



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 277**

51 Int. Cl.:
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **04742777 .8**
86 Fecha de presentación : **19.05.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1625152**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2006**

54 Título: **Péptidos moduladores de la actividad del factor de transcripción Engrailed.**

30 Prioridad: **20.05.2003 FR 03 06023**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR
Ecole Normale Supérieure y
Université Paris 13**

72 Inventor/es: **Prochiantz, Alain;
Lesaffre, Brigitte;
Volovitch, Michel y
Sonnier, Laure**

74 Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos moduladores de la actividad del factor de transcripción Engrailed.

La invención se refiere a péptidos capaces de modificar la actividad de factores de transcripción “Engrailed”.

Las proteínas Engrailed son factores de transcripción de la clase de proteínas con homeodominio. Los mamíferos poseen dos homólogos de Engrailed: Engrailed-1 y Engrailed-2; estas dos proteínas, que tienen una actividad similar, se denominarán de forma colectiva en lo sucesivo con el término general Engrailed (EN).

En los neonatos y en los adultos, EN se expresa en las neuronas dopaminérgicas (DA) de la sustancia negra (que degeneran en la enfermedad de Parkinson) y los núcleos del rafe y del locus cerúleo que juegan un papel importante en la regulación del humor y en el establecimiento de los comportamientos adictivos.

Se ha demostrado (SIMON y col. J Neurosci. 21 (9):3126-34, 2001) que la pérdida de de EN en el transcurso del desarrollo es seguida bastante rápidamente por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, y que una de las dianas transcripcionales de EN es la alfa-sinucleína, cuya conexión genética con ciertas formas familiares de la enfermedad de Parkinson se ha demostrado (POLYMERPOULOS y col., Science. 276, 2045-7, 1997), y que constituirá un regulador negativo de la transmisión dopaminérgica (ABELIOVICH y col., Neuron, 25, 239-52, 2000).

El conjunto de estas observaciones sugiere fuertemente la implicación de Engrailed en las patologías neurodegenerativas, y particularmente en las patologías que afectan a las neuronas dopaminérgicas, tales como la enfermedad de Parkinson. Su expresión en las neuronas del rafe y del locus cerúleo suscita la hipótesis de una implicación en otras patologías como los trastornos del humor y de la adicción.

Así pues, parece particularmente deseable disponer de moduladores de la actividad de Engrailed.

Se ha investigado si existían péptidos capaces de modular la actividad de Engrailed mediante fijación a la proteína. De esta manera se han identificado dos péptidos que se fijan a Engrailed, y pueden modular de manera específica su actividad, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Estos péptidos: SWWETQLIASSG (péptido 1; SEC ID N°: 1) y WSWNEEVWFPFT (Péptido 2; SEC ID N°: 2) se representan en la figura 1.

En las células transformadas que sobreexpresan Engrailed, el péptido 1 tiene un efecto activador, mientras que el péptido 2 tiene un efecto inhibidor. En un contexto fisiológico, los dos péptidos tienen un efecto activador. En otro se ha constatado que estos péptidos confieren propiedades de activación al homeodominio de Engrailed que, por sí mismo, no posee estas propiedades.

La presente invención tiene por objeto un péptido capaz de fijarse al factor de transcripción Engrailed, y de regular la actividad de dicho factor de transcripción, elegido entre los péptidos de secuencias SWWETQLIASSG y WSWNEEVWFPFT.

La presente invención tiene también por objeto la utilización de un péptido de acuerdo con la invención para regular *in vitro* la actividad del factor de transcripción Engrailed en una célula viva.

Para la puesta en práctica de la presente invención, dicho péptido puede introducirse en la célula de diferentes maneras.

Ventajosamente, puede asociarse a un péptido que comprende un dominio transductor.

Con la expresión “dominio transductor” se designa una secuencia peptídica capaz de penetrar al interior de una célula viva, independientemente de la presencia de transportadores o de receptores específicos, y capaz de importar dentro de dicha célula moléculas o complejos moleculares de naturaleza variada (ácidos nucleicos, proteínas, péptidos/ácidos nucleicos, análogos de nucleótidos, liposomas), denominados normalmente con el término general de “cargos”.

