



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2010/01/15
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2010/07/22
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2017/05/02
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2011/07/14
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2010/000037
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2010/081971
(30) Priorité/Priority: 2009/01/15 (FR09/00174)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07K 14/435* (2006.01),
A61K 38/17 (2006.01), *A61P 25/04* (2006.01),
C12N 15/12 (2006.01), *C12N 15/63* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
BOURINET, EMMANUEL, FR;
ESCOUBAS, PIERRE, FR;
MARGER, FABRICE, FR;
NARGEOT, JOEL, FR;
LAZDUNSKI, MICHEL, FR

(73) Propriétaires/Owners:
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.), FR;
UNIVERSITE DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS, FR

(74) Agent: NORTON ROSE FULBRIGHT CANADA

(54) Titre : IDENTIFICATION DE NOUVELLES TOXINES ANTAGONISTES DE CANAUX CALCIQUES TYPE-T A VISEE ANALGESIQUE

(54) Title: IDENTIFICATION OF NOVEL ANTAGONIST TOXINS OF T-TYPE CALCIUM CHANNEL FOR ANALGESIC PURPOSES

(57) Abrégé/Abstract:

L'invention se rapporte un peptide de séquence YCQKFLWTCDSEPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) OU un dérivé de celui-ci et aux acides nucléiques codant pour le peptide de séquence SEQ ID NO 1. La présente invention se rapporte également à l'utilisation dudit peptide comme antagoniste et/ou agoniste inverse de canaux calciques de type T. La présente invention se rapporte également à l'utilisation du peptide pour la fabrication d'un médicament, notamment d'un analgésique.



(74) **Agent(suite/continued):** LLP/S.E.N.C.R.L., S.R.L.

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/081971 A1

(43) Date de la publication internationale
22 juillet 2010 (22.07.2010)

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 14/435 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 25/04* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/000037

(22) Date de dépôt international :
15 janvier 2010 (15.01.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
09/00174 15 janvier 2009 (15.01.2009) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). **UNIVERSITÉ DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS** [FR/FR]; 28, avenue Valrose, F-06108 Nice Cedex 2 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BOURINET, Emmanuel [FR/FR]; 6, allée Albert Dubout, F-34270 Saint Mathieu de Trévières (FR). **ESCOUBAS, Pierre** [FR/FR]; Val d'Azur, 1, allée des Cypres, F-06560 Valbonne (FR). **MARGER, Fabrice** [FR/FR]; Chez Régine Seneschal, 1bis, rue de la Lavande, F-34430 Saint-Jean de Vedas (FR). **NARGEOT, Joël** [FR/FR]; 9, rue de Nazareth G1, F-34090 Montpellier (FR). **LAZDUNSKI, Michel** [FR/FR]; 21, avenue Colombo, F-06000 Nice (FR).

(74) Mandataire : **NOVAGRAAF TECHNOLOGIES**; 122, rue Edouard Vaillant, F-92593 Levallois-Perret Cedex (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : IDENTIFICATION OF NOVEL ANTAGONIST TOXINS OF T-TYPE CALCIUM CHANNEL FOR ANALGESIC PURPOSES

(54) Titre : IDENTIFICATION DE NOUVELLES TOXINES ANTAGONISTES DE CANAUX CALCIQUES TYPE-T A VISEE ANALGESIQUE

(57) Abstract : The invention relates to a peptide having the following sequence YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) or a derivative thereof, and to nucleic acids coding for the peptide having the sequence (SEQ ID NO 1). The invention also relates to the use of this peptide as an antagonist and/or reverse agonist of T-type calcium channels. The invention further relates to a use of the peptide for preparing a drug, in particular an analgesic one.

(57) Abrégé : L'invention se rapporte un peptide de séquence YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) OU un dérivé de celui-ci et aux acides nucléiques codant pour le peptide de séquence SEQ ID NO 1. La présente invention se rapporte également à l'utilisation dudit peptide comme antagoniste et/ou agoniste inverse de canaux calciques de type T. La présente invention se rapporte également à l'utilisation du peptide pour la fabrication d'un médicament, notamment d'un analgésique.



WO 2010/081971 A1

IDENTIFICATION DE NOUVELLES TOXINES ANTAGONISTES DE CANAUX CALCIQUES TYPE-T A VISEE ANALGESIQUE

Domaine technique de l'invention

5 [0001] La présente invention se rapporte à une toxine antagoniste de canaux calcique de type T (« T type channels »). En particulier, elle se rapporte à un peptide composant un peptide, aux acides nucléiques codant pour ce peptide, et à l'utilisation dudit peptide comme antagoniste et/ou agoniste inverse des canaux calciques de type T. La présente invention se
10 rapporte également à l'utilisation de ce peptide pour la fabrication d'un médicament.

[0002] Elle trouve notamment une application dans le traitement de la douleur, dans les pathologies cardiovasculaires, dans le traitement de la dysfonction érectile et potentiellement dans le traitement des cancers.

15 [0003] Dans la description ci-dessous, les références indiquées « Réf. » renvoient à la liste des références présentées après les exemples.

Etat de la technique

20 [0004] La prise en compte et le traitement de la douleur sont essentiels pour la qualité de vie. La douleur touche un nombre important de personnes. En Europe, on estime que 60 millions de personnes sont concernées chaque année par la douleur, ce qui représente un coût annuel de 1 milliard de dollars en médicaments pour son traitement. Les dépenses
25 effectuées annuellement en médicaments analgésiques peuvent être évaluées à environ 25 milliards de dollars et devraient atteindre 42 milliards en 2010. La douleur se divise en deux catégories : la douleur aiguë et la douleur chronique. La douleur aiguë correspond à une douleur rapide et brève, limitée dans le temps, à l'opposé de la douleur chronique
30 qui est une douleur persistante et qui peut être liée, par exemple à une hyperalgésie.

[0005] De nombreuses études concernant l'identification des mécanismes permettant la transmission de la douleur ont été effectuées. La transmission du signal douleur par le système nerveux fait intervenir des récepteurs neuronaux qui transforment le stimulus douloureux en
5 signal électrique. Celui-ci sera alors transmis au système nerveux central par les nerfs, en faisant intervenir des récepteurs moléculaires spécifiques.

[0006] Parmi les divers neurones sensoriels, on peut citer les neurones nocicepteurs qui réagissent spécifiquement aux stimuli douloureux.

[0007] En raison de leur spécificité, les neurones nocicepteurs
10 possèdent un répertoire unique de canaux ioniques qui sont des protéines responsables de l'excitabilité cellulaire et qui représentent une classe majeure de cibles de médicaments. Ainsi les canaux ioniques spécifiquement exprimés dans les neurones nocicepteurs représentent autant de cibles pour la découverte de nouveaux analgésiques.

[0008] Les molécules inhibant la douleur, ou analgésiques, sont
15 connues depuis très longtemps. On peut citer par exemple la classe des opiacés qui agissent sur la signalisation du signal douloureux et stimulent les voies nerveuses inhibitrices de la douleur. D'autres molécules sont utilisées pour traiter les douleurs chroniques. Ce sont par exemple des
20 molécules agissant sur les récepteurs GABA comme le badofène, le diazepam, le tizanidine et le dartrolène.

[0009] Les molécules analgésiques utilisées actuellement présentent plusieurs inconvénients. Il est bien connu que les dérivés des opioïdes peuvent provoquer des phénomènes hallucinatoires et des dépressions
25 cardio-respiratoires. Ils sont également source de dépendances, comme par exemple la dépendance à la morphine, la méthadone etc. Enfin le traitement par les opiacés est associé à des effets indésirables comme une constipation sévère.

[0010] Il existe également des cas d'accoutumance à ces
30 médicaments, c'est à dire que la dose nécessaire pour obtenir un effet constant doit être augmentée. Cette accoutumance croît dans le temps et

entraîne donc la nécessité d'augmenter les doses et peut entraîner l'inefficacité du médicament. En effet, la quantité nécessaire peut devenir supérieure à la dose toxique dudit médicament.

5 **[0011]** Par exemple, dans le cas de douleurs neuropathiques qui peuvent intervenir dans des cas de diabète, de cancer, de traitements chimiothérapiques, de douleurs inflammatoires chroniques, de cas de syndrome du colon irritable etc., le traitement de la douleur par des analgésiques et antalgiques connus induit fréquemment un phénomène d'accoutumance et donc des problèmes de traitement de ces douleurs.

10 **[0012]** Il existe donc un réel besoin de trouver de nouvelles molécules analgésiques ou antalgiques palliant ces défauts, inconvénients et obstacles de l'art antérieur afin de réduire les coûts et d'améliorer le traitement de la douleur et le confort des patients.

15 **Exposé de l'invention**

[0013] Les inventeurs ont montré par des expériences d'inhibition de l'expression du gène *Cacna1h* codant pour le canal calcique de type T $\text{Ca}_v3.2$ présent dans les nocicepteurs que ledit canal est impliqué dans la perception de la douleur.

20 **[0014]** Les canaux $\text{Ca}_v3.2$ font partie de la famille des canaux calciques à « bas seuils » ou « type-T » et sont exprimés dans les neurones nocicepteurs

[0015] En utilisant une approche de répression génique par injection intrathécale d'ADN antisens chez le rat comme décrit dans Bourinet, E., et
25 al., "Silencing of the $\text{Ca}_v3.2$ T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception". *Embo J*, 2005. 24(2): p. 315-24 (**Réf 1**), les inventeurs ont démontré que la déplétion des canaux calciques $\text{Ca}_v3.2$ dans les neurones nocicepteurs d'animaux sains ou en condition de neuropathie entraîne une analgésie spectaculaire. En
30 conséquence, les canaux calcium de type T représentent une cible

potentielle pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques du traitement de la douleur.

[0016] Par ailleurs, il a été démontré que les canaux calciques $Ca_v3.2$ sont impliqués dans la prolifération cellulaire (Taylor, J.T., Zeng, X.B., Pottle, J.E., Lee, K., Wang, A.R., Yi, S.G., Scruggs, J.A., Sikka, S.S. and Li, M. (2008) Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World J Gastroenterol*, 14, 4984-4991 (**Ref 8**)) et dans la régulation de la tension sanguine (Chen, C.C., Lamping, K.G., Nuno, D.W., Barresi, R., Prouty, S.J., Lavoie, J.L., Cribbs, L.L., England, S.K., Sigmund, C.D., Weiss, R.M., Williamson, R.A., Hill, J.A. and Campbell, K.P. (2003) Abnormal coronary function in mice deficient in $\alpha1H$ T-type Ca^{2+} channels. *Science*, **302**, 1416-1418. (**Ref 9**)). Les canaux calcium de type T représentent une cible potentielle pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques du traitement de l'hypertension et des cancers, par exemple les cancers liés à une prolifération anarchique des cellules cancéreuses.

