



(11) Número de Publicação: **PT 1625152 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 7/08 (2006.01) **A61K 38/10** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.05.19	(73) Titular(es): UNIVERSITE PARIS 13	
(30) Prioridade(s): 2003.05.20 FR 0306023	99, AVENUE JEAN BAPTISTE CLÉMENT F-93430 VILLETANEUSE	FR
(43) Data de publicação do pedido: 2006.02.15	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE(CNRS)	FR
(45) Data e BPI da concessão: 2006.09.25 001/2007	ECOLE NORMALE SUPERIEURE	FR
	(72) Inventor(es): ALAIN PROCHIA NTZ	FR
	BRIGITTE LESAFFRE	FR
	MICHEL VOLOVITCH	FR
	LAURE SONNIER	FR
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO	
	R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS MODULADORES DA ACTIVIDADE DO FACTOR DE TRANSCRIÇÃO ENGRAILED**

(57) Resumo:

RESUMO

"PÉPTIDOS MODULADORES DA ACTIVIDADE DO FACTOR DE TRANSCRIÇÃO
ENGRAILED"

A invenção diz respeito a péptidos que se podem fixar sobre o factor de transcrição *engrailed* e que podem modular a sua actividade.

DESCRIÇÃO

"PÉPTIDOS MODULADORES DA ACTIVIDADE DO FACTOR DE TRANSCRIÇÃO *ENGRAILED*"

A invenção diz respeito a péptidos capazes de modificar a actividade dos factores de transcrição "*Engrailed*".

As proteínas *Engrailed* são factores de transcrição da classe das proteínas como homeodomínio. Os mamíferos possuem dois homólogos de *Engrailed* : *Engrailed-1* e *Engrailed-2*; estas duas proteínas, que possuem uma actividade semelhante, serão colectivamente designadas doravante neste documento sob a designação geral de *Engrailed* (EN).

Tanto no recém-nascido como no adulto a EN está expressa nos neurónios dopaminérgicos (DA) da substância negra (que sofrem degenerescência na doença de Parkinson) e nos núcleos da *rafe* e do *locus coeruleus* que desempenham um papel importante na regulação do humor e na criação dos comportamentos de vício.

Demonstrou-se (SIMON *et al.* J Neurosci. 21(9) : 3126-34, 2001) que a perda de EN durante o desenvolvimento se segue com bastante rapidez a degenerescência dos

neurónios dopaminérgicos, e que um dos alvos transcrpcionais da EN é a alfa-sinucleína, cuja ligação genética com determinadas formas de tipo familiar da doença de Parkinson foi demonstrada (POLYMEROPOULOS et al., Science. 276,2045-7, 1997), e que constituiria um regulador negativo da transmissão dopaminérgica (ABELIOVICH et al., Neuron, 25, 239-52, 2000).

O conjunto destas observações sugere fortemente a implicação da *Engrailed* nas patologias neurodegenerescentes, e nomeadamente nas patologias que afectem os neurónios dopaminérgicos, tais como a doença de Parkinson. A sua expressão nos neurónios da *rafe* e do *locus coeruleus* levanta a hipótese de uma implicação noutras patologias, tais como as disfunções do temperamento ou os vícios.

Aparenta portanto ser especialmente desejável dispor de moduladores da actividade da *Engrailed*.

Os Inventores investigaram se existiriam péptidos capazes de modular a actividade da *Engrailed* por fixação a essa proteína. Desta forma identificaram dois péptidos que se fixam sobre a *Engrailed*, e podem modular de modo específico a sua actividade, *in vitro*, bem como *in vivo*.

Estes péptidos: SWWETQLIASSG (Péptido 1 SEQ ID N°: 1) e WSWNEEVWFPFT (Péptido 2 ; SEQ ID N°. 2) são representados na figura 1.

Nas células transformadas que sobre expressam *Engrailed*, o péptido 1 tem um efeito activante, enquanto que o péptido 2 tem um efeito inibidor. Num contexto fisiológico, ambos os péptidos têm efeito activante.

Para além disto, os Inventores constataram que estes péptidos conferiam propriedades de activação da transcrição ao homeodomínio da *Engrailed*, que, por si próprio, não possui propriedades desse tipo.

A invenção presente tem como objecto um péptido capaz de se fixar ao factor de transcrição *Engrailed*, e de regular a actividade do dito factor de transcrição.

De acordo com um modo de realização preferido da invenção presente, o péptido referido é escolhido entre os péptidos com a sequência SWWETQLIASSG e a WSWNEEVWFPFT.

A invenção presente tem igualmente como objecto a utilização de um péptido para regular a actividade do factor de transcrição *Engrailed* numa célula viva.

Para a operacionalidade da invenção presente, o péptido referido pode ser introduzido na célula de diversos modos diferentes.

Ele pode vantajosamente ser associado a um péptido que contenha um domínio transdutor.