Se conocen péptidos transductores por sí mismos de diferentes tipos. Para una revisión véase por ejemplo LIDGREN y col., TIPS, 21, 99-102, (2000); SCHWARZE y DOWDY TIPS, 21, 45-48, (2000); SCHWARZE y col., 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 acuerdo con una realización preferida de la presente invención, puede asociarse un péptido regulador de acuerdo con la invención a un péptido que comprende un dominio transductor de tipo penetratina, derivado de la tercera hélice de un homeodominio; los péptidos de la familia de las penetratinas se describen por ejemplo en las publicaciones de JOLIOT y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1864-1868, (1991); DEROSI y col. J. Biol. Chem., 269, 14, 10444-10450, (1994); BRUGIDOU y col. Biophys. Biochem. Res. Com., 214, 685-693, (1995), así como en la Patente de

Estados Unidos 5888762, la Patente de Estados Unidos 6080724, o la Solicitud PCT WO 00/01417 o la Solicitud PCT WO 00/29427.

La presente invención también tiene por objeto una composición que comprende un péptido regulador de acuerdo con la invención asociado a un péptido que comprende un dominio transductor, preferiblemente un dominio transductor de tipo penetratina.

De acuerdo con una realización preferida de una composición de acuerdo con la invención, el péptido regulador de acuerdo con la invención se asocia a Engrailed, o a un fragmento de Engrailed que comprende al menos su homeodominio.

La asociación entre estos péptidos puede realizarse mediante enlace covalente, como se describe en los documentos mencionados anteriormente, o bien mediante enlace no covalente, como se describe en la Solicitud FR 03/00093.

La presente invención también abarca todo polipéptido quimérico que comprende un péptido de acuerdo con la invención fusionado a un péptido heterólogo. De acuerdo con una realización particular de la presente invención, dicho péptido heterólogo comprende al menos un dominio transductor, preferiblemente un dominio transductor de tipo penetratina. De acuerdo con una realización preferida de un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención, se trata de un factor de transcripción quimérico, que comprende un péptido de acuerdo con la invención fusionado a un fragmento de Engrailed que comprende al menos su homeodominio.

La presente invención también tiene por objeto un polinucleótido elegido entre:

- un polinucleótido que codifica un péptido regulador de acuerdo con la invención.
- un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención.

La presente invención también abarca un vector recombinante que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención.

La presente invención también abarca una composición que comprende un polinucleótido que codifica un péptido regulador de acuerdo con la invención y un polinucleótido que codifica un péptido heterólogo, particularmente un péptido que comprende un dominio transductor, preferiblemente un dominio transductor de tipo penetratina. Una composición de acuerdo con la invención puede por ejemplo comprender un vector recombinante que comprende una secuencia que codifica un péptido regulador de acuerdo con la invención, y una secuencia que codifica dicho péptido heterólogo, pudiendo las dos secuencias ser o no adyacentes. Como alternativa, una composición de acuerdo con la invención puede comprender dos vectores diferentes, uno que lleva una secuencia que codifica un péptido regulador de acuerdo con la invención, y otro que lleva una secuencia que codifica el péptido heterólogo.

Los vectores que comprenden un polinucleótido de acuerdo con la invención pueden utilizarse, si se desea, para introducir y expresar este polinucleótido en la célula en la que se desea regular la expresión de Engrailed.

Con este fin se pueden emplear los vectores utilizados habitualmente para expresar un gen de interés en células animales, por ejemplo vectores virales. Ventajosamente, se puede utilizar como vector un bacteriófago sobre el que se adsorbe un péptido transductor, tal como los descritos en la Solicitud FR 03/00093.

La presente invención también tiene por objeto la utilización de un péptido, de un polinucleótido, o de una composición tales como las que se han definido anteriormente, para la obtención de un medicamento, utilizable particularmente en el ámbito del tratamiento de patologías del sistema nervioso, por ejemplo patologías degenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson.

La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos no limitantes que ilustran la obtención de péptidos capaces de fijarse a Engrailed, y de modular su actividad.

Ejemplo 1

Obtención de péptidos capaces de modular la actividad de Engrailed

1) Sistema de ensayo de la actividad de Engrailed

La actividad transcripcional de Engrailed se evalúa como se describe por MONTESINOS y col. (J. Neurosci., 21, 3350-9, 2001), por medio de la expresión de un gen informador de luciferasa situado en el plásmido pMAP-luc bajo el control de un promotor diana de Engrailed, el promotor *MAP1B* (proteína asociada a microtúbulos 1B).