[0017] Il peut s'agir de cancers de divers organes par exemple:

- le cancer de la prostate (voir Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoï-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P. (2008) $Ca_v3.2$ T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 283(15):10162-73 (**Ref 16**),
- gliome (voir Panner A, Cribbs LL, Zainelli GM, Oritano TC, Singh S, Wurster RD. (2005) Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium*, 37(2):105-19 (**Ref 11**)),
- le carcinome de l'oesophage (voir Lu F, Chen H, Zhou C, Liu S, Guo M, Chen P, Zhuang H, Xie D, Wu S. (2008) T-type Ca^{2+} channel

expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation Cell Calcium. 43(1):49-58 (Ref 12))

- le cancer du sein (voir_Taylor JT, Huang L, Pottle JE, Liu K, Yang Y, Zeng X, Keyser BM, Agrawal KC, Hansen JB, Li M (2008)

5 Selective blockade of T-type Ca^{2+} channels suppresses human breast cancer cell proliferation.. Cancer Lett, 18;267(1):116-24 (Ref 13).

[0018] En particulier une approche pharmacologique utilisant des antagonistes sélectifs du canal Cav3.2 de type T fait l'objet du présent brevet.

10 [0019] L'invention répond précisément à besoin de trouver de nouvelles molécules analgésiques ou antalgiques en fournissant une nouvelle molécule capable notamment d'inhiber un signal douloureux, plus particulièrement une molécule capable d'inhiber les récepteurs responsables de ce signal. Cette molécule est un peptide de séquence:
15 YCQKFLWTCDSEPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) ou un dérivé de celle-ci.

[0020] Par « dérivé », on entend Ces « fragments » ou « dérivés » sont tels qu'ils conservent les propriétés du peptide de la présente invention. Les dérivés ou fragment peuvent également être considérés comme étant
20 des analogues du peptide de la présente invention.

[0021] Par exemple, un dérivé peut être le peptide de séquence ID NO1 avec des modifications sur au moins un des acides aminés. Les modifications sont par exemple les suivantes :

- remplacement d'au moins un acide aminé par un autre de la
25 même famille (aromatique, hydrophobe, basique, etc..) ;
- remplacement d'un acide aminé naturel (amino acide L) par le même acide aminé sous forme D ;
- remplacement d'une liaison peptidique entre deux acides aminés par une liaison pseudo-peptidique.
- 30 - modification indépendamment des extrémités N et C terminales du peptide.

[0022] Ces dérivés pourront comprendre des acides aminés naturels, des acides aminés modifiés, par exemple des sélénocystéines, des acides aminés non-naturels, et/ou des modifications de structure du peptide comme des cyclisations.

5 **[0023]** Les dérivés peuvent, par exemple, également comprendre des peptides modifiés en vue d'un marquage par des agents comme la biotine, des groupements fluorophores ou un isotope radioactif.

[0024] Les modifications des extrémités N ou C terminales peuvent être par exemple l'isoprénylation, la glypiation, la myristoylation, ou la
10 palmitoylation. L'extrémité C terminale peut être également modifiée par exemple par amidation conduisant à la formation d'une fonction amide à l'extrémité C terminale. Des exemples de modifications post-traductionnelles retrouvées dans des peptides sont présentées dans Han KK, Martinage A (1992) Post-translational chemical modification(s) of
15 proteins. Int J Biochem. 24(1):19-28. ; Walsh G, Jefferis R (2006) Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins *Nature Biotechnology* - 24, 1241 – 1252 (**Ref 17**). Ces modifications sont des modifications qui peuvent être rencontrées dans les toxines d'insectes (voir par exemple Escoubas P. (2006) Molecular diversification in spider
20 venoms: a web of combinatorial peptide libraries. Mol Divers. 10(4):545-54 (**Ref 18**)).

[0025] Dans la description qui suit, par peptide de séquence ID NO 1, on entend la séquence peptidique ID NO 1 ou une séquence dérivée de celle-ci.

25 **[0026]** L'invention répond également au besoin de trouver de nouvelles molécules antihypertenseurs en fournissant une nouvelle molécule capable notamment de diminuer la pression artérielle.

[0027] L'invention répond également au besoin de trouver de nouvelles molécules pour le traitement du cancer en fournissant une nouvelle
30 molécule capable notamment d'inhiber la prolifération cellulaire.

[0028] La nouvelle molécule de la présente invention est un peptide. Ce peptide a été isolé pour la première fois par les inventeurs à partir du venin d'une araignée du genre *Paraphysa* (Psp3) (Araneae :Theraphosidae).

5 **[0029]** Aussi, la présente invention se rapporte également à toute séquence en acides nucléiques codant pour le peptide de séquence YCQKFLWTCDSEPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1).

[0030] L'acide nucléique de la présente invention peut être toute séquence codant pour le peptide de séquence SEQ ID NO 1 compte tenu
10 de la dégénérescence du code génétique. Par exemple, il peut s'agir des acides nucléiques de séquence suivants :

5' TAT TGC CAG AAA TTT CTG TGG ACC TGC GAT AGC GAA CGC
CCG TGC TGC GAA GGC CTG GTG TGC CGC CTG TGG TGC AAA
ATT AAC 3' (SEQ ID NO 2)

15 5' TAY TGY CAR AAR TTY YTN TGG ACN TGY GAY WSN GAR MGN
CCN TGY TGY GAR GGN YTN GTN TGY MGN YTN TGG TGY AAR ATH
AAY 3' (SEQ ID NO 3)

dans lesquelles A est adénosine, C est cytidine, G est guanosine
T est thymidine et H est A ou C ou T, M est A ou C, N est A ou C ou G ou
20 T, R est A ou G, S est C ou G, W est A ou T et Y est C ou T:

[0031] L'invention se rapporte également à un système d'expression comprenant un plasmide et/ou un vecteur d'expression codant pour le peptide SEQ ID NO 1.

25 **[0032]** Dans la présente le système d'expression peut comprendre au moins une séquence d'acides nucléiques codant pour le peptide de séquence YCQKFLWTCDSEPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1).

[0033] Par « vecteur d'expression » dans la présente on entend une séquence d'acide nucléique dans laquelle il est possible d'insérer un ou
30 plusieurs fragments d'acides nucléiques que l'on souhaite exprimer dans un hôte. Le vecteur d'expression peut comporter les éléments permettant

l'expression de la séquence d'acide nucléique dans l'hôte. Par exemple, le vecteur peut comprendre une séquence promotrice, une séquence codant pour un peptide signal. Les vecteurs peuvent être tout vecteur connu de l'homme du métier.

5 **[0034]** Par exemple, les vecteurs d'expression peuvent être choisis dans le groupe comprenant les plasmides, les virus, les vecteurs bactériens, les chromosomes artificiels de levure (YAC) et les chromosomes artificiels de bactéries (BAC). Les vecteurs d'expression peuvent être également des vecteurs de surexpression de protéines
10 recombinantes, avec ou sans fusion à une protéine soluble comme, par exemple la GST, ou la thioredoxine ou toute autre protéine de fusion connue de l'homme du métier.

[0035] Par exemple, des vecteurs utilisables dans la présente invention peuvent être choisis notamment dans le groupe comprenant le plasmide
15 pT7-7 (SEQ ID NO 4, Figure 5), un plasmide de la série pGEX (SEQ ID NO 5, Figure 6), commercialisé par exemple par la société Pharmacia, ou un plasmide de la série pET32 (SEQ ID NO 6, Figure 7), commercialisé par exemple par la société Novagen.

[0036] L'invention se rapporte également à un hôte comprenant un
20 vecteur d'expression du peptide de séquence YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO1).

[0037] Dans la présente par « hôte », on entend toute cellule pouvant être transformée avec un vecteur d'expression ou modifiée génétiquement afin de produire le peptide de l'invention.

25 **[0038]** La transformation dudit « hôte » peut être réalisée, par exemple par électroporation ou par toute autre méthode connue de l'homme du métier. La séquence codant pour le peptide de séquence ID NO 1 utilisée lors de la transformation peut être libre ou incorporée dans un des vecteurs précités. Après introduction, ladite séquence en acides nucléiques peut
30 être incorporée dans le génome de l'hôte par recombinaison génétique, rester sous forme libre dans l'hôte et/ou rester dans le vecteur, ladite

séquence en acides nucléiques étant ensuite reconnue par les protéines et/ou enzymes de l'hôte et exprimée par celui-ci.

[0039] L'hôte peut être choisi dans le groupe comprenant les cellules eucaryotes ou procaryotes, par exemple des bactéries comme *Escherichia* Coli, des levures comme *Pichia pastoris*, des cellules d'insectes comme les cellules de *Drosophila* ou de *Spodoptera*, des cellules de mammifères et tout autre cellule connue de l'homme du métier qui permet la production de peptides et/ou de protéines à partir de vecteurs d'expression.

[0040] Les cellules procaryotes ou eucaryotes peuvent, de préférence, permettre la surexpression du peptide pour lequel code le vecteur. Ainsi, toute cellule hôte capable de d'exprimer un vecteur d'expression pour le peptide de l'invention est utilisable, par exemple *Escherichia coli*.

[0041] De manière préférée, les cellules eucaryotes ou procaryotes choisies sont celles qui permettent la surexpression du peptide de l'invention. Par exemple, il s'agit de cellules Sf9 de *Spodoptera*, de cellules S2 de *Drosophila*, de levures de type *Pichia pastoris* ou de bactéries *Escherichia coli*.

[0042] Les inventeurs montrent dans les exemples ci-dessous que le peptide de séquence SEQ ID NO 1 est un antagoniste et ou un antagoniste partiel des canaux de type T.

[0043] Aussi la présente invention se rapporte également à l'utilisation du peptide de séquence YCQKFLWTCDSEPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) comme antagoniste d'un canal calcique de type T.

[0044] Par « antagoniste », on entend un agent, par exemple une molécule chimique, une protéine, un peptide etc. qui interagit avec un site récepteur sur le canal et qui empêche ledit canal de fonctionner.

[0045] L'antagoniste peut également diminuer l'effet pharmacologique de l'agoniste, il s'agit alors d'un « antagoniste partiel ».