Designa-se pela expressão "domínio transdutor" uma sequência peptídica capaz de penetrar no interior de uma célula viva, independentemente da presença de transportadores ou de receptores específicos, e capaz de importar para a célula referida moléculas ou complexos moleculares de natureza variada (ácidos nucleicos, proteínas, péptidos/ácidos nucleicos, análogos de nucleótidos, liposomas), habitualmente designados sob a termo geral de "cargas".

São conhecidos por eles próprios, péptidos transdutores de diferentes tipos. Pode encontrar-se uma revisão, por exemplo em LIDGREN *et al.*, *TIPS*, **21**, 99-102, (2000) ; SCHWARZE e DOWDY, *TIPS*, **21**, 45-48, (2000); SCHWARZE *et al.* *Trends Cell. Biol.*, **10**, 290-295, (2000); PROCHIANTZ *Current Opinion in Cell Biology*, **12**, 400-406, (2000); *Cell-Penetrating Peptides. Processes and applications*. Ed. Ulo Langel. CRC Press (2002).

De acordo com um modo preferido de desempenho da invenção presente, pode associar-se um péptido regulador consoante a invenção, a um péptido contendo um domínio transdutor, do tipo penetratina, derivado da terceira hélice de um homeodomínio; São descritos alguns péptidos da família das penetratinas, por exemplo nas publicações de JOLIOT *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1864-1868, (1991); DEROSI *et al.* *J. Biol. Chem.*, **269**, 14, 10444-10450, (1994); BRUGIDOU *et al.* *Biophys. Biochem. Res. Com.*,

214, 685-693, (1995), bem como na Patente US 5.888.762, na Patente US 6.080.724, ou no Pedido PCT WO 00/01.417 ou no Pedido PCT WO 00/29.427.

A invenção presente tem igualmente como objecto uma composição contendo um péptido regulador de acordo com a invenção, associado a um péptido contendo um domínio transdutor, de preferência um domínio transdutor do tipo penetratina.

De acordo com um modo de realização preferido de uma composição de acordo com a invenção, o péptido regulador de acordo com a invenção está associado à *Engrailed*, ou a um fragmento de *Engrailed* que inclua pelo menos o seu homeodomínio.

A associação entre estes péptidos pode efectuar-se por ligação covalente, tal como descrito nos domínios mencionados adiante, ou também por ligação não covalente, tal como descrito no Pedido FR 03/00093.

A invenção presente engloba também todos os polipéptidos quiméricos que incluam um péptido de acordo com a invenção, fundido a um péptido heterólogo. De acordo com um modo de realização particular da invenção presente, o péptido heterólogo referido inclui pelo menos um domínio transdutor, de preferência um domínio transdutor do tipo penetratina. De acordo com um modo de realização preferido de um polipéptido quimérico de acordo com a invenção,

trata-se de um factor de transcrição quimérico, incluindo um péptido de acordo com a invenção fundido a um fragmento de *Engrailed* que inclua pelo menos o seu homeodomínio.

A invenção presente tem igualmente como objecto um polinucleótido seleccionado de entre:

- um polinucleótido que codifique para um péptido regulador de acordo com a invenção;
- um polinucleótido que codifica para um polipéptido quimérico de acordo com a invenção.

A invenção presente engloba igualmente um vector recombinante que inclui um polinucleótido de acordo com a invenção.

A invenção presente engloba também uma composição contendo um polinucleótido que codifica para um péptido regulador de acordo com a invenção e para um polinucleótido que codifique para um péptido heterólogo, nomeadamente um péptido contendo um domínio transdutor, de preferência um domínio transdutor do tipo penetratina. Uma composição de acordo com a invenção pode por exemplo incluir um vector recombinante incluindo uma codificando para um péptido regulador de acordo com a invenção, e uma sequência que codifique para o péptido heterólogo referido, podendo as duas sequências ser adjacentes ou não. Em alternativa, uma composição de acordo com a invenção pode incluir dois

vectores diferentes, um deles contendo uma sequência codificando para um péptido regulador de acordo com a invenção, e a outra contendo uma sequência codificando para o péptido heterólogo.

Podem ser utilizados vectores que incluam um polinucleótido de acordo com a invenção, se tal se pretender, para introduzir e expressar esse polinucleótido na célula na qual se pretende regular a expressão da *Engrailed*.

Podem empregar-se para este efeito os vectores habitualmente utilizados para exprimir um gene que tenha interesse, em células animais, por exemplo vectores virais. De forma vantajosa, pode utilizar-se como vector um bacteriófago sobre o qual esteja absorvido um péptido transdutor, tal como os que foram descritos no Pedido FR 03/00093.

A invenção presente tem igualmente como objecto a utilização de um péptido, de um polinucleótido, ou de uma composição tal como as que se definiram acima, para a obtenção de um medicamento, utilizável nomeadamente no quadro do tratamento de patologias do sistema nervoso, por exemplo de patologias neurodegenerescentes, tais como a doença de Parkinson.