Las células de la línea neuroepitelial CHP 100 (SCHLESINGER y col, Cancer Res. 36, 3904-3100, 1976) se cultivan en RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) con adición de glucosa 16 mM, suero fetal bovino al 15%, 5 U/ml de penicilina y 5 µg/ml de estreptomina, y se co-transfectan mediante electroporación con pMAC-luc y uno de los siguientes vectores:

ES 2 273 277 T3

pCL9mEn2 (MAINGUY y col., Nat Biotechnol. 18: 746-749, 2000) que contiene la secuencia que codifica la proteína Engrailed-2 de pollo completa, bajo el control del promotor CMV;

pCL9mEn2ΔH1 (JOLIOT y col., Curr Biol. 8: 856-863, 1998), que contiene la secuencia que codifica la proteína Engrailed-2 de pollo, con los ácidos aminados 36 a 34 del homeodominio delecionados (secuencia que permite la unión al ADN), bajo el control del promotor CMV;

pCL9mHDEn2C, que contiene la secuencia que codifica la proteína Engrailed-2 de pollo, con los ácidos aminados 10 a 185 delecionados, bajo el control del promotor CMV;

La electroporación se realiza con 10 pg de ADN del plásmido al máximo (2 μg de plásmido informador pMAP-luc + cantidades variables del vector de expresión de En2) de 8 x 10⁵ células en 350 μl de medio, a 1050 pF y 250 mV. Se añaden después 400 μl de medio y se deja reposar 10 min. Las células se cultivan entonces, después de un lavado, en dos placas (3,5 cm de diámetro).

La actividad luciferasa se dosifica 24 horas después de la transfección. Las células se aclaran con PBS. Se añade a las células tampón de lisis (Tris/H₃PO₄ 20 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, glicerol al 15%, EDTA 1 mM, Triton-X 100 al 1%, ATP 1,25 mM, luciferina 10 μg/ml). Después de incubar 30 min. a 4°C, se realiza la medida de la actividad luciferasa por luminometría (luminómetro Lumat LB 9501 Berthold).

Los resultados se ilustran mediante las Figuras 2A y 2B.

La Figura 2A muestra que la proteína Engrailed-2 (En2) es capaz de activar la expresión del promotor *MAP1B* de manera dependiente de la dosis. La Figura 2B muestra que esta activación necesita la unión del homeodominio al promotor. Este no se activa, efectivamente por la proteína recombinante EN2ΔH1.

El promotor *MAP1B* también se activa mediante otra proteína del homeodominio, HOXA5.

2) Selección de péptidos capaces de fijarse a Engrailed

Se seleccionan los péptidos que se unen específicamente a Engrailed mediante cribado de un banco de fagos (PhD-12 New England Biolabs) que expresan en su superficie péptidos aleatorios de 12 ácidos aminados. De este modo se obtienen varios péptidos capaces de fijarse a Engrailed.

Los dos péptidos más representativos son SWWETQLIASSG (Pep1; SEC ID N°: 1) y WSWNEEVWFPFT (Pep2; SEC ID N°: 2). Esos péptidos se han elegido para ensayar su efecto sobre la actividad transcripcional de Engrailed. Las secuencias de estos péptidos se ilustran mediante la figura 1.

Las secuencias que codifican Pep1 o Pep2 se colocan en el vector pCS2+ (TURNER y WEINTRAUB, Genes and Development. 8: 1311-1323, 1994), para dar respectivamente los vectores de expresión pCS2-pep1 y pCS2-pep2.

3) Ensayo del efecto de los péptidos seleccionados sobre la actividad de Engrailed en células CHP100

Las células CHP100 se co-transfectan mediante electroporación, como se ha descrito anteriormente, con pMAP-luc (2 μg), pCL9mEn2 o pCL9HDEn2C (4 μg) y 4 μg de pCS2-pep1 o pCS2-pep2.

La Figura 3A muestra que cuando el péptido 1 se introduce en las células al mismo tiempo que Engrailed (pep1 + En2), la activación de *MAP1B* aumenta aproximadamente el 50%. El péptido en solitario no tiene efecto sobre este promotor (pep1). El promotor *MAP1B* no es activo por sí mismo en este tipo celular (map1b).

La Figura 3B muestra que el péptido HDEn2C (constituido principalmente por el homeodominio de Engrailed) sólo activa débilmente el promotor *MAP1B* (HDEn2C), y que esta activación aumenta fuertemente mediante el péptido 1 (HDEn2C + pep1).