[0046] L'invention a également pour objet l'utilisation du peptide de séquence SEQ ID NO 1 comme agoniste inverse d'un canal de type T. Par « agoniste inverse », on entend un agent, par exemple une molécule

chimique, une protéine etc. qui interagit avec le même récepteur qu'un agoniste de ce récepteur mais produit l'effet pharmacologique opposé.

[0047] En d'autres termes, l'antagoniste, antagoniste partiel ou l'agoniste inverse peut être une substance se fixant sur les mêmes
5 récepteurs cellulaires au niveau de sites identiques ou différents d'une substance de référence, empêchant celle-ci de produire tout ou partie de ses effets habituels ou produisant l'effet inverse.

[0048] Dans la présente, par « canaux calcique de type T » on entend les canaux calciques à faible seuil d'activation, c'est à dire ayant un
10 potentiel d'activation compris entre -80 et -20 mV, de préférence entre -70 et -50 mV

[0049] Par exemple, des canaux calciques de type T peuvent être les canaux calciques générés par les sous unités $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$ et tous leurs variants d'épissage en association avec leurs sous unités
15 régulatrices ou non.

[0050] De manière préférée, le peptide est utilisé comme antagoniste et/ou agoniste inverse des canaux calciques de type T.

[0051] De manière encore plus préféré, le peptide est utilisé comme antagoniste et/ou agoniste inverse des canaux calciques $Ca_v3.2$ et/ou des
20 canaux calciques $Ca_v3.1$ et/ou $Ca_v3.3$.

[0052] L'invention a également pour objet l'utilisation du peptide de séquence YCQKFLWTCDSEPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) et/ou d'un acide nucléique codant pour le peptide de séquence YCQKFLWTCDSEPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1) pour la
25 fabrication d'un médicament. Ce médicament peut être à usage humain ou vétérinaire.

[0053] Dans la présente, le peptide peut être associé à tout support pharmacologiquement acceptable afin par exemple d'améliorer sa biodisponibilité, sa solubilité, sa stabilité en solution et/ou la fabrication du
30 médicament.

[0054] Dans la présente par « support pharmaceutiquement acceptable », on entend tout composé connus par l'homme du métier pour être utilisé dans des médicaments. Il peut d'agir, par exemple des composés cités dans l'ouvrage Pharmacie galénique de A. LEHIR (Ed. Masson, 1992 (6^{ème} édition)) (Réf 7).

[0055] Dans la présente par « association », on entend une liaison covalente avec le support, une liaison par interactions ioniques, la présence dans une solution du support et du peptide de l'invention.

10 **[0056]** Le médicament comprenant le peptide de séquence SEQ ID NO 1 peut être formulé sous toute forme permettant son administration à un patient ou à un animal. Il peut s'agir, par exemple, d'une formulation permettant une administration par voie orale, intraveineuse, péridurale, cutanée, ou transdermique.

15 **[0057]** Dans la présente par « formulation » on entend une formulation injectable (par exemple comme pour l'octaplex (marque enregistrée) ou le synergon (marque déposée)), une formulation orale par exemple un sirop, une poudre (par exemple comme pour l'octaplex (marque enregistrée)), des granules, un comprimé (comme par exemple pour l'estima (marque enregistrée)), un comprimé pelliculé (comme par exemple pour le provames (marque déposée)), une gélule, un spray, une formulation locale comme par exemple une crème (comme par exemple pour la crème trophicrème (marque déposée)), une lotion, un gel, une formulation oculaire par exemple un collyre, une formulation pour injection intraveineuse, une
20 formulation injectable par dispositifs d'auto injection type stylo à insuline, un patch transdermique, comprimés disponibles per os, une formulation pour ingestion sublinguale, ou une formulation pour injection péridurale.

[0058] Par exemple, il peut également s'agir des différentes formulations pharmaceutiques décrites dans l'ouvrage Pharmacie galénique de A. LEHIR (Ed. Masson, 1992 (6^{ème} édition)) (Réf 7).
30

[0059] Le médicament peut être, par exemple, administré sous forme de gélules, de comprimés, de patchs, de solutions injectables, de suppositoires et/ou de poudres.

[0060] La concentration du peptide de l'invention dans le médicament
5 et/ou le produit vétérinaire peut être toute concentration efficace du point de vue pharmaceutique et acceptable par le patient ou l'animal traité comprise par exemple entre 1nM et 1000nM.

[0061] Le médicament comprenant le peptide de l'invention est de
10 préférence administré afin d'obtenir une concentration intraveineuse permettant un effet biologique. Cette concentration plasmatique efficace peut également être déterminée, par exemple en suivant le temps de demi-vie du peptide de l'invention après son injection par voie intraveineuse à un mammifère et mesure de sa concentration par spectrométrie de masse. Le
15 temps de demi-vie correspond au temps nécessaire pour que la concentration dudit médicament soit égale à la moitié de la concentration initiale.

[0062] Le médicament et/ou le produit vétérinaire comprenant le
peptide de séquence SEQ ID NO 1 peut être conditionné pour une
administration une fois par jour, deux fois par jour, trois fois par jour, tous
20 les deux jours, tous les trois jours, une fois par semaine.

[0063] Le mode d'administration et la quantité administrée peuvent être adaptés à chaque individu et peuvent être déterminés par le praticien notamment en fonction des caractéristiques physiologiques de l'individu traité.

[0064] Dans la présente le médicament peut-être un produit pour le
25 traitement de la douleur, de la migraine, de l'épilepsie, de la maladie de parkinson, de dysrythmies thalamiques, de troubles du sommeil et de la vigilance, de troubles bipolaires, de pathologies cardiovasculaires (hypertrophie cardiaque, hypertension), de pathologies lié à la libération
30 d'aldostérone, de dysfonctions érectiles, et de pathologies cancéreuses

[0065] De préférence, le médicament de la présente invention est un produit pour le traitement de la douleur, par exemple un antalgique, un analgésique, un antiallodynique.

[0066] De manière préférée, le médicament et/ou le produit vétérinaire
5 de la présente invention est un analgésique.

[0067] La présente invention a également pour objet un procédé de synthèse du peptide de séquence YCQKFLWTCDSERPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1).

[0068] Le procédé de synthèse dans la présente invention peut être un
10 procédé de synthèse chimique sur support solide ou une synthèse par recombinaison génétique.

[0069] Le procédé de synthèse par recombinaison génétique peut utiliser un système d'expression ou un vecteur tel que défini ci-dessus.

[0070] Le procédé de synthèse du peptide de l'invention par
15 recombinaison génétique peut comprendre notamment les étapes suivantes :

- transformer une cellule hôte avec un vecteur d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour le peptide de l'invention,
- 20 - cultiver la cellule hôte transformée dans des conditions de culture telles qu'elle fabrique le peptide de l'invention à partir dudit vecteur d'expression, et
- récupérer ledit peptide fabriqué par la cellule hôte.

[0071] Les étapes de transformation, de culture, ainsi que de
25 l'isolement du peptide peuvent être réalisées par les techniques habituelles de recombinaison génétique, par exemple des techniques décrites dans le document Sambrook, Fritsch and Maniatis, « Molecular cloning, A laboratory manual », second edition, Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989 (Réf 3) .

30 **[0072]** Par exemple, le peptide de séquence de SEQ ID NO 1 peut être préparé par les techniques classiques de synthèse chimique en phase

solide, par exemple selon la méthodologie de synthèse peptidique sur support solide Fmoc (« Fmoc solid Phase peptide synthesis, a practical approach », publié par W.C. Chan et P. D.White, Oxford university press, 2000 (Réf 4)).

- 5 [0073] D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront à la lecture de la description qui suit, en référence aux figures annexées.

10 Brève description des figures

- [0074] Figure 1 est un diagramme représentant le profil de chromatographie Liquide haute performance (CLHP) du venin de Psp3 (colonne phase inverse) (partie supérieure), exprimé en mAU en fonction du temps. Le diagramme inférieur représente le profil de chromatographie
15 CPLH (colonne échangeuse d'ion) des fractions indiquées par la partie grisée sur le diagramme supérieur. La partie grisée sur le profil CPLH inférieur correspond à un pic pur contenant la toxine Psp3Tx1.

- [0075] Figure 2 est un diagramme représentant le courant généré par les canaux $Ca_v3.2$ en nano ampère (nA) en fonction du temps. La courbe
20 montre l'effet de l'application d'une partie de la Psp3Tx1 purifiée par l'CPLH présenté sur la Figure 1 sur l'activité du canal $Ca_v3.2$ exprimé dans des ovocytes de Xénope. Le courant est enregistré dans une solution contenant 5mM Barium comme porteur de charges et il est évoqué par une dépolarisation à -30mV à partir d'un potentiel de repos de -100mV.

- 25 [0076] Figure 3 est un diagramme représentant plusieurs enregistrements de courants en nanoAmpère en fonction du temps de type-T générés par la sous-unité $CaV3.2$ à plusieurs potentiels avant (controle) et pendant l'application de la Psp3Tx1 (Psp3TX1).

- [0077] Figure 4 est un diagramme représentant des relations courant-
30 potentiel pour les enregistrements présentés dans la figure 3. L'abscisse

représentant le courant en nanoAmpère en fonction du potentiel en milliVolte (mV).

[0078] Figure 5 : séquence du plasmide pT7-7 (SEQ ID NO 4).

5 [0079] Figure 6 : séquence du plasmide de la série pGEX (SEQ ID NO 5).

[0080] Figure 7 : séquence du plasmide de la série pET32 (SEQ ID NO 6).

10 [0081] Figure 8 est un diagramme représentant le pourcentage d'inhibition du courant généré par les canaux Cav3.2 en fonction de la concentration de la toxine. L'ordonnée représente le pourcentage d'inhibition du courant généré par les canaux Cav3.2 et l'abscisse le logarithme décimal de la concentration molaire de la toxine. La courbe avec les ronds pleins correspond à la courbe d'inhibition avec la toxine Psp3Tx1, la courbe avec les ronds creux correspond à la courbe d'inhibition avec la toxine synthétique.

15

EXEMPLES

20 Exemple 1 : caractérisation du peptide de l'invention

[0082] Le venin de PARAPHYSA SP3 a été dilué au 1000ième dans la solution extracellulaire utilisée pour l'analyse en patch clamp. Cette solution est de composition suivante (en mM): NaCl 135, TEACl 20, HEPES 10, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1 (pH 7,3 avec TEAOH).

