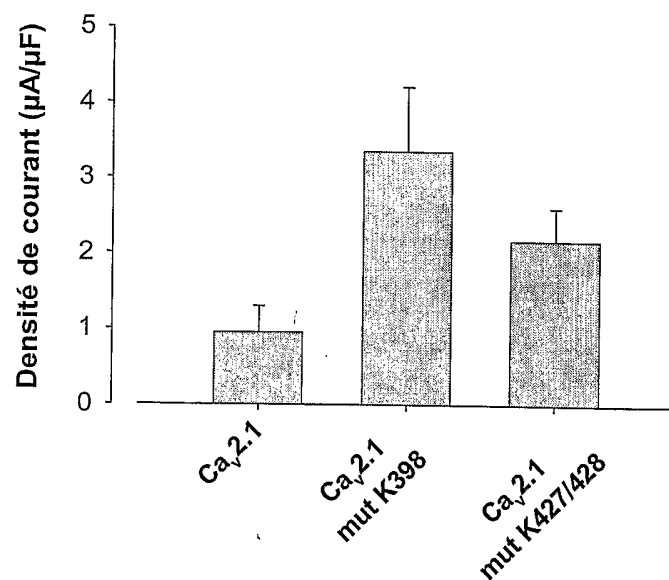
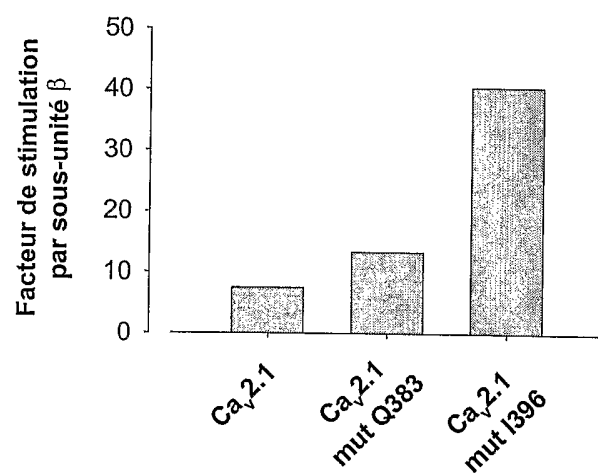


FIGURE 7 :



SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> UTILISATION DE FRAGMENTS PEPTIDIQUES DE LA SOUS-UNITE α -1 DES CANAUX CALCIQUES, COMPORTANT LE CAS ECHEANT DES MUTATIONS, POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE

<130> IFB 01AE CNR CANA

<140> FR0110117

<141> 2001-07-27

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 384

<212> DNA

<213> lapin

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(384)

<223>

<400> 1

tca ggg gag ttt gcc aaa gaa agg gag cgg gtg gag aac cgg cgc gca	48
Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala	
1 5 10 15	
ttc ctg aag ctg cgg cgg cag cag cag att gaa cgc gag ctc aac ggg	96
Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly	
20 25 30	
tac atg gag tgg atc tca aaa gca gaa gag gtg atc ctc gca gag gac	144
Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp	
35 40 45	
gag acc gac gtg gag cag aga cat ccc ttt gat gga gct ctg cgg aga	192
Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg	
50 55 60	
gcc act atc aag aag agc aag acg gac ctg ctc cac cca gag gag gcg	240
Ala Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala	
65 70 75 80	
gag gat cag ctg gcc gac atc gcc tcc gtg ggg tct ccc ttt gcc cga	288
Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg	
85 90 95	

gcc agc att aaa agt gcc aag ctg gag aac tcg agt ttt ttc cac aaa 336
 Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys
 100 105 110

aaa gag agg aga atg cgt ttc tac atc cgt cgc atg gtc aaa act cag 384
 Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln
 115 120 125

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

<213> lapin

<400> 2

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala
 1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly
 20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp
 35 40 45

Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg
 50 55 60

Ala Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg
 85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys
 100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln
 115 120 125

<210> 3

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (384)

<223>

<400> 3

tca ggg gag ttt gcc aaa gaa agg gaa cgg gtg gag aac cgg cgg gct	48
Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala	
1 5 10 15	
ttt ctg aag ctg agg cgg caa caa cag att gaa cgt gag ctc aat ggg	96
Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly	
20 25 30	
tac atg gaa tgg atc tca aaa gca gaa gag gtg atc ctc gcc gag gat	144
Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp	
35 40 45	
gaa act gac ggg gag cag agg cat ccc ttt gat gga gct ctg cgg aga	192
Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg	
50 55 60	
acc acc ata aag aaa agc aag aca gat ttg ctc aac ccc gaa gag gct	240
Thr Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala	
65 70 75 80	
gag gat cag ctg gct gat ata gcc tct gtg ggt tct ccc ttc gcc cga	288
Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg	
85 90 95	
gcc agc att aaa agt gcc aag ctg gag aac tcg acc ttt ttt cac aaa	336
Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Phe Phe His Lys	
100 105 110	
aag gag agg agg atg cgt ttc tac atc cgc cgc atg gtc aaa act cag	384
Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln	
115 120 125	

<210> 4

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala
1 5 10 15
Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly
20 25 30
Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp
35 40 45

Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg
50 55 60

Thr Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Phe Phe His Lys
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln
115 120 125

<210> 5

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
1 5 10 15

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
20 25 30

Arg

<210> 6

<211> 165

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(165)

<223>

<400> 6

atc acc ttc cag gag caa ggg gac aag atg atg gag gaa tac agc ctg	48
Ile Thr Phe Gln Glu Gln Gly Asp Lys Met Met Glu Glu Tyr Ser Leu	
1 5 10 15	
 gag aaa aat gag agg gcc tgc att gat ttc gcc atc agc gcc aag ccg	96
Glu Lys Asn Glu Arg Ala Cys Ile Asp Phe Ala Ile Ser Ala Lys Pro	
20 25 30	
 ctg acc cga cac atg ccg cag aac aag cag agc ttc cag tac cgc atg	144
Leu Thr Arg His Met Pro Gln Asn Lys Gln Ser Phe Gln Tyr Arg Met	
35 40 45	
 tgg cag ttc gtg gtg tct ccg	165
Trp Gln Phe Val Val Ser Pro	
50 55	

<210> 7

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Thr Phe Gln Glu Gln Gly Asp Lys Met Met Glu Glu Tyr Ser Leu
1 5 10 15
 Glu Lys Asn Glu Arg Ala Cys Ile Asp Phe Ala Ile Ser Ala Lys Pro
20 25 30
 Leu Thr Arg His Met Pro Gln Asn Lys Gln Ser Phe Gln Tyr Arg Met
35 40 45
 Trp Gln Phe Val Val Ser Pro
50 55

<210> 8

<211> 165

<212> DNA

<213> lapin

<400> 8

atcaccttcc aggagcaggg cgacaagatg atggaggagt acagcttgga gaaaaacgag	60
agggcctgca tcgacttcgc catcagtgcc aagccgctga ccaggcacat gccccagaac	120
aagcagagct tccagtaccg catgtggcag ttcgtggtgt ccccg	165

<210> 9
<211> 128
<212> PRT
<213> lapin
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> X représente Q, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36)..(36)
<223> X représente W, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> X représente I, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (39)..(39)
<223> X représente K, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (68)..(69)
<223> X représente K, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non
<400> 9

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Xaa Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly
20 25 30

Tyr Met Glu Xaa Xaa Ser Xaa Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp
35 40 45

Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg
50 55 60

Ala Thr Ile Xaa Xaa Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln
115 120 125

<210> 10

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> X représente Q, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> X représente W, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> X représente I, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)

<223> X représente K, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(69)

<223> X représente K, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 10

Ser	Gly	Glu	Phe	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Val	Glu	Asn	Arg	Arg	Ala
1				5				10					15		

Phe	Leu	Lys	Leu	Arg	Arg	Gln	Xaa	Gln	Ile	Glu	Arg	Glu	Leu	Asn	Gly
			20					25					30		

Tyr	Met	Glu	Xaa	Xaa	Ser	Xaa	Ala	Glu	Glu	Val	Ile	Leu	Ala	Glu	Asp
		35					40					45			

Glu	Thr	Asp	Gly	Glu	Gln	Arg	His	Pro	Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Arg	Arg
	50					55					60				

Thr	Thr	Ile	Xaa	Xaa	Ser	Lys	Thr	Asp	Leu	Leu	Asn	Pro	Glu	Glu	Ala
65						70				75					80

Glu	Asp	Gln	Leu	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser	Val	Gly	Ser	Pro	Phe	Ala	Arg
				85					90					95	

Ala	Ser	Ile	Lys	Ser	Ala	Lys	Leu	Glu	Asn	Ser	Thr	Phe	Phe	His	Lys
			100					105					110		

Lys	Glu	Arg	Arg	Met	Arg	Phe	Tyr	Ile	Arg	Arg	Met	Val	Lys	Thr	Gln
		115						120				125			

<210> 11

<211> 128

<212> PRT

<213> lapin

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(64)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 11

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Xaa Glu Leu Asn Gly
20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp
35 40 45

Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Xaa Xaa
50 55 60

Ala Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln
115 120 125

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(64)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 12

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Xaa Glu Leu Asn Gly
20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp
35 40 45

Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Xaa Xaa
50 55 60

Thr Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Phe Phe His Lys
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln
115 120 125

<210> 13

<211> 128

<212> PRT

<213> lapin

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> X représente E, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 13

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala
 1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Xaa Xaa Leu Asn Gly
 20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp
 35 40 45

Glu Thr Asp Val Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg
 50 55 60

Ala Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu His Pro Glu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg
 85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Ser Phe Phe His Lys
 100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln
 115 120 125

<210> 14

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> X représente R, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> X représente E, ou une alanine, ou autre acide aminé naturel ou non

<400> 14

Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala
 1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Xaa Xaa Leu Asn Gly
20 25 30

Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp
35 40 45

Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg
50 55 60

Thr Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg
85 90 95

Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Phe Phe His Lys
100 105 110

Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile Arg Arg Met Val Lys Thr Gln
115 120 125

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> lapin

<400> 15

Gln Gln Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys
1 5 10 15

Ala Glu