La Figura 4A muestra que el péptido 2, que no tiene efecto por sí mismo sobre *MAP1B* (pep2), es inhibidor de la activación de *MAP1B* por Engrailed (pep2 + En2), y por el contrario, aumenta la activación de *MAP1B* por el péptido HDEn2C (HDEn2C + pep2).

La Figura 4B muestra que un péptido de control (aOTX2) de secuencia KVWDIRYTTPHA (SEC ID N°: 3) que se fija de forma específica a la homeoproteína OTX2 no modifica la activación de *MAP1B* por Engrailed (aOTX2 + En2). El efecto del péptido aOTX2 y el de Engrailed son puramente aditivos.

4) Ensayo del efecto de los péptidos seleccionados sobre la actividad de Engrailed en cultivos primarios de neuronas de mesencéfalo

Para verificar la funcionalidad de los péptidos 1 y 2 en un contexto celular fisiológico, se ensaya el efecto de estos péptidos en cultivos primarios de neuronas de mesencéfalo de embrión de ratón.

Se incuban fragmentos de mesencéfalo de ratón (embrión de 13,5 días) 5 min. a 24°C en tripsina-EDTA, después se lavan en un tampón fosfato pH 7,5 con la adición de glucosa 33 mM (PBS) y suero fetal bovino al 10%, y se incuban después 10 min. a 37°C en 30 μ M/ml de DnaseI (Sigma, Saint Louis, MO). Las células se disocian mecánicamente, se lavan tres veces con PBS y se cultivan a una densidad de 200.000 células/cm², en pocillos previamente saturados con D,L-poliornitina (1,5 μ g/ml) y laminina (5 μ g/ml). El medio de cultivo (MMS) está constituido por DMEM/F12 (1/1, Life Technologies, Cergy, Francia), con glucosa 33 mM, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, NaHCO₃ 9 mM, 5 U/ml de penicilina y 5 μ g/ml de estreptomycin. Al MSS se le añaden ovoalbúmina al 0,1%, 25 μ g/ml de insulina, 100 μ g/ml de transferrina, 20 nM de progesterona, putrescina 60 μ M y selenio 20 nM (M20V).

Al día siguiente del inicio del cultivo, en cada pocillo, el medio se reemplaza por 600 μ l de MSS sin penicilina ni estreptomycin. Se añade a cada pocillo 100 μ l de mezcla de transfección que comprende pMAP-luc (0,5 μ g) y 0,5 μ g de pCS2-pep1 o pCS2-pep2, y 1 mg/ml de LIPOFECTAMINE 2000 (Invitrogen) en medio OPTI-MEM (qsp 100 μ l), previamente mezclados durante 20 min. a 24°C. Las células se incuban entonces 2 horas 30 min. a 37°C. Después se reemplaza el medio por M20V.

Los resultados se ilustran mediante la Figura 5.

Estos resultados muestran que el promotor *MAP1B* se activa en las neuronas (map1b), y que esta activación aumenta mediante el péptido 1 (map1b + pep1) así como mediante el péptido 2 (map1b + pep2), el efecto activador del péptido 2 aparece, en este contexto, más importante que el del péptido 1.

Ejemplo 2

Efecto in vivo de los péptidos pep-1 y pep-2

El efecto de pep1 o pep2 sobre la actividad transcripcional de Engrailed se ha evaluado mediante la medida de la expresión del gen informador de β -galactosidasa situado en el plásmido pMAP-lacZ (descrito por MONTESINOS y col., 2001, mencionado anteriormente) bajo el control del promotor *MAP1B* en el tubo neural de embriones de pollo en la etapa HH8-HH10.

Los vectores pCS2-pep1 o pCS2-pep2, así como el vector pMAP-lacZ (cada vector se utiliza a una concentración de 1 μ g/ μ l) se introducen mediante electroporación en el tubo neural de embriones de pollo en la etapa HH8-HH10 de acuerdo con el protocolo de MURAMATSU y col. (1997), con un electroporador BTX, ECM 830 (4 pulsos de 25 V y 50 mseg.) (Genetronics, San Diego, CA). Los vectores se inyectan en el tubo neural gracias a una micropipeta. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se fijan los embriones y se revela la actividad β -galactosidasa, como se ha descrito por HOGAN y col, (Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1994).

Los resultados se ilustran mediante la Figura 6 (A-C):

La Figura 6A (pMap-LacZ) muestra que el promotor *MAP1B* se activa *in vivo* en la región mesencefálica correspondiente a la expresión normal de Engrailed. Esta expresión se limita a las regiones ventrales que sólo son accesibles a los plásmidos debido a la técnica de electroporación en el tubo nervioso.