25 [0083] Des cellules HEK293 ont été transfectées avec un plasmide d'expression pcDNA3 contenant l'ADN complémentaire du canal calcique Cav3.2 humain et un gène rapporteur (CD8) à l'aide du réactif jetPEI™ (distribué par la société Q-biogen). Après 48 heures d'expression, les cellules transfectées ont été dispersées à l'aide de trypsine puis

30 ensemencées à faible densité sur des boîtes de cultures pour l'analyse en patch clamp.

- [0084] Les cellules positivement transfectées ont été repérées à l'aide de billes magnétiques recouvertes avec un anticorps anti-CD8 (Dyna^{MC}) comme décrit précédemment dans Jimenez, C., Bourinet, E., Leuranguer, V., Richard, S., Snutch, T.P. and Nargeot, J. (2000) "Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels." *Neuropharmacology*, 39, 1-10 (Réf 2). Les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés par la technique du « patch clamp » en configuration « whole cell » à l'aide d'un amplificateur Axopatch200B piloté par une interface Digidata et le logiciel pClamp9 (Molecular Devices). La solution d'enregistrement extracellulaire contenant 2mM calcium est décrite ci-dessus. Les enregistrements sont réalisés à l'aide de pipettes de borosilicate (Sutter Instruments) étirées pour avoir une résistance de 1,5 à 2,5mΩ. La solution intrapipette utilisée pour les enregistrements a la composition suivante : CsCl 130 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, MgATP 4 mM, TrisGTP 0,3 mM (pH 7,3 avec NaOH). L'analyse des résultats est réalisée à l'aide des logiciels Clampfit (marque de commerce), Excel (marque de commerce) et GraphPad Prism (marque de commerce).
- [0085] Les appareils utilisés dans cet exemple pour les enregistrements électrophysiologiques sont l'Amplificateur Axopatch200B (Molecular Device), Digidata 1300 (Molecular Device), le logiciel pClamp9 (Molecular Devices), l'amplificateur GeneClamp500 (Molecular Device), le microscope inversé Olympus^{MC} IX70 (Olympus France), le micromanipulateur Sutter (Sutter Instruments). Les composés, réactifs, et cellules utilisés provenait pour les produits chimiques de la société Sigma-Aldrich France, les cellules utilisées étaient les cellules HEK293 (ATCC), les billes Dyna^{MC} anti-CD8 de la société Invitrogen France, le Réactif jetPEI (marque de commerce) de la société Q-biogen France, le microorganisme *Xenopus Laevis* (CRBM – CNRS Montpellier France)
- [0086] Pour visualiser les courants calciques de type T générés par les canaux Cav3.2 recombinants exprimés dans les cellules transfectées, le

protocole de stimulation avec suivant est utilisé : à partir d'un potentiel de repos de -100mV, une dépolarisation de 100 ms à un potentiel de -30 mV est appliquée toutes les 10 secondes. L'amplitude du courant généré par cette stimulation est mesurée en condition contrôle puis lors de
5 l'application du venin de PARAPHYSA SP3. Pour ce faire, le venin de PARAPHYSA SP3 est aspiré dans une pipette identique à la pipette d'enregistrement. Cette pipette contenant le venin est connectée à un système de pression pneumatique permettant d'appliquer 1 à 2 microlitres de venin à proximité de la cellule enregistrée.

- 10 **[0087]** La caractérisation des fractions du venin de PARAPHYSA SP3 est effectuée dans un système d'expression différent. Le cDNA codant pour Cav3.2 humain est injecté dans des ovocytes de Xénope (*Xenopus laevis*) comme décrit dans Altier, C., Dubel, S.J., Barrère, C., Jarvis, S.E., Stotz, S.C., Spaetgens, R.L., Scott, J.D., Cornet, V., De Waard, M.,
15 Zamponi, G.W., Nargeot, J. and Bourinet, E. (2002) « Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. » *J. Biol. Chem.*, 277, 33598-33603 (**Réf 5**) et dans Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E. and Nargeot, J. (2004) "Plasma Membrane Expression of T-type Calcium Channel {alpha}1
20 Subunits Is Modulated by High Voltage-activated Auxiliary Subunits." *J Biol Chem*, 279, 29263-29269 (**Réf 6**). Les courants sont enregistrés par la technique de voltage imposé par double microélectrode à l'aide d'un amplificateur GenClamp500 (marque de commerce) (Molecular Devices (marque enregistrée)) piloté par le logiciel pClamp9(marque de
25 commerce). Les différentes fractions chromatographiques obtenues à partir du venin sont dissoutes dans la solution extracellulaire contenant (en mM): 5 BaOH₂, 25 TEAOH, 25 NaOH, 2 CsOH, 30 NMDG, 5 HEPES (pH à 7.3 avec de l'acide methanesulfonic). Les enregistrements sont réalisés dans une microcuve de 15µl. Les fractions (10µl) sont appliquées
30 manuellement, directement sur l'ovocyte enregistré à l'aide d'une pipette.

[0088] Dès l'application de la toxine purifiée, le courant du canal Cav3.2 est fortement inhibé au bout de 30 secondes (Figure 2). Lors du lavage de l'effet de la toxine, la récupération de l'amplitude du courant de départ est obtenue après plusieurs minutes.

5 [0089] Par ailleurs, tel que montré sur la figure 4, l'application de l'extrait provoque un déplacement d'environ 20mV vers les potentiels positifs de la relation courant-potentiel. Ce déplacement est une caractéristique des toxines provoquant une inhibition du « senseur de voltage » des canaux ioniques. Cet effet classique des toxines d'araignée
10 est décrit dans Winterfield JR, Swartz KJ. (2000) A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels. J Gen Physiol, 116(5):637-44.) (Réf 10). Il s'agit d'un blocage de la partie du canal qui détecte la variation de potentiel (le « voltage sensor »). La conséquence est que l'ouverture du canal est rendue plus difficile et
15 nécessite une dépolarisation plus importante. Ainsi la relation courant potentiel est déplacée vers des potentiels plus positifs.

[0090] Il apparaît donc clairement que l'extrait comporte un antagoniste d'un canal de type T. Cette molécule est donc une nouvelle molécule permettant d'inhiber le signal douloureux.

20

Exemple 2 : isolement et séquençage du peptide de l'invention

[0091] Les fractions de venin inhibant l'activité des canaux calciques tel que présenté dans l'exemple précédent ont été isolées et la recherche du composant responsable de cette inhibition a été effectuée par des étapes
25 successives tests d'activité couplées avec les étapes de fractionnement

[0092] Le venin de PARAPHYSA SP. A été obtenu par stimulation électrique des chélicères de femelles adultes. Le venin a été collecté dans des microtubes, et lyophilisé

[0093] La préparation du venin pour les analyses d'activité et pour la
30 séparation chromatographique a consisté en une dissolution du lyophilisat

dans de l'eau ultra-pure à une dilution 10 fois de celle du volume de venin initial, une centrifugation (14 000 tours par minute, 20 min) et une filtration sur membrane de 0,45 µm (SJHVL04NS Millipore (marque de commerce)).

[0094] Purification du composant actif du venin par chromatographie :

- 5 Dans une première étape, un aliquote de 100 µl de la dilution du venin (10 µl équivalents de venin brut) est fractionné par chromatographie liquide en phase inverse à haute performance (RP-HPLC) sur une colonne semi-préparative C8 (5C8MS, 10x250 mm, Waters). Le gradient utilisé est composé de eau + 0,1% acide trifluoroacétique (A) / acetonitrile + 0,1%
10 acide trifluoroacétique (B). Le gradient est programmé comme suit: 0% B pendant 5 min, 0 à 60% B en 60 min, 60 à 90% B en 10 min, débit 2 mL/min. Les fractions sont collectées manuellement en sortie de colonne, en surveillant la variation de l'absorbance UV à 215 nm. Ces fractions sont ensuite lyophilisées puis leur activité est testée sur le canal calcium de
15 type T comme décrit ci-dessus.

- [0095]** Une deuxième étape de purification est réalisée comme suit, sur les fractions de RP-HPLC actives : ces fractions sont analysées dans une deuxième étape de chromatographie d'échange de cations, sur une colonne Tosoh SP5PW (marque de commerce) (4,6 x 70 mm) (Tosoh),
20 avec un gradient linéaire d'acétate d'ammonium dans l'eau (de 20 mM à 1M en 50 min) avec un débit de 0.5 mL/min. Les fractions collectées sont lyophilisées puis leur activité est testée sur le canal calcium de type T comme décrit ci-dessus.

- [0096]** Après identification de la fraction active, la pureté et le poids moléculaire du peptide constituant la fraction active sont déterminés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight).
25

- [0097]** Les mesures de spectrométrie de masse sont réalisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur un spectromètre de masse
30 Voyager DE-Pro (marque de commerce) (Applied Biosystems (marque enregistrée)) en mode réflecteur. Les peptides sont mélangés avec la

matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -CHCA, Sigma(marque enregistrée), 5 mg/mL dans 50:50:0,1 eau:acetonitrile:TFA) et analysés. Les spectres de masse sont calibrés avec des standards internes et analysés dans le logiciel Data Explorer (marque de commerce).

5 [0098] La séquence du peptide purifié est déterminée par séquençage automatique en utilisant un séquenceur en phase gazeuse (Applied Biosystems Procise) par dégradation d'Edman.

[0099] Avant analyse, les ponts disulfures du peptide purifié sont réduits par le DTT (Dithiothreitol 10 mM, 55°C, 45 min) et alkylés avec de l'IAA (acide Iodoacétique, 50 mM, à 20°C, 30min) selon un protocole
10 connu de l'homme du métier (voir John M. Walker. The Protein Protocols Handbook, Humana Press 1996 (ISBN 0-89603-339-2) (Réf 14). Le peptide réduit/alkylé est soumis à un dessalage par chromatographie RP-HPLC C18 sur une colonne Merck Chromolith Speed-Rod (marque de commerce) (0,46x50 mm). La séquence du peptide réduit/alkylé est
15 ensuite déterminée par séquençage N-terminal automatique en phase gazeuse sur un séquenceur de peptides de modèle Applied Biosystems 477A (marque de commerce) (Applied Biosystems (marque enregistrée)).

[00100] La séquence peptidique obtenue est
20 YCQKFLWTCDSEPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1)

[00101] Cet exemple démontre donc clairement que la molécule antagoniste des canaux de type T est le peptide de séquence ID N°1.

[00102] Ce peptide représente donc une nouvelle molécule susceptible d'inhiber le signal douloureux.

25

Exemple 3 : synthèse chimique du peptide de séquence SEQ ID NO 1.