A invenção presente será mais bem compreendida recorrendo ao complemento da especificação que se seguirá,

que se refere a exemplos não limitativos ilustrando a obtenção de péptidos capazes de se fixar sobre a *Engrailed*, e de modular a sua actividade.

EXEMPLO 1 : OBTENÇÃO DE PÉPTIDOS CAPAZES DE MODULAR A ACTIVIDADE DA *ENGRAILED*

1) Sistema de teste da actividade da *Engrailed*

Avalia-se a actividade transcricional da *Engrailed* tal como foi descrito por MONTESINOS et al. (J. Neurosci., 21, 3350-9, 2001), pela medição da expressão do gene de reporte da luciferase colocado no plasmídeo pMAP-luc sob o controlo de um promotor alvo da *Engrailed*, o promotor *MAP1B* (proteína 1B associada a microtúbulos).

Colocam-se em cultura células da linhagem neuroepitelial CHP 100 (SCHLESINGER et al., Cancer Res. 36, 3904-3100, 1976), em meio RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) com adição de glucose 16 mM, soro fetal bovino a 15%, 5U/mL de penicilina e 5 µg/mL de estreptomicina, e co-transfectadas por electroporação com pMAP-luc e com um dos vectores seguintes:

pCL9mEn2 (MAINGUY et al., Nat Biotechnol. 18: 746-749, 2000), que contém a sequência que codifica para a proteína *Engrailed-2* de frango inteira, sob controlo do promotor CMV ;

pCL9mEn2AH1 (JOLIOT et al., Curr Biol. 8 : 856-863, 1998), que contém a sequência de codificação para a proteína *Engrailed-2* de frango, na qual foram retirados os aminoácidos 36 a 46 do homeodomínio (sequência que permite a ligação ao ADN), sob o controlo do promotor CMV;

pCL9mHDEn2C, que contém a sequência que codifica para a proteína *Engrailed-2* de frango, à qual foram retirados aminoácidos 10 a 185, sob o controlo do promotor CMV;

A electroporação é efectuada com 10 pg de ADN plasmídico no máximo (2 µg de plasmídeo de reporte pMAP-luc + quantidades variáveis de vector de expressão de En2) de para 8×10^5 células em 350 µL de meio, a 1050 pF e 260 mV. Adiciona-se em seguida 400 µL de meio e deixa-se repousar durante 10 min. Colocam-se então as células em cultura, após uma lavagem, em duas caixas (com diâmetro de 3,5 cm).

Doseia-se a actividade da luciferase 24 horas depois da transfecção. Lavam-se as células com PBS. Adiciona-se às células tampão de lise (Tris/H₃PO₄ pH 7,8 20 mM, MgCl₂ 10 mM, glicerol a 15%, EDTA 1 mM, Triton-X 100 a 1%, ATP 1,25 mM, luciferina a 10 µg/mL). Depois da incubação durante 30 min a 4°C, leva-se a cabo a medição da actividade da luciferase por luminometria (luminómetro Lumat LB 9501 Berthold).

Os resultados estão ilustrados nas figuras 2A e 2B.

A Figura 2A mostra que a proteína *Engrailed-2* (En2) é capaz de activar a expressão do promotor *MAP1B* de um modo dependente da dose. A Figura 2B mostra que essa activação necessita de uma ligação do homeodomínio ao promotor. Este não é com efeito activado pela proteína recombinante EN2ΔH1.

O promotor *MAP1B* também é activado por uma outra proteína com homeodomínio, a HOXA5.

2) Selecção de péptidos capazes de se fixarem à *Engrailed*.

Pesquisaram-se péptidos que se ligam especificamente à *Engrailed* por despiste utilizando um banco de fagos (PhD-12, New England Biolabs) expressando na sua superfície péptidos aleatórios com 12 aminoácidos.

Obtiveram-se dessa forma diversos péptidos capazes de se fixarem sobre a *Engrailed*.

Os dois péptidos mais representados são o SWWETQLIASSG (Pep1; SEQ ID N°: 1) e WSWNEEVWFPFT (Pep2; SEQ ID N°: 2). Escolheram-se estes péptidos para testar o seu efeito sobre a actividade transcricional da *Engrailed*. Ilustram-se as sequências desses péptidos pela figura 1.

As sequências que codificam para Pep1 ou para Pep2 foram colocadas no vector pCS2+ (TURNER e WEINTRAUB, Genes and Development. 8: 1311-1323, 1994), para se obterem respectivamente os vectores de expressão pCS2-pep1 e pCS2-pep2.

3) Teste do efeito dos péptidos seleccionados sobre a actividade da *Engrailed* nas células CHP100.

As células CHP100 são co-transfectadas por electroporação, tal como descrito adiante neste documento, com pMAP-luc (2 µg), com pCL9mEn2 ou com pCL9mHDEn2C (4 µg) e com 4 µg de pCS2-pep1 ou de pCS2-pep2.