La Figura 6B (pMap-LacZ + pCS2-Pep1) muestra que esta activación aumenta por el péptido 1. La marca parece también más extendida.

La Figura 6C (pMap-LacZ + pCS2-Pep2) muestra que el péptido 2 también aumenta la activación de *MAP1B*.

REIVINDICACIONES

1. Péptido capaz de fijarse al factor de transcripción Engrailed elegido entre:

- el péptido de secuencia SWWETQLIASSG;
- el péptido de secuencia WSWNEEVWFPFT.

2. Composición que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, asociado a un péptido que comprende un dominio transductor.

3. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** porque dicho péptido transductor es una pene-
tratina.

4. Composición de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada** porque dicho péptido transductor es la proteína Engrailed, o un fragmento de la misma que comprende al menos su homeodominio.

5. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada** porque está constituida por un polipéptido quimérico.

6. Polinucleótido elegido entre:

- un polinucleótido que codifica un péptido de acuerdo con la reivindicación 1;
- un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico como se define en la reivindicación 5.

7. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, o de un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 para regular *in vitro* la actividad del factor de transcripción Engrailed en una célula viva.

8. Péptido de acuerdo con la reivindicación 1, composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, o polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 para uso como medicamento.

Peptide 1 (pep1) :

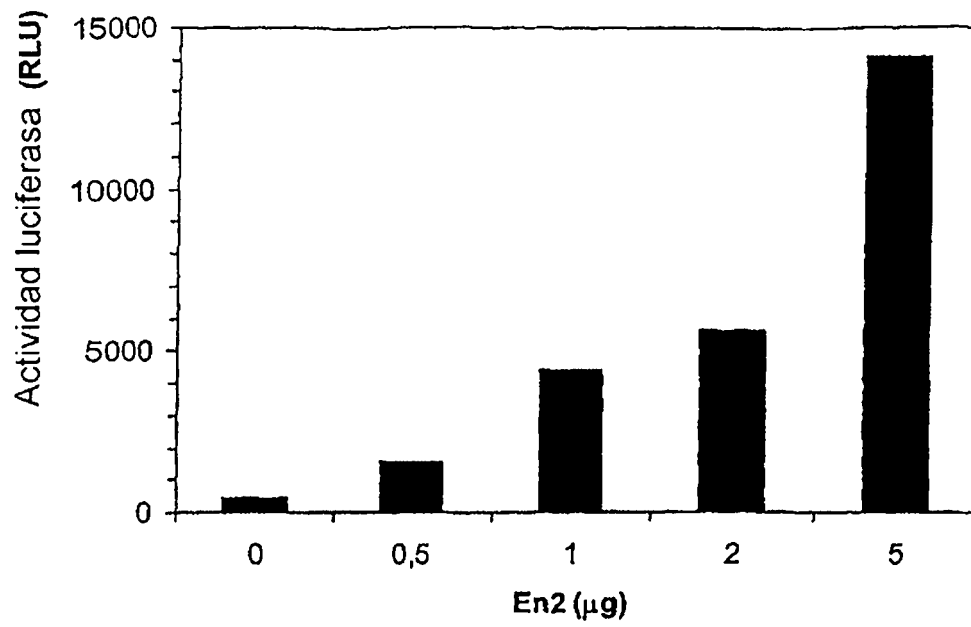
SWWETQLIASSG

Peptide 2 (pep2) :