[00103] La société Altergen (marque enregistrée) synthétise chimiquement le peptide de l'invention selon le protocole suivant : synthèse en phase solide selon la technique de Merifield,
30 stratégie Fmoc.

[00104] L'activité inhibitrice du peptide identifié dans l'exemple 2 est testé in vitro sur différents canaux calciques de type T (résultats non fourni).

5 Exemple 4 : synthèse chimique du peptide de séquence SEQ ID NO 1.

[00105] La société Genepep (marque enregistrée) a synthétisé chimiquement le peptide de l'invention selon le protocole suivant : synthèse en phase solide selon technique de Merifield, stratégie Fmoc. (**Réf 4**)

[00106] La société Synprosis (marque enregistrée) a replié le peptide
10 linéaire produit par la société Genepep selon le protocole suivant : incubation de 10µM du peptide linéaire Psp3-Tx1 dans un tampon contenant 1mM glutathion réduit (GSH), 1mM glutathion oxydé (GSSG), 100mM trishydroxyméthylaminométhane (TRIS) pH9, 25% glycérol. L'incubation a été réalisée pendant 24 heures sous agitation douce à
15 température ambiante. La purification de la toxine Psp3-Tx1 synthétique a été réalisée en chromatographie HPLC en phase inverse sur une colonne RP-C18 Chromolith (marque enregistrée) en utilisant un gradient de 10 à 50% d'acétonitrile (ACN) dans une solution à 0,1% de trifluoroacetate (TFA).

20 **[00107]** La vérification de la masse du peptide synthétique replié a été réalisée par spectrométrie de masse donnant une valeur de 3398.0 daltons (Da) en accord avec la formation des 3 ponts disulfures entre les 6 cystéines.

25 Exemple 5: caractérisation du peptide synthétique de l'invention produit dans l'exemple 4.

[00108] L'activité inhibitrice du peptide synthétique de l'exemple 4 a été testée in vitro sur le canal Ca_v3.2. Une comparaison de l'inhibitions avec le peptide naturel (Psp3-Tx1) a été réalisée dans les même conditions. Le
30 peptide synthétique et le peptide naturel (toxine naturelle) ont été dilués à une concentration stock de 10⁻³ molaire dans de l'eau distillée. A partir de

cette concentration stock, les peptides ont été dilués dans une solution correspondant à la solution extracellulaire utilisée pour l'analyse en patch clamp. Cette solution est de composition suivante (en mM): NaCl 135, TEACl 20, HEPES 10, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1 (pH 7,3 avec TEAOH). Les concentrations testées ont été les suivantes : pour le peptide synthétique : 10⁻⁸, 10⁻⁷, et 10⁻⁶ molaire ; pour le peptide naturel : 10⁻⁹, 10⁻⁸, 3.10⁻⁸, 10⁻⁷, 3.10⁻⁷, et 10⁻⁶ molaire.

[00109] Des cellules HEK293 (ATCC) exprimant de manière stable la séquence d'ADN complémentaire du canal calcique Cav3.2 humain ont été utilisées. A chaque passage de la lignée cellulaire, des cellules ont été ensemencées à faible densité sur des boîtes de cultures pour l'analyse en « patch clamp » (électrophysiologie moléculaire).

[00110] Les cellules positivement transfectées ont été repérées à l'aide de billes magnétiques recouvertes avec un anticorps anti-CD8 (Dyna) comme décrit précédemment dans Jimenez, C., Bourinet, E., Leuranguer, V., Richard, S., Snutch, T.P. and Nargeot, J. (2000) "Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels." *Neuropharmacology*, 39, 1-10 (**Réf 2**).

[00111] Les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés par la technique du « patch clamp » en configuration « whole cell » à l'aide d'un amplificateur Axopatch200B piloté par une interface Digidata et le logiciel pClamp10 (Molecular Devices). La solution d'enregistrement extracellulaire contenant 2mM calcium est décrite ci-dessus.

[00112] Les enregistrements sont réalisés à l'aide de pipettes de borosilicate (Sutter Instruments) étirées pour avoir une résistance de 1,5 à 2,5mΩ.

[00113] La solution intrapipette utilisée pour les enregistrements est de composition suivante : CsCl 130 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, MgATP 4 mM, TrisGTP 0,3 mM (pH 7,3 avec NaOH). L'analyse des résultats est réalisée à l'aide des logiciels Clampfit (marque

de commerce), Excel (marque de commerce) et GraphPad Prism (marque de commerce).

[00114] Les appareils utilisés dans cet exemple pour les enregistrements électrophysiologiques sont l'Amplificateur Axopatch200B (Molecular Device), Digidata 1440 (Molecular Device), le logiciel pClamp10 (Molecular Devices), l'amplificateur GeneClamp500 (Molecular Device), le microscope inversé Olympus IX70 (Olympus France), le micromanipulateur Sutter (Sutter Instruments). Les composés, réactifs, et cellules utilisés provenaient pour les produits chimiques de la société Sigma-Aldrich France, les cellules utilisées étaient les cellules HEK293 (ATCC), les billes Dynal anti-CD8 de la société Invitrogen France, le Réactif jetPEI (marque de commerce) de la société Q-biogen France.

[00115] Pour visualiser les courants calciques de type T générés par les canaux $Ca_v3.2$ recombinants exprimés dans les cellules transfectées, le protocole de stimulation avec suivant est utilisé : à partir d'un potentiel de repos de -100mV, une dépolarisation de 100 ms à un potentiel de -30 mV est appliquée toutes les 10 secondes.

[00116] L'amplitude du courant généré par cette stimulation est mesurée en condition contrôle puis lors de l'application de concentration croissantes du peptide synthétique de l'exemple 4, ou de concentrations croissantes de la toxine native Psp3-Tx1. Pour ce faire, les solutions contenant les différentes concentrations du peptide synthétique ou de la toxine Psp3-Tx1 sont réparties dans des tubes de perfusion connectés à un collecteur permettant d'appliquer ces différentes solutions à proximité de la cellule enregistrée.

[00117] L'activité inhibitrice de chaque concentration du peptide synthétique ou de la toxine native est ainsi appréhendée en mesurant l'amplitude du courant $Ca_v3.2$ de la cellule enregistrée au plateau de l'effet.

[00118] Les effets inhibiteurs du peptide synthétique et du peptide naturel ont été présentés sous forme de pourcentage de bloc à chaque

concentration pour construire des courbes « effet dose » présentés dans la figure 8. Ces courbes « effet dose » ont été analysées avec le logiciel GrapPad Prism (marque du commerce) avec la fonction d'analyse sigmoïde « log(antagonist) vs. response – variable slope » permettant de
5 calculer la dose inhibant 50% du courant (EC50) ainsi que la pente de la courbe correspondant au nombre de Hill.

[00119] La figure 8 représente les courbes dose-réponses pour le peptide naturel (Psp3Tx1) (courbe avec des ronds noirs pleins) et le peptide synthétique (courbe avec les ronds noirs creux).

10 **[00120]** Ainsi dans la figure 8, l'EC50 pour la toxine naturelle est de 1.1µM avec un nombre de Hill de 0.87 (nombre de cellules analysées est de 6), et l'EC50 pour le peptide synthétique est de 2.01µM avec un nombre de Hill de 0.89 (nombre de cellules analysées égale à 20).

[00121] Les résultats montrent donc que le peptide synthétique et le
15 peptide natif inhibent les courants du canal Ca_v3.2. Les résultats sont décrits avec un coefficient de Hill égale à environ 1, impliquant une interaction 1 :1 entre le canal et les peptides.

[00122] Cet exemple démontre donc clairement que le peptide de séquence ID NO 1, extrait du venin d'araignée comme présenté dans
20 l'exemple 1 et/ou synthétisé chimiquement, inhibe les courants du canal Ca_v3.2

Exemple 6 : effet analgésique du peptide de l'invention.

[00123] Des souris sont utilisées afin d'observer l'effet analgésique du
25 peptide de l'invention vis-à-vis de douleurs induites par des stimuli thermiques.

[00124] Les souris sont des souris C57BL/6J sauvages et des souris C57BL/6J CaV3.2-/- . Le nombre total de souris est de 10 sauvages et 10 CaV3.2-/- .

[00125] Deux groupes de souris (C57BL/6J) sont utilisés, un groupe dans lequel on a injecté par voie intrathécale une solution physiologique comprenant le peptide de l'invention à une concentration de 10 et 100 nM et un deuxième groupe (groupe témoin) ne recevant que l'injection intrathécale de la solution physiologique seule. Les souris sont ensuite soumises au test de l'immersion de la queue dans un bain marie à 46°C. Cette expérience a pour but de déterminer le temps au bout duquel les souris réagissent au chaud douloureux montrant ainsi le seuil d'apparition du signal douloureux lié à la perception de la chaleur. La même expérience est réalisée en parallèle sur deux autres groupes de souris C57BL/6J dépourvues du gène codant pour le canal calcique de type-T codé par la sous unité CaV3.2. Cette expérience a pour but de montrer la sélectivité du peptide de l'invention.

[00126] Les résultats montrent une différence significative du temps de réaction à la chaleur entre le groupe de souris dans lequel le peptide a été injecté et le groupe de souris témoin. Le temps de réaction à la chaleur étant significativement plus long chez les souris qui reçoivent le peptide de séquence SEQ ID NO 1.

[00127] Des souris sont utilisées afin d'observer l'effet analgésique du peptide de l'invention vis à vis de stimuli mécaniques.

[00128] Les souris sont des souris C57BL/6J sauvages et des souris C57BL/6J CaV3.2-/- . Le nombre total de souris est de 10 sauvages et 10 CaV3.2-/- .

[00129] Deux groupes de souris (C57BL/6J) sont utilisés, un groupe dans lequel on a injecté par voie intrathécal une solution physiologique comprenant le peptide de l'invention à une concentration de 10 et 100 nM et un deuxième groupe (groupe témoin) ne recevant que l'injection intrathécal de la solution physiologique seule. Les souris sont ensuite soumises à l'expérience de stimulation mécanique par les soies de Von Frey. Cette expérience a pour but de déterminer le seuil de réaction à un

stimulus mécanique d'intensité croissante appliqué sur la voûte plantaire. Le seuil de réaction des animaux est corrélé à l'apparition du signal douloureux lié à la perception de la pression mécanique. La même expérience est réalisée en parallèle sur deux autres groupes de souris C57BL/6J dépourvues du gène codant pour le canal calcique de type-T codé par la sous unité CaV3.2. Cette expérience a pour but de montrer la sélectivité du peptide de l'invention.