A Figura 3A mostra que quando o péptido 1 é introduzido nas células ao mesmo tempo que a *Engrailed* (pep1+En2), a activação do *MAP1B* é aumentada em cerca de 50%. O péptido por si só não tem acção sobre esse promotor (pep1). O promotor *MAP1B* não é activo por si próprio nesse tipo celular (*map1b*).

A Figura 3B mostra que o péptido HDEn2C (constituído principalmente pelo homeodomínio da *Engrailed*) não activa senão fracamente o promotor *MAP1B* (HDEn2C), e que essa activação é fortemente aumentada pelo péptido 1 (HDEn2C+pep1).

A Figura 4A mostra que o péptido 2, que não tem

efeito por ele próprio sobre *MAP1B* (pep2), é inibidor da activação de *MAP1B* pela *Engrailed* (pep2+En2), e pelo contrário, aumenta a activação da *MAP1B* pelo péptido HDEn2C (HDEn2C+pep2).

A Figura 4B mostra que um péptido de controlo (aOTX2) da sequência KVWDIRYTTPHA (SEQ ID N°: 3) e que se fixa especificamente à homeoproteína OTX2 não modifica a activação de *MAP1B* pela *Engrailed* (aOTX2+En2).

O efeito do péptido aOTX2 e o da *Engrailed* são puramente aditivos.

4) Teste do efeito dos péptidos seleccionados sobre a actividade da *Engrailed* nas culturas primárias de neurónios do mesencéfalo.

Com a finalidade de verificar a funcionalidade dos péptidos 1 e 2 num contexto celular fisiológico, o efeito desses péptidos foi testado nas culturas primárias de neurónios do mesencéfalo de embrião de murganho.

Incubam-se fragmentos do mesencéfalo de murganho (do dia embrionário 13,5) durante 5 min. a 24°C em tripsina-EDTA, e depois lavam-se com um tampão fosfato de pH 7,5 ao qual se adicionou glucose 33 mM, (PBS) e 10 % de soro fetal bovino, e em seguida incubam-se durante 10 min. a 37°C em DnaseI (Sigma, Saint Louis, MO) a 30 µM/mL. Dissociam-se as células mecanicamente, lavam-se por três

vezes com o PBS, e colocam-se em cultura, à densidade celular de 200.000 células/cm², em poços anteriormente saturados com D,L-poliornitina (a 1,5 µg/mL) e com laminina (a 5 µg/mL). O meio de cultura (MMS) é constituído por DMEM/F12 (a 1/1, Life Technologies, Cergy, France), 33 mM em glucose, 2 mM em glutamina, 10 mM em HEPES, pH 7,4, 9 mM em NaHCO₃, contendo 5 U/mL de penicilina e 5 µg/mL de estreptomicina. Adicionam-se ao MSS 0,1 % de ovalbumina, 25 µg/mL de insulina, 100 µg/mL de transferrina, torna-se 20 nM em progesterona, 60 µM em putrescina e 30 nM em selénio (M20V).

No dia seguinte ao da colocação em cultura, o meio é substituído, em cada poço, por 600 µL de MSS, sem penicilina nem estreptomicina. Adiciona-se a cada poço 100 µL da mistura de transfecção que inclui pMAP-luc (0,5 µg) e 0,5 µg de pCS2-pep1 ou de pCS2-pep2, bem como 1 mg/ml de LIPOFECTAMINE 2000 (Invitrogen), em meio OPTI-MEM (qbp 100 µL), previamente misturados durante 20 min a 24°C. Incubam-se então as células durante 2 horas e meia a 37°C. Em seguida o meio é substituído por M20V.

Ilustram-se os resultados na Figura 5.

Estes resultados mostram que o promotor *MAP1B* é activado nesses neurónios (*map1b*), e que essa activação é aumentada pelo péptido 1 (*map1b+pep1*), bem como pelo péptido 2 (*map1b+pep2*), aparecendo o efeito activante do péptido 2, neste contexto, como sendo mais importante do

que o do péptido 1.

EXEMPLO 2: EFEITO DOS PÉPTIDOS PEP-1 e PEP-2 IN VIVO.

O efeito de pep1 ou de pep2 sobre a actividade transcricional da *Engrailed* foi avaliado através da medição da expressão do gene de reporte da β -galactosidase colocado no plasmídeo pMAP-lacZ (descrito por MONTESINOS et al., 2001, citado acima) sob o controle do promotor *MAP1B* no tubo neural de embriões de frango no estado HH8-HH10.