WSWNEEVWFPFT

FIGURA 1

A



B

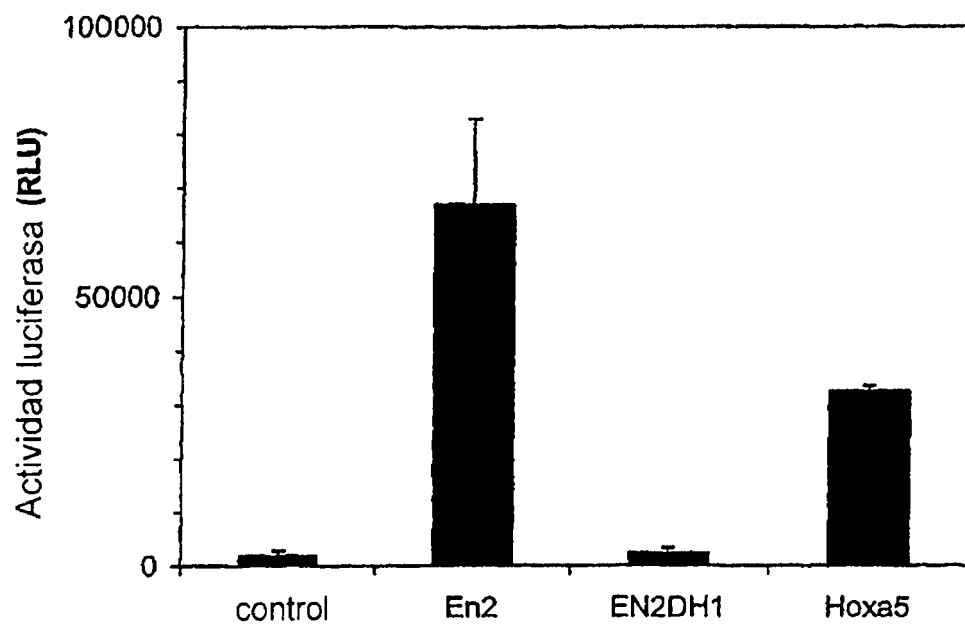
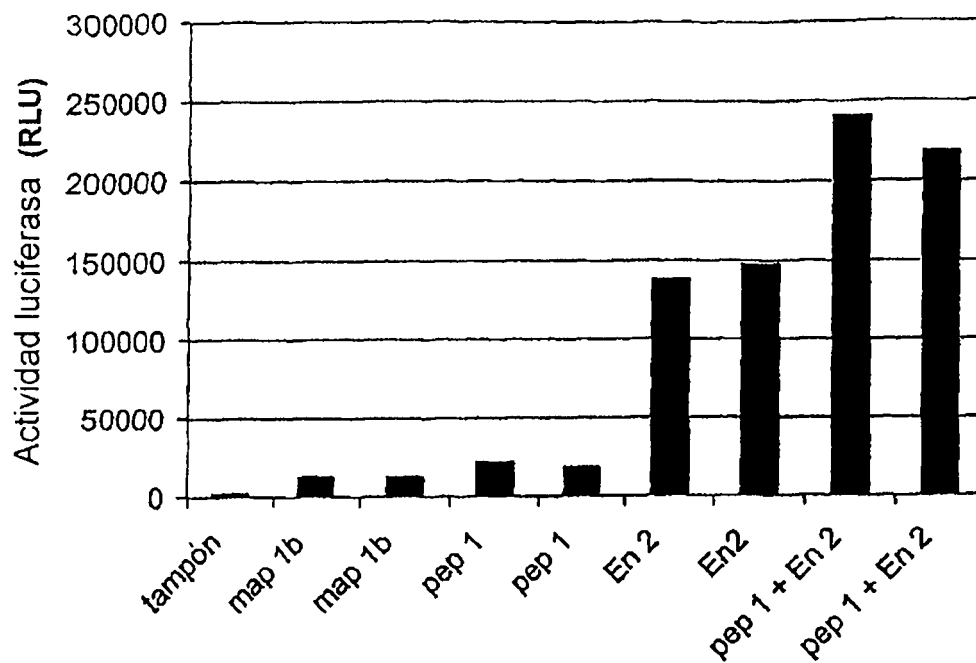