[00130] Les résultats montrent une différence significative de seuil de perception à la pression mécanique entre le groupe de souris dans lequel le peptide a été injecté et le groupe de souris témoin. Le seuil de pression étant significativement plus élevé chez les souris qui reçoivent le peptide de séquence SEQ ID NO 1.

[00131] Le peptide de l'invention a donc un effet analgésique attendu vis-à-vis de stimuli douloureux thermiques et mécaniques.

[00132] Cet exemple démontre donc que le peptide de séquence SEQ ID NO 1, identifié dans l'exemple 2, est une nouvelle molécule pour le traitement de la douleur.

Exemple 7 : comparaison de l'effet analgésique du peptide de l'invention avec celui d'un analgésique de référence.

[00133] Les souris et le protocole expérimental utilisé dans le présent exemple sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 4.

[00134] Deux groupes de souris supplémentaires sont testés :

- un groupe dans lequel a été injecté par voie intrathécale une dose de morphine (1µg/kg), et
- un groupe dans lequel a été le peptide de séquence SEQ ID NO 1 (10nM).

Exemple 8 : effet antihypertenseur du peptide de l'invention.

[00135] Les souris utilisées dans le présent exemple sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 4.

[00136] Des souris sont utilisées afin d'observer l'effet antihypertenseur du peptide de l'invention. Deux groupes de souris (C57BL/6J) sont utilisés, un groupe dans lequel on injecte par voie intraveineuse une solution physiologique comprenant le peptide de l'invention à une concentration de 10 et 100 nM et un deuxième groupe (groupe témoin) ne recevant que l'injection intraveineuse de la solution physiologique seule. La mesure de la pression artérielle est réalisée par le principe de la méthode du manchon caudal (Plehm, R., Barbosa, M.E. and Bader, M. (2006) Animal models for hypertension/blood pressure recording. *Methods Mol Med*, 129, (Réf 15)).

10

Exemple 9 : effet antiprolifératif du peptide de l'invention.

[00137] Des cellules cancéreuses de prostate LNCAP sont utilisées afin d'observer l'effet antiprolifératif du peptide de l'invention.

Le milieu de culture utilisé est le milieu RPMI 1640 (BioWhittaker SA, Verviers, Belgium), supplémenté de 5 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France) et de 10% FBS (Applera France SA, Courtaboeuf, France) comme indiqué dans le document Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoï-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P. (2008) CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 283(15):10162-73. (Réf 16)

[00138] Deux conditions de cellules sont utilisées :

- une condition dans laquelle les cellules sont cultivées dans différents essais en présence du peptide de l'invention à des concentrations de 10, 30, 100, 300, 1000 nM, et
- une deuxième condition (témoin) sans peptide.

[00139] La mesure de la prolifération cellulaire est réalisée par la méthode CellTrace (marque de commerce) CFSE (Invitrogen (marque de enregistrement)) basée sur l'incorporation du traceur fluorescent CFSE par les

30

cellules cultivées et d'une mesure par cytomètre de flux des cellules
marquées

Listes des références

- Ref 1** Bourinet, E., et al., Silencing of the CaV3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J*, 2005. 24(2): p. 315-24.
- 5 **Ref 2** Jimenez, C., Bourinet, E., Leuranguer, V., Richard, S., Snutch, T.P. and Nargeot, J. (2000) Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels. *Neuropharmacology*, 39, 1-10.
- 10 **Ref 3** Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular cloning, A laboratory manual, second edition, Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Ref 4** Fmoc solid Phase peptide synthesis, a practical approach », publié par W.C. Chan et P. D.White, Oxford university press, 2000
- 15 **Ref 5** Altier, C., Dubel, S.J., Barrère, C., Jarvis, S.E., Stotz, S.C., Spaetgens, R.L., Scott, J.D., Cornet, V., De Waard, M., Zamponi, G.W., Nargeot, J. and Bourinet, E. (2002) Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. *J. Biol. Chem.*, 277, 33598-33603.
- 20 **Ref 6** Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E. and Nargeot, J. (2004) Plasma Membrane Expression of T-type Calcium Channel {alpha}1 Subunits Is Modulated by High Voltage-activated Auxiliary Subunits. *J Biol Chem*, 279, 29263-29269.
- 25 **Ref 7** Pharmacie galénique de A. LEHIR (Ed. Masson, 1992 (6 eme édition))
- Ref 8** Taylor, J.T., Zeng, X.B., Pottle, J.E., Lee, K., Wang, A.R., Yi, S.G., Scruggs, J.A., Sikka, S.S. and Li, M. (2008) Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World J Gastroenterol*, 14, 4984-4991.
- 30 **Ref 9** Chen, C.C., Lamping, K.G., Nuno, D.W., Barresi, R., Prouty, S.J., Lavoie, J.L., Cribbs, L.L., England, S.K., Sigmund, C.D., Weiss, R.M., Williamson, R.A., Hill, J.A. and Campbell, K.P. (2003) Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science*, 302, 1416-1418.
- 35

- Ref 10** Winterfield JR, Swartz KJ. (2000) A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels. *J Gen Physiol*, 116(5):637-44.)
- 5 **Ref 11** Panner A, Cribbs LL, Zainelli GM, Oritano TC, Singh S, Wurster RD. (2005) Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium*, 37(2):105-19
- 10 **Ref 12** Lu F, Chen H, Zhou C, Liu S, Guo M, Chen P, Zhuang H, Xie D, Wu S. (2008) T-type Ca^{2+} channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation *Cell Calcium*. 43(1):49-58
- 15 **Ref 13** Taylor JT, Huang L, Pottle JE, Liu K, Yang Y, Zeng X, Keyser BM, Agrawal KC, Hansen JB, Li M (2008) Selective blockade of T-type Ca^{2+} channels suppresses human breast cancer cell proliferation.. *Cancer Lett*, 18;267(1):116-24
- Ref 14** John M. Walker. *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press 1996 (ISBN 0-89603-339-2)
- 20 **Ref 15** Plehm, R., Barbosa, M.E. and Bader, M. (2006) Animal models for hypertension/blood pressure recording. *Methods Mol Med*, 129
- 25 **Ref 16** Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoï-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P. (2008) $\text{CaV}3.2$ T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 283 (15):10162-73.
- 30 **Ref 17** Han KK, Martinage A (1992) Post-translational chemical modification(s) of proteins. *Int J Biochem*. 24(1):19-28. ; Walsh G, Jefferis R (2006) Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins *Nature Biotechnology* - 24, 1241 – 1252
- 35 **Ref 18** Escoubas P. (2006) Molecular diversification in spider venoms: a web of combinatorial peptide libraries. *Mol Divers*. 10(4):545-54).

REVENDEICATIONS

1. Peptide de séquence en acides aminés YCQKFLWTCDSEPCCEGLVCRLWCKIN (SEQ ID NO 1).
2. Acides nucléiques codant pour le peptide défini dans la revendication 1.
3. Acide nucléique selon la revendication 2, dans lequel la séquence de l'acide nucléique est
5' TAY TGY CAR AAR TTY YTN TGG ACN TGY GAY WSN GAR MGN
CCN TGY TGY GAR GGN YTN GTN TGY MGN YTN TGG TGY AAR ATH
AAY 3' (SEQ ID NO 3)
dans lequel A est adénosine, C est cytidine, G est guanosine, T est
thymidine et H est A ou C ou T, M est A ou C, N est A ou C ou G ou T, R
est A ou G, S est C ou G, W est A ou T et Y est C ou T.
4. Système d'expression comprenant un plasmide et/ou un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique selon la revendication 2.
5. Utilisation du peptide selon la revendication 1 en tant qu'antagoniste d'un canal calcique de type T.
6. Utilisation selon la revendication 5, dans laquelle ledit canal est un canal choisi dans le groupe comprenant le canal Cav3.2 et le canal Cav3.1.
7. Utilisation d'un peptide selon la revendication 1 ou d'un acide nucléique selon la revendication 2 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement de la douleur.
8. Utilisation selon la revendication 7, dans laquelle ledit médicament est un analgésique.
9. Procédé de synthèse du peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de synthèse chimique sur support solide ou une étape de synthèse par recombinaison génétique.