Os vectores pCS2-pep1 ou pCS2-pep2, bem como o vector pMAP-lacZ (cada um dos vectores é utilizado a uma concentração de 1 μ g/ μ L) foram introduzidos no tubo neural de embriões de frango no estado HH8-HH10 por electroporação, de acordo com o protocolo de MURAMATSU et al. (1997), com um electroporador BTX, ECM 830 (4 pulsos de 25 V e 50 msec.) (Genetronics, San Diego, CA). Injectaram-se os vectores no tubo neural por intermédio de uma micropipeta. Passadas 24 h de incubação a 37°C, fixaram-se os embriões e revelou-se a actividade de β -galactosidase, tal como foi descrito por HOGAN et al., (Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1994).

Os resultados estão ilustrados na Figura 6 (A-C):

A figura 6A (pMap-LacZ) mostra que o promotor

MAP1B é activado *in vivo* na região mensencefálica correspondente à expressão normal da *Engrailed*. Essa expressão está confinada às regiões ventrais que são as únicas acessíveis aos plasmídeos pela técnica de electroporação no tubo nervoso.

A figura 6B (pMap-LacZ + pCS2-Pep1) mostra que essa activação é aumentada pelo péptido 1. A marcação parece também ser mais extensa.

A Figura 6C (pMap-LacZ + pCS2-Pep2) mostra que o péptido 2 aumenta também a actividade de *MAP1B*.

LISTAGEM DA SEQUÊNCIA

<110> CENTRO NACIONAL DA INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
UNIVERSIDADE DE PARIS 13

PROCHIA NTZ, Alain
LES AFFRE, Brigitte
VOLOVITCH, Michel
SONNIER, Laure

<120> PÉPTIDOS MODULADORES DA ACTIVIDADE DO
FACTOR DE TRANSCRIÇÃO *ENGRAILED*

<130> MJPbv644/01

<150> 03 06023

<151> 2003-05-20

<160> 3

<170> Patente na versão 3.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> péptido

<400> 1

Ser	Trp	Trp	Glu	Thr	Gln	Leu	Ile	Ala	Ser	Ser	Gly
1				5					10		

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> péptido

<400> 2

Trp	Ser	Trp	Asn	Glu	Glu	Val	Trp	Phe	Pro	Phe	Thr
1					5					10	

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> péptido

<400> 3

Lys	Val	Trp	Asp	Ile	Arg	Tyr	Thr	Thr	Pro	His	Ala
1				5						10	

Lisboa, 13 de Dezembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido capaz de se fixar ao factor de transcrição *Engrailed*, seleccionado de entre:

- o péptido com a sequência SWWETQLIASSG;
- o péptido com a sequência WSWNEEVWFPFT.

2. Composição contendo um péptido de acordo com a reivindicação 1, associado a um péptido que inclua um domínio transdutor.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por o péptido transdutor referido ser uma penetratina.

4. Composição de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo péptido transdutor referido ser a proteína *Engrailed*, ou um fragmento dessa proteína que contenha pelo menos o seu homeodomínio.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizada pelo facto de ela ser constituída por um polipéptido quimérico.

6. Polinucleótido seleccionado de entre:

-um polinucleótido codificando para um péptido de acordo com a reivindicação 1;

-um polinucleótido codificando para um polipéptido quimérico tal como se definiu na reivindicação 5.

7. Utilização de um péptido de acordo com a reivindicação 1, composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, ou polinucleótido de acordo com a reivindicação 6, para regular *in vitro* a actividade do factor de transcrição *Engrailed* numa célula viva.

8. Péptido de acordo com a reivindicação 1, composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, ou polinucleótido de acordo com a reivindicação 6, para utilização como medicamento.

Lisboa, 13 de Dezembro de 2006

1/6

Péptido 1 (pep1) :