Figura 2

A



B

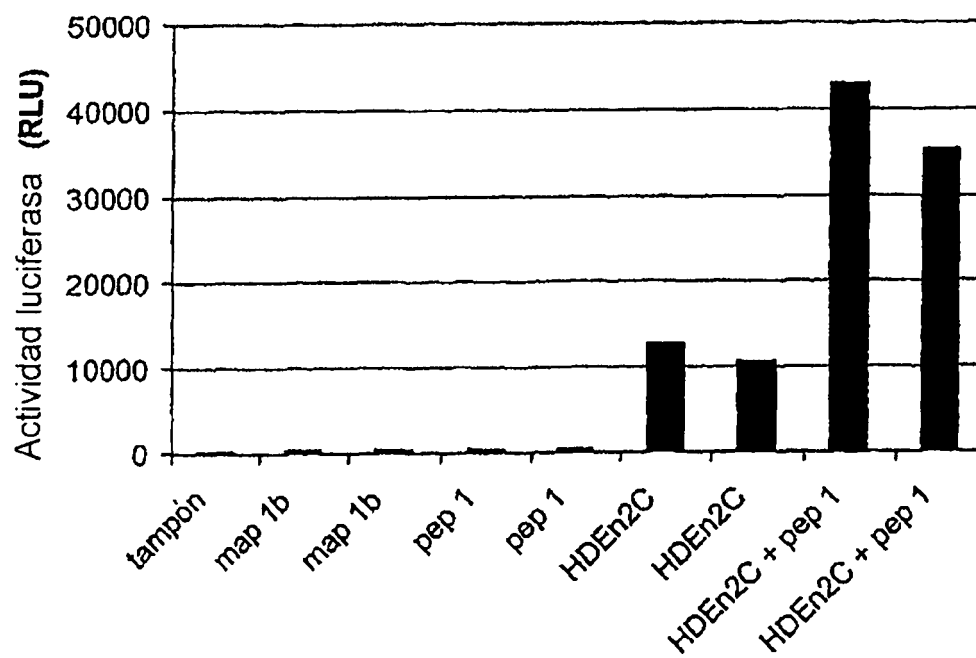
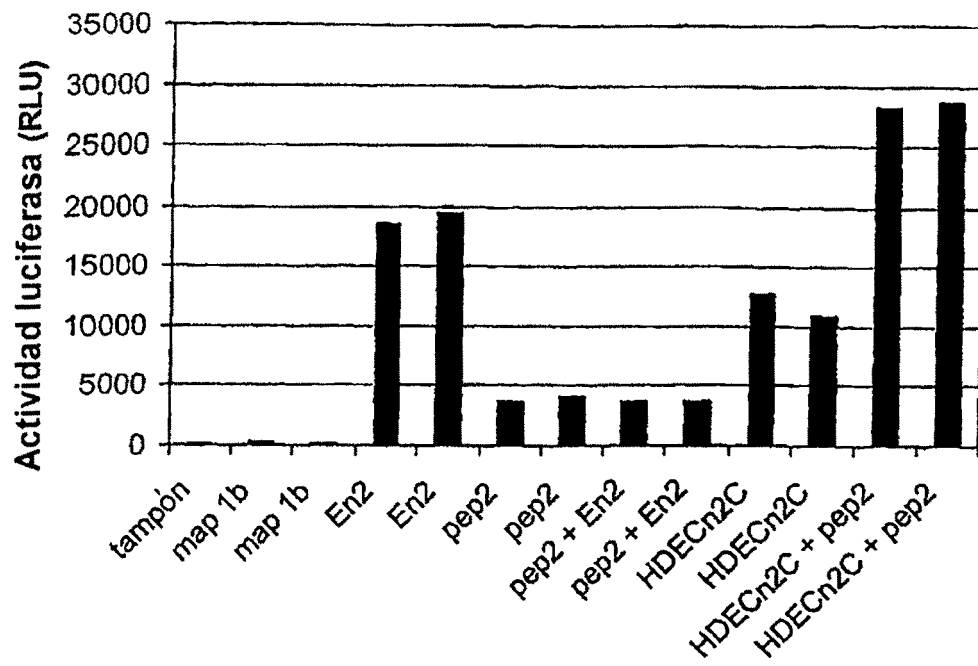