1/8

Figure 1

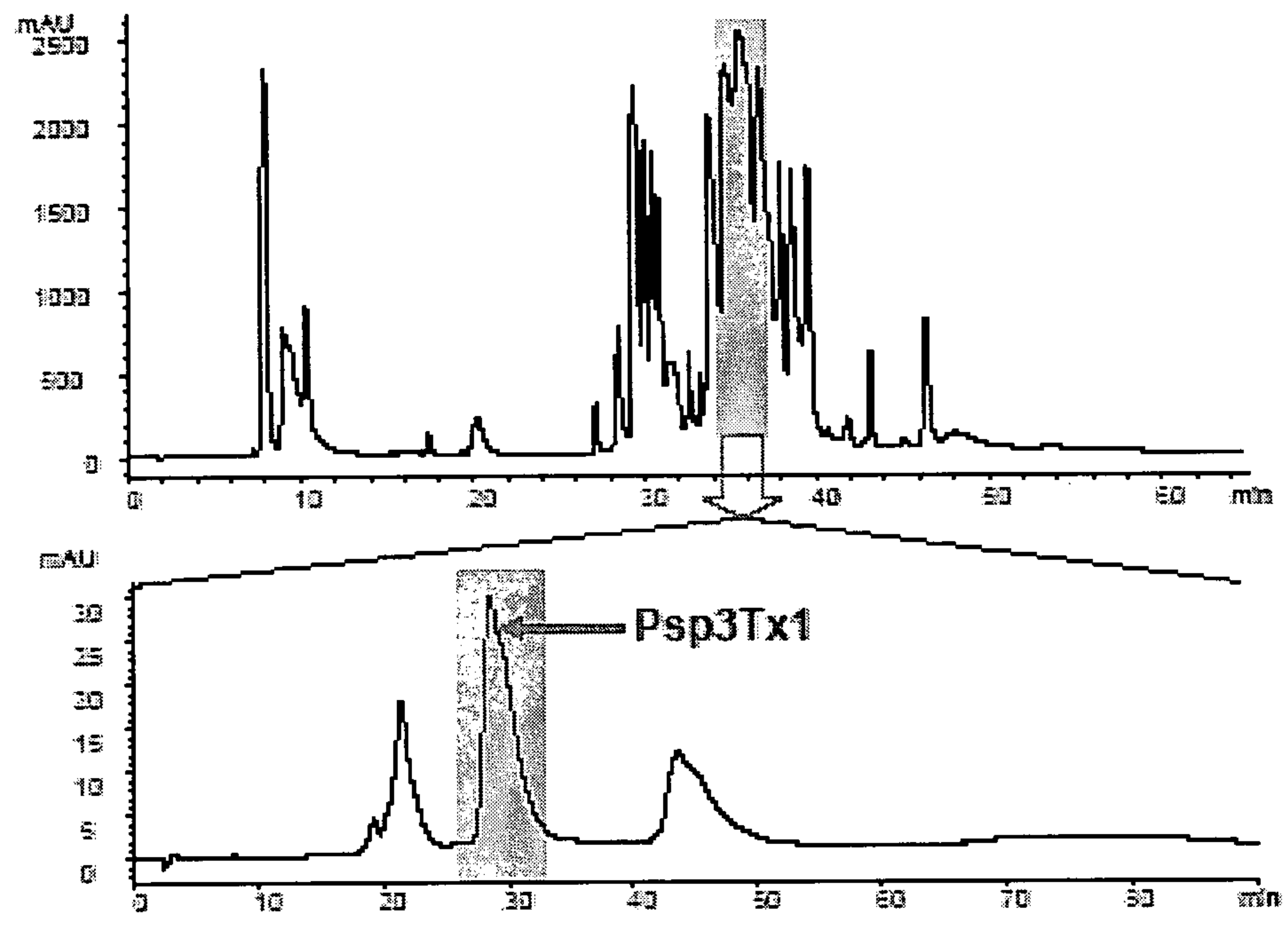
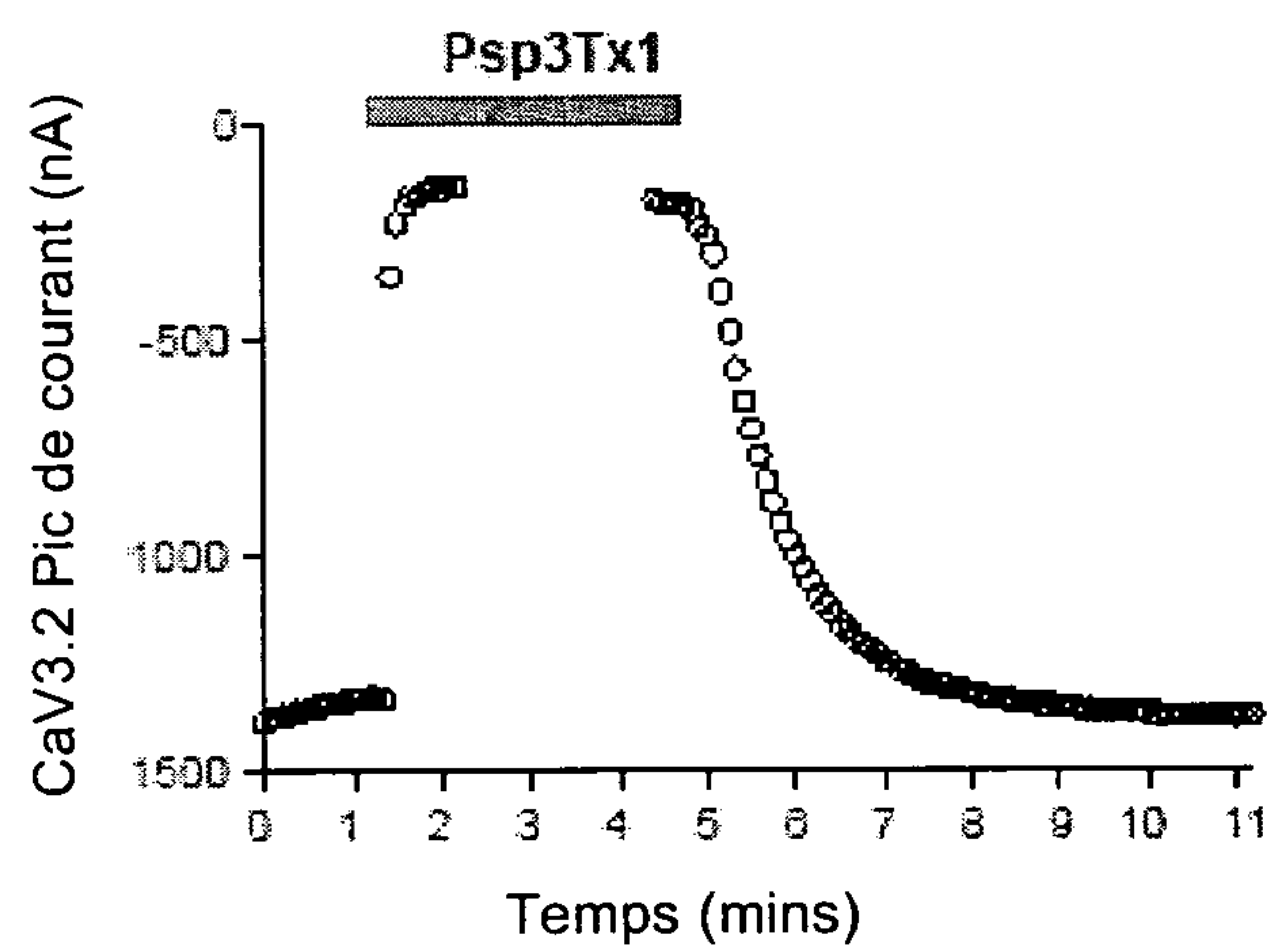


Figure 2



2/8

Figure 3

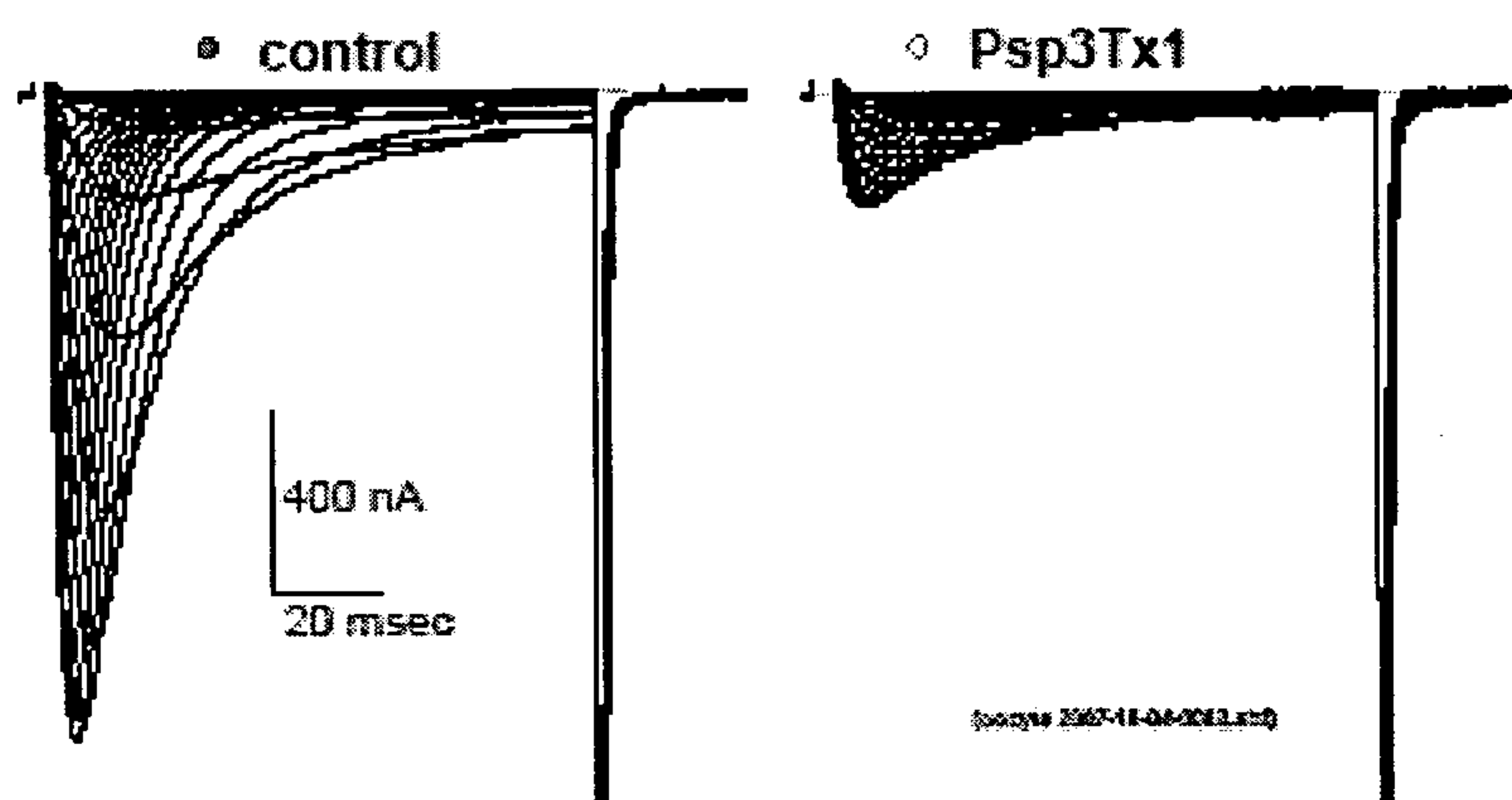
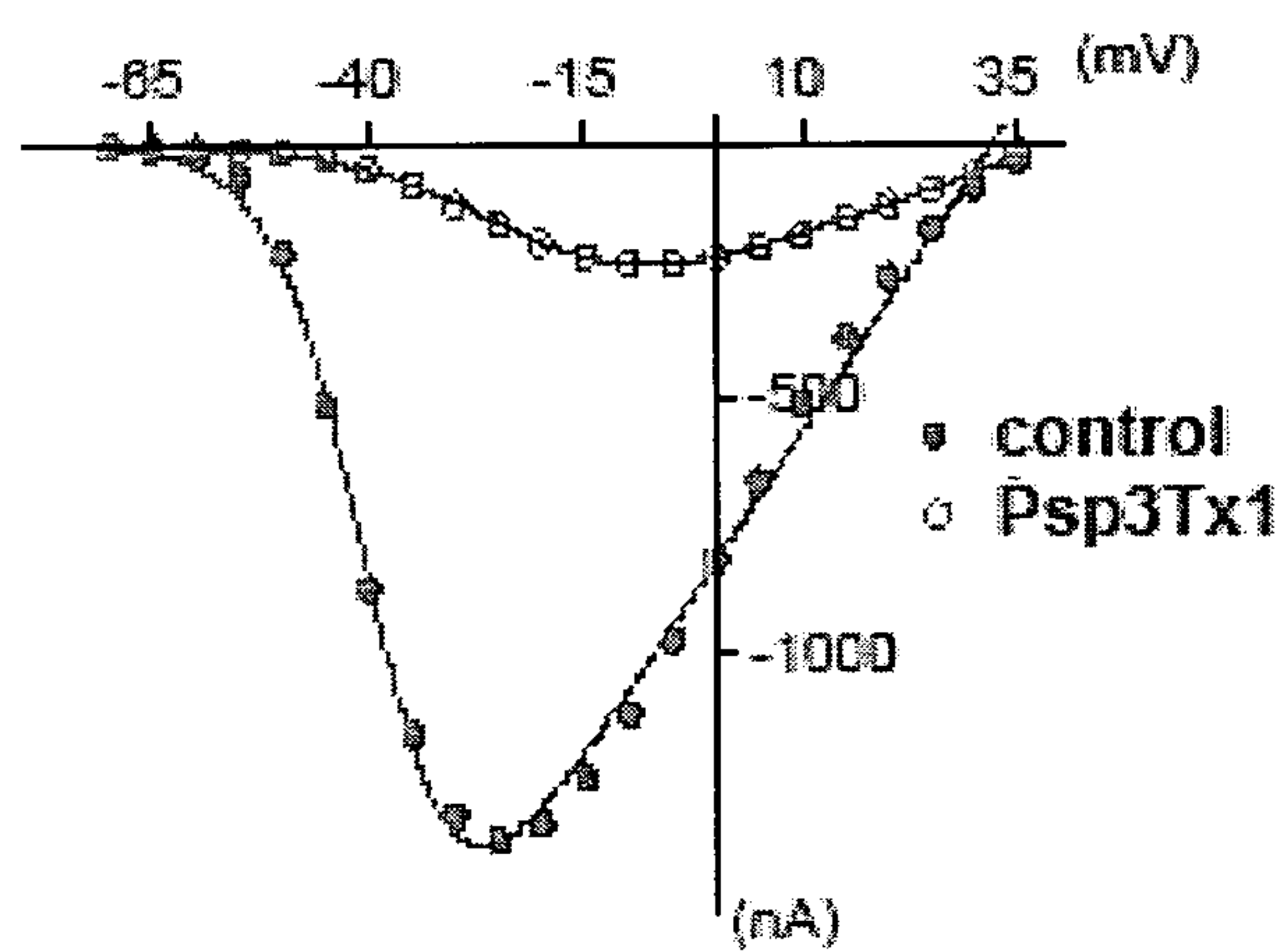