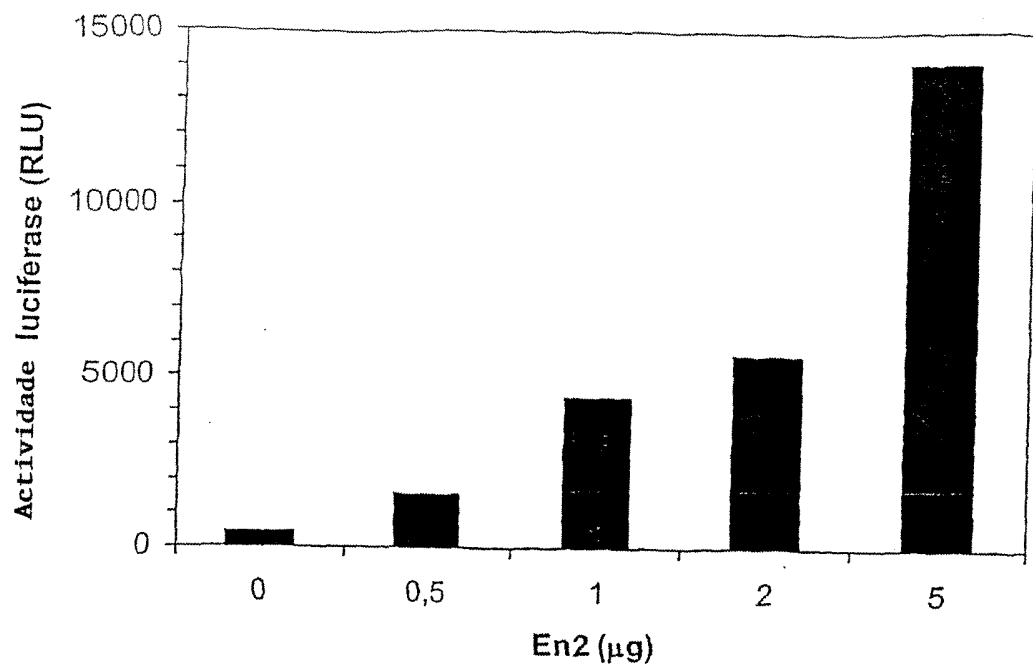
SWWETQLIASSG

Péptido 2 (pep2) :

WSWNEEVWFPFT

Figura 1

A



B

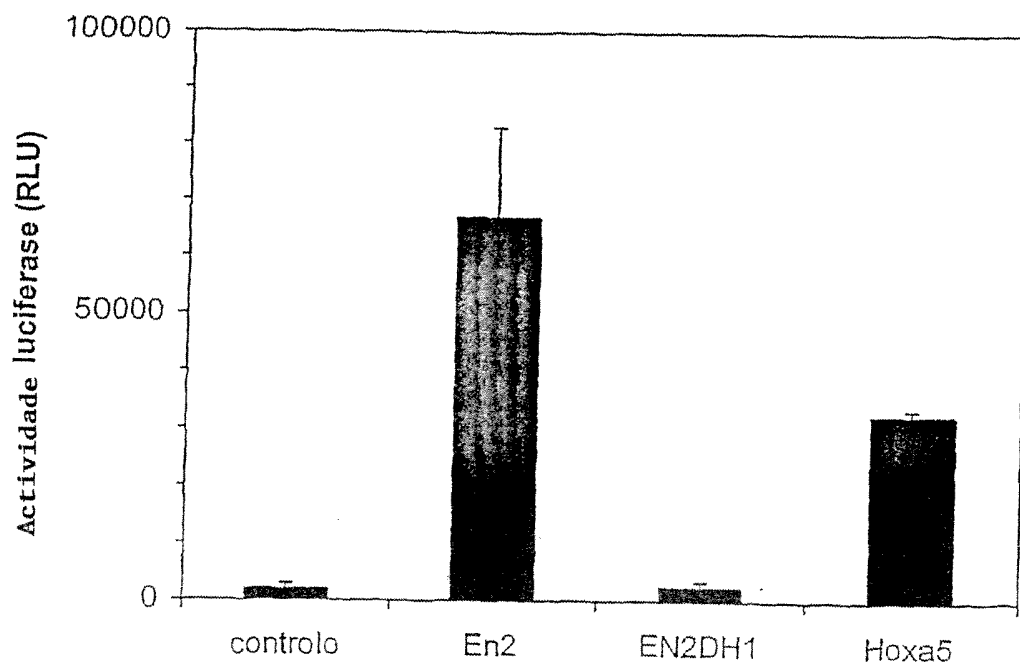
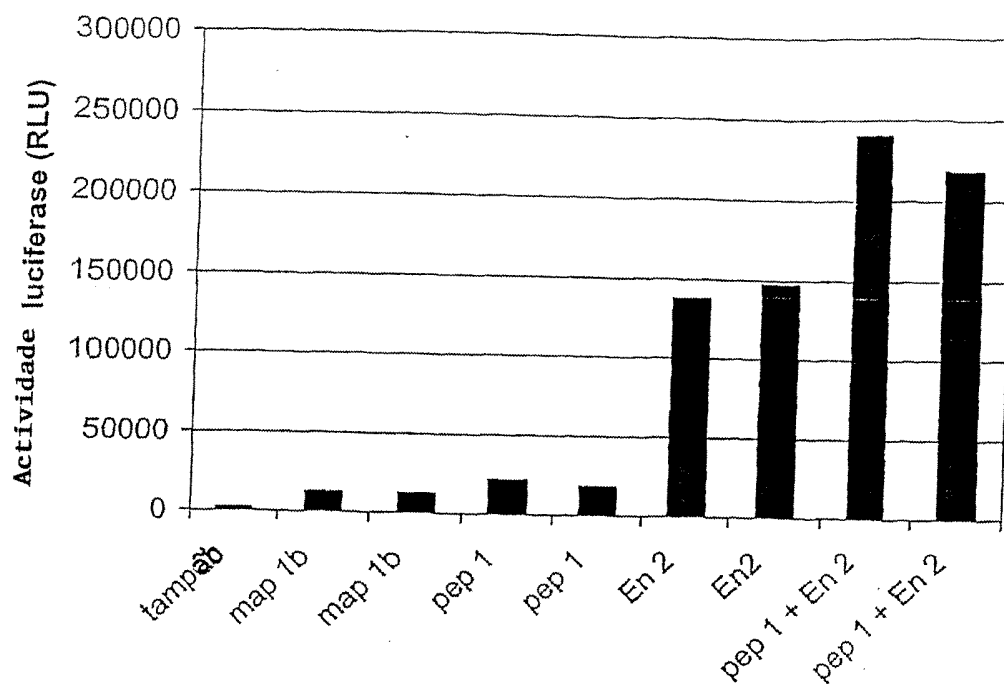