Figura 3

A



B

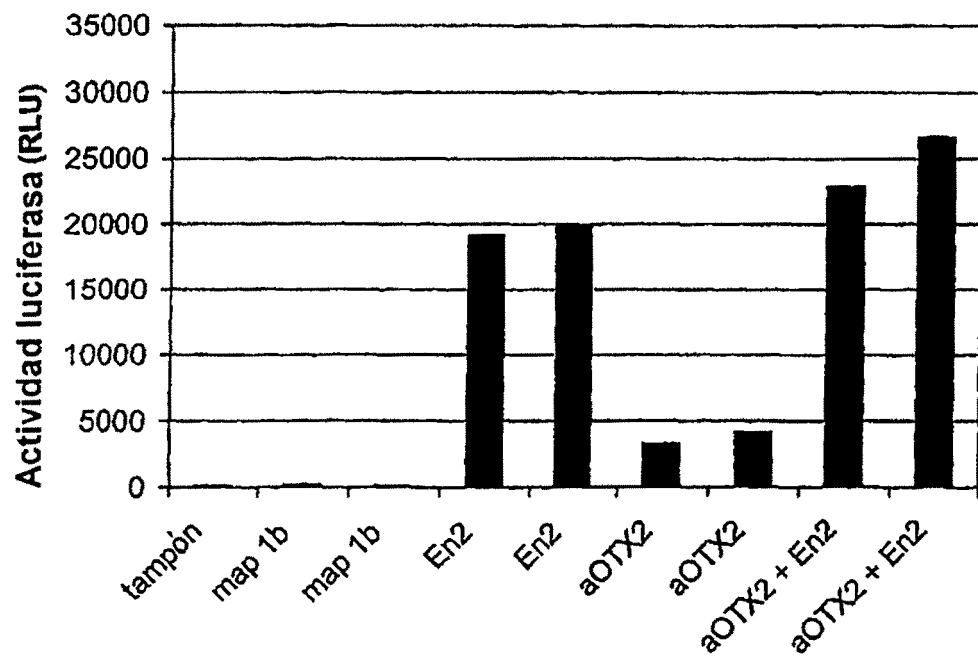


Figura 4

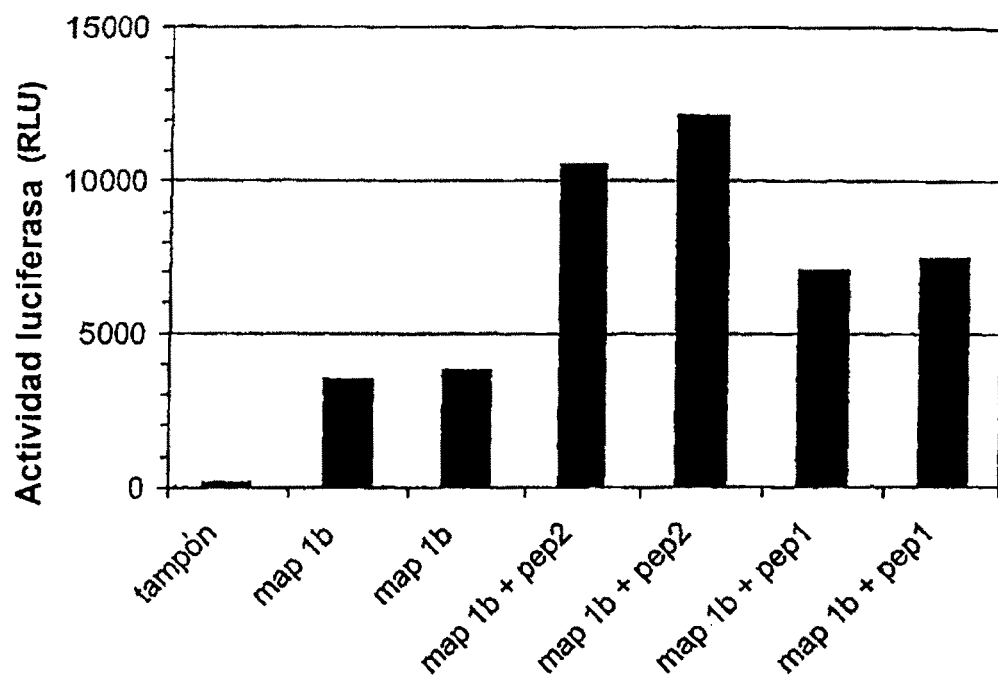
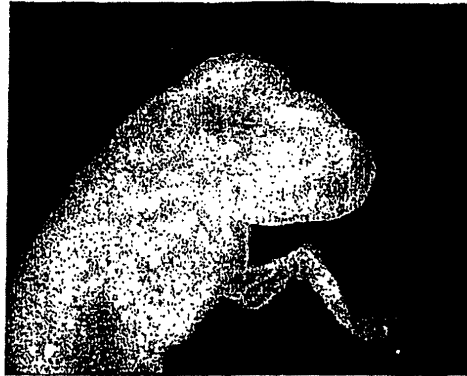


Figura 5

A



B



C



Figura 6

ES 2 273 277 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NORMAL SUPERIEURE
UNIVERSITE PARIS 13

PROCHIANTZ, Alain
LESAFFRE, Brigitte
VOLOVITCH, Michel
SONNIER, Laure

<120> PÉPTIDOS MODULADORES DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ENGRAILED

<130> MJPbv644/101

<150>03 06023
<151> 20 - 05 - 2003

<160> 3

<170> Patentin version 3.1

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia 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> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

<400> 2

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

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido

ES 2 273 277 T3

<400> 3

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

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65