



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2001/11/20  
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2002/05/23  
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/04/30  
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2001/003631  
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2002/039947  
(30) Priorité/Priority: 2000/11/20 (00/14945) FR

(51) Cl.Int.<sup>7</sup>/Int.Cl.<sup>7</sup> A61K 47/48, A61K 31/7088, A61K 38/00

(71) Demandeur/Applicant:  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS), FR

(72) Inventeurs/Inventors:  
JOLIOT, ALAIN, FR;  
DUPONT, EDMOND, FR;  
PROCHIANTZ, ALAIN, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : VECTEURS DE TRANSPORT A TRAVERS UN EPITHELIUM A JONCTIONS SERREES  
(54) Title: CARRIER VECTORS THROUGH AN EPITHELIUM WITH TIGHT JUNCTIONS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne l'utilisation de vecteurs peptidiques, comprenant un domaine de transduction, et une séquence d'export nucléaire, pour transporter une molécule d'intérêt à travers un épithélium à jonctions serrées, tel que la barrière hémato-méningée.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
23 mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/39947 A2

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : **A61K** (74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie-José** etc.;  
Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/03631 (81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.
- (22) Date de dépôt international :  
20 novembre 2001 (20.11.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
00/14945 20 novembre 2000 (20.11.2000) FR
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)** [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,  
F-75016 PARIS (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **JOLIOT, Alain** [FR/FR]; 34, rue de Citeaux, F-75012 Paris (FR).  
**DUPONT, Edmond** [FR/FR]; 40, rue Damremont,  
F-75018 Paris (FR). **PROCHIANTZ, Alain** [FR/FR]; 8,  
rue Marie-Pape-Carpantier, F-75006 Paris (FR).
- (84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).
- Publiée :**  
— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport*
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

(54) Title: CARRIER VECTORS THROUGH AN EPITHELIUM WITH TIGHT JUNCTIONS

(54) Titre : VECTEURS DE TRANSPORT A TRAVERS UN EPITHELIUM A JONCTIONS SERREES

(57) Abstract: The invention concerns peptide vectors, comprising a transduction domain, and a nuclear export sequence, for carrying a molecule of interest through an epithelium with tight junctions, such as the blood-brain barrier.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation de vecteurs peptidiques, comprennent un domaine de transduction, et une séquence d'export nucléaire, pour transporter une molécule d'intérêt à travers un épithélium à jonctions serrées, tel que la barrière hémato-méningée.



WO 02/39947 A2

VECTEURS DE TRANSPORT A TRAVERS UN EPITHELIUM A JONCTIONS  
SERREES

La présente invention est relative à de nouveaux  
vecteurs capables de transporter des molécules actives à  
5 travers la barrière hémato-méningée et, plus généralement, à  
travers des épithéliums formant des barrières étanches entre  
deux compartiments.

La barrière hémato-méningée (BHE) a pour fonction  
de préserver le cerveau des variations de la composition  
10 sanguine, et de protéger les cellules nerveuses de substances  
potentiellement toxiques. Elle réside au niveau de  
l'endothélium des vaisseaux capillaires irriguant le système  
nerveux central. Cet endothélium présente des propriétés  
particulières qui le différencient de celui des autres  
15 capillaires de l'organisme. Il est dépourvu des pores que  
l'on trouve dans un grand nombre d'autres capillaires. En  
outre, les cellules qui le constituent sont étroitement  
jointes les unes aux autres. Ces " jonctions serrées "   
possèdent en outre une résistance électrique élevée (de  
20 l'ordre de 1000 ohms/cm<sup>2</sup>), et constituent donc un obstacle  
efficace même vis-à-vis de la diffusion passive des ions.