Figura 2

A



B

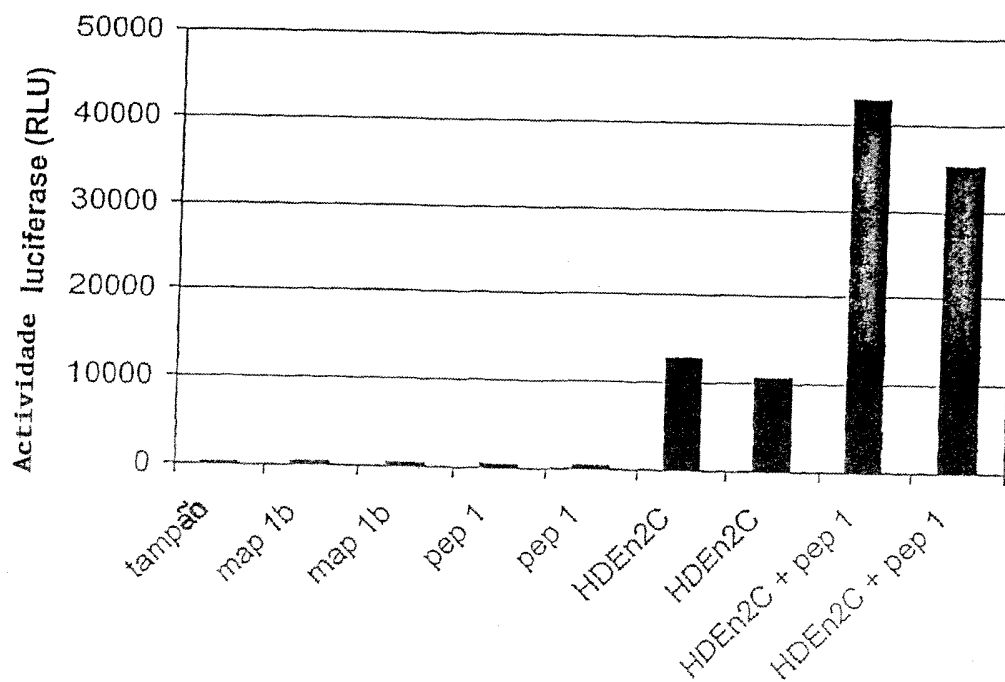
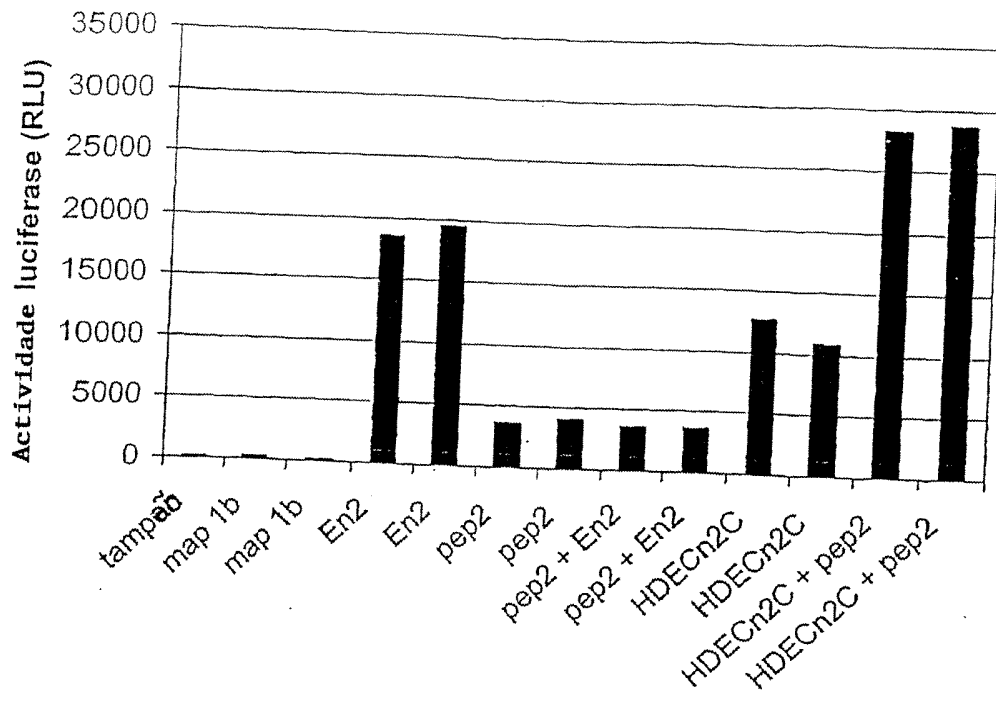