Figure 4



3/8

Figure 5

Séquence pT7-7 :

AATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCGCGAAT
TCTAGCCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGAAACCGTTGTGGTCTCCCTAT
AGTGAGTCGTATTAATTTTGAAGTCTATCAGAAGTTCGAATCGCTGGGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGA
AAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCG
TCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGCGGGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTA
TATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCANAGATCTNTGCGGTGTGAAATAC
CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG
TCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACG
CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTAT
AAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACC
TGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC
GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTA
TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTG
GTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT
TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGA
TCTTCACCTAGATCCTTTTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCAT
GATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTT
CTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA
GAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCA
CCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCT
CAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCT
ATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGA
CTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGC
CATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTT
TTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGA
CGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCT
AGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCC
GGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC
AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA
GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGAT
TGATTT

4/8

Figure 6 (1/2)

Séquence pGex-4-T1

ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGG
TCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCGACATCAT
AACGGTTCCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAG
CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGTATTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGC
AACCCACTCGACTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATA
AATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAAT
TAACACAGTCTATGGCCATCATAACGTTATATAGCTGACAAGCACAAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTG
CAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACT
TTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATA
AAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACA
TGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTTGTTTTAAAAACGTATTGAAGCTATCCCACAAATTG
ATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACC
ATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGGAATTCCTGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACT
GACTGACGATCTGCCTCGCGGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
CAGCTTGCTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGG
GCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCC
TATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCG
GAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGC
TTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCAT
TTTGCTTCCCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
TGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGA
TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGC
GCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAG
TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAG
GACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC
TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACAT
TAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC
CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG
GTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAG
TTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTG
ATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGG
TTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA

5/8

Figure 6 (2/2)

CTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGC
TAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTAC
CGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG
AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG
TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTG
TCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG
CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCC
CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCA
GCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTAC
ACCGCATAAATTCCGACACCATCGAATGGTGCAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTC
AATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTGCGAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCG
TTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGC
TGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCA
GTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTGCGGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGG
TGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCA
GTGGGCTGATCATTAACCTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGG
CGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGG
GCGTGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTACACAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGC
GTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACT
GGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTG
CCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGATATCTCGG
TAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCC
TGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGC
CCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATT
CATTAAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAG
CTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA
CAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC
CCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCA
AGCGGTGCCGGAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTGTCCTCCCTCAAACCTGGCAGAT
GCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACCGGA
GAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTAT
TTTTGATGGCGTTGGAATT

6/8

Figure 7 (1/3)

Séquence pET32

atccggatatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaagaccggttagagggccccaaggggttatgctagtt
attgctcagcgggtggcagcagccaactcagcttcctttcgggctttgtagcagccggatctcagtggtggtggt
ggtggtgctcgagtgcggccgcaagcttgctcgacggagctcgaattcggatccgatatcagccatggccttgctg
tcgtcgtcggtaaccagatctgggctgtccatgtgctggcgttcgaatttagcagcagcggtttctttcatacca
gaaccgctggcaccagaccagaagaatgatgatgatggtgcatatggccagaaccagaaccggccagggtta
gcgtcgaggaactctttcaactgaccttagacagtgcacccactttgggtgcccgcacttcaccgtttttgaac
agcagcagagtcgggataccacggatgccatatttcggcgcagtgccagggttttgatcgatgttcagttttgca
acggtcagtttgccctgatattcgtcagcgatttcattccagaatcggggcgatcattttgcacggaccgcaccac
tctgccagaaaatcgacgaggatcgccccgtccgctttgagtacatccgtgtcaaaactgtcgtcagtcaggtga
ataattttatcgctcatatgtatatctccttcttaaagttaaacaaaattatttctagaggggaattgttatccg
ctcacaattcccctatagtgagtcgtattaatttcgcgggatcgagatcgatctcgtacctctacgccggacgca
tcgtggccggcatcaccggcgccacagggtgcgggtgctggcgccctatatcgccgacatcaccgatggggaagatc
gggctcgccacttcgggctcatgagcgcttggttcggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgggggactgt
tgggcgccatctccttgcatgcaccattccttgcgggcggggtgctcaacggcctcaacctactactgggctgct
tcctaatgcaggagtcgcataagggagagcgtcgagatcccggacaccatcgaatggcgcaaaacctttcgcggt
atggcatgatagcgcccgaagagagtcgaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacggttatatcgatgtcgca
gagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcggtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgg
gaaaaagtggaaagcgcgatggcgagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacag
tcgttgctgattggcgttgccacctccagtcctggccctgcacgcgcgctcgcaaattgtcgcggcgattaaatct
cgcgccgatcaactgggtgccagcgtgggtggtgctgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcg
gtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtggtgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgct
gtggaagctgcctgcactaatgttcggcggttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatt
ttctcccatgaagacggtacgcgactggcggtggagcatctggtcgcatgggtcaccagcaaatcgcgctgtta
gcgggcccatthaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaatt
cagccgatagcggaaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgag
ggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtc
gggctgcgcgttggtgcggacatctcggtagtggtgatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccg
ttaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggc
caggcgtgaagggaatcagctgttgccgctctcactggtgaaaagaaaaaccacctggcgcccaatacgcaa
accgctctccccgcgcgttgccgattcattaatgcagctggcacgacagggtttcccgactggaaagcgggcag
tgagcgcaacgcaattaatgtaagttagctcactcattaggcaccgggatctcgaccgatgcccttgagagcctt
caaccagtcagctccttcgggtgggcgcggggcatgactatcgtcgcccgcacttatgactgtcttctttatcat
gcaactcgtaggacagggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgaggaccgctttcgctggagcgcgacgat

7/8

Figure 7 (2/3)

gatcggcctgtcgcttgcggtattcggaatcttgcaagccctcgctcaagccttcgtcactgggtcccggccaccaa
acgttttcggcgagaagcaggccattatcgccggcatggcgggcccccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgtcggt
gaggaccgggctaggctggcggggttgccctactgggttagcagaatgaatcacggatacgcgagcgaacgtgaag
cgactgctgctgcaaaacgtctgcgacctgagcaacaacatgaatgggtcttcggtttccgtgtttcgtaaagtct
ggaaacgcggaagtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcacgcaggatgctgctggctaccctgtgg
aacacctacatctgtattaacgaagcgctggcattgacctgagtgatTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATAC
CGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCT
CTCTCGTTTTCATCGGTATCATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAACAGGA
AAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCAACGAGCTGGA
CGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTACGACCACGCTGATGAGCTTTACCAGAGCTGCCTCGCGCG
TTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGC
CGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACG
TAGCGATAGCGGAGTGATACTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATATGC
GGTGTAATAACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCTCGCTCACTGACT
CGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATAACGGTTATCCACAGAAT
CAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC
TGCGCTTTTTCATAGGTCTCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCGACCCCTGCCGC
TTACC GGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCA
GTTCCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTAT
CCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGA
TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGA
CAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAC
AAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAG
ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT
TATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCA
TAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGA
TACC GCGAGACCCACGCTCACCGGTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAA
GTGGTCCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG
TTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCAT
TCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCTCCTTCG
GTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTC
TTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTA
TGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGCTCAATACGGGATAATAACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGC

8/8

Figure 7 (3/3)

tcatcattggaaaacggttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctggttgagatccagttcgatgtaac
 ccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcggttctgggtgagcaaaaacaggaaggc
 aaaatgccgcaaaaaaggaataagggcgacacggaaatggttgaatactcatactcttcctttttcaatattatt
 gaagcatttatcaggggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatatagggg
 ttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgaaattgtaaacgttaatatatttgttaaaattcgcgttaaatt
 tttgttaaatcagctcattttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccg
 agatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggc
 gaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacccaatcaagttttttggggtcgaggtgcc
 gtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcga
 gaaaggaaggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaacca
 ccacacccgccgcgttaatgcgccgctacagggcgcgctccattcgcca

Figure 8