Figura 3

A



B

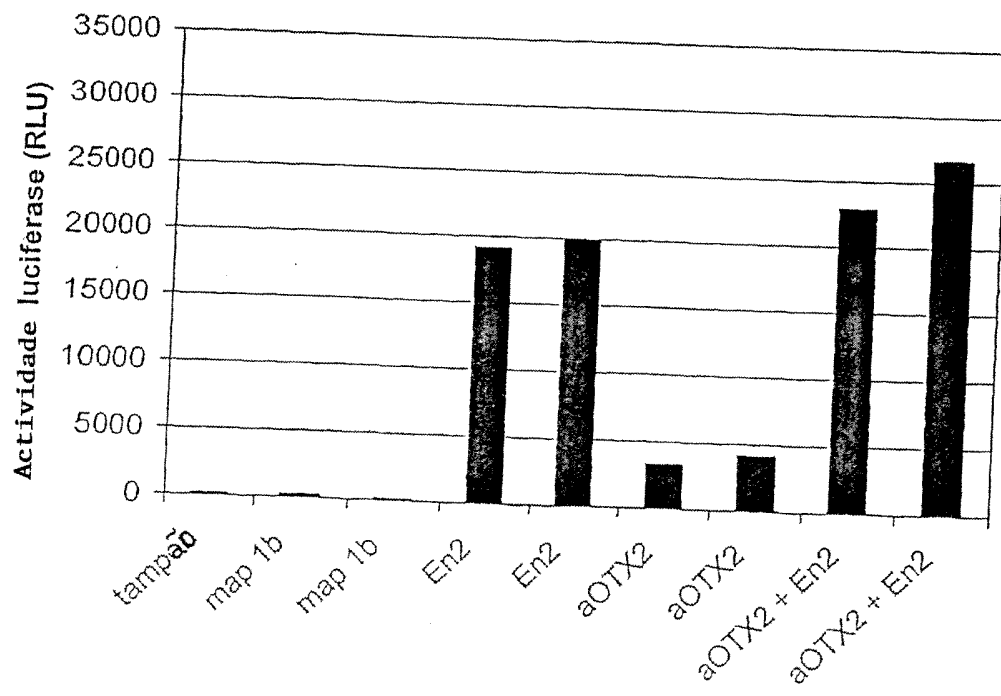


Figura 4

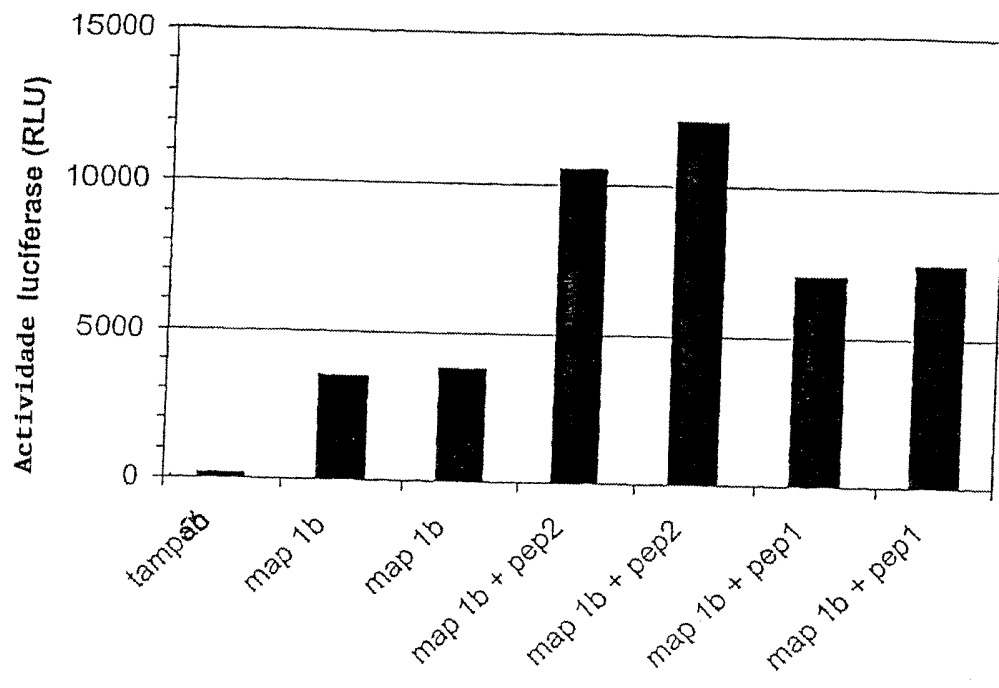


Figura 5

A



B



C



Figura 6