La barrière hémato-méningée constitue donc un  
filtre très sélectif, qui ne laisse naturellement passer  
qu'un petit nombre de substances. Il s'agit principalement :

25 - de molécules lipophiles de faible poids  
moléculaire, qui peuvent traverser la barrière hémato-  
méningée par diffusion passive ;

- de molécules hydrophiles de faible poids  
moléculaire, constituant des nutriments essentiels pour le  
30 fonctionnement des cellules nerveuses (notamment sucres,  
acides aminés, neuropeptides, vitamines, etc). Ces molécules  
traversent la barrière hémato-méningée par l'intermédiaire de  
transporteurs spécifiques ;

- de molécules de poids moléculaire élevé (par  
35 exemple des hormones polypeptidiques), qui traversent la  
barrière hémato-méningée après fixation à leurs récepteurs  
spécifiques présents à la surface des cellules endothéliales.

L'imperméabilité de la barrière hémato-méningée constitue un obstacle majeur à la pénétration cérébrale de nombreux médicaments.

Pour y remédier, plusieurs approches ont été  
5 proposées :

1) L'administration directe de la molécule souhaitée au niveau du système nerveux central, par perfusion ou injection intrathécale. Cette méthode présente l'inconvénient d'être extrêmement invasive et délicate à  
10 mettre en œuvre. Une approche voisine est constituée par la greffe, dans le système nerveux central, de cellules génétiquement modifiées pour produire la substance à administrer, agissant ainsi à la façon de " minipompes " pour délivrer celle-ci *in situ*. Malgré son intérêt potentiel,  
15 cette approche demeurera limitée aux drogues pouvant être synthétisées et sécrétées par une cellule.

2) L'ouverture momentanée de la BHE, en général provoquée par choc osmotique, ou par l'action de certaines substances (par exemple bradykinine ou angiotensine), qui  
20 ouvrent transitoirement les jonctions serrées en interagissant avec le domaine extracellulaire de certains de leur composants. Cette approche présente l'inconvénient d'être non-sélective, et de permettre le passage de nombreuses autres molécules présentes dans le sang en même  
25 temps que la molécule à transporter.

3) L'utilisation des mécanismes naturels de passage à travers la barrière hémato-méningée. La diffusion passive ne peut toutefois être utilisée que pour des substances de faible poids moléculaire, lipophiles, ou  
30 pouvant être rendues lipophiles sans pour autant modifier leurs propriétés pharmacologiques. Les transporteurs spécifiques ne peuvent être utilisés que pour des molécules de structure suffisamment proche de celle des substances naturellement transportées par leur intermédiaire. Dans le  
35 cas des récepteurs spécifiques, il a été proposé de conjuguer des ligands naturels de ces récepteurs avec la molécule à transporter ; un inconvénient majeur de cette approche réside

dans l'activité biologique propre de ces ligands, qui peut entraîner des effets secondaires plus ou moins gênants.

Récemment, il a été proposé d'utiliser, comme vecteurs de transport à travers la barrière hémato-méningée, des peptides transducteurs. Les peptides transducteurs sont des peptides comprenant une séquence dénommée " domaine de transduction " leur conférant la capacité de pénétrer à l'intérieur d'une cellule vivante, indépendamment de la présence de transporteurs ou de récepteurs spécifiques.

Des articles de revue concernant les peptides transducteurs ont été publiés récemment par LIDGREN *et al.*, [TiPS, 21, 99-102, (2000)] ; SCHWARZE et 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)].

A titre d'exemples de peptides transducteurs, on citera en particulier :

- les pénétrazines, qui sont des peptides dérivés de la troisième hélice d'un homéodomaine ; des peptides de la famille des pénétrazines sont décrits par exemple dans les publications 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)], ainsi que dans le Brevet US 5888762, le Brevet US.6080724, ou la Demande PCT WO/00/01417.

- les peptides dérivés de la protéine Tat de HIV1, et en particulier du fragment 48-60 de ladite protéine ; de tels peptides sont décrits par exemple par FAWELL *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 664-668, (1994)] ou par VIVES *et al.* [J. Biol. Chem., 272, 16010-16017, (1997)].

- les peptides dérivés de la protéine VP22 de HSV ; de tels peptides sont décrits par exemple par ELLIOTT et O'HARE [Cell, 88, 223-233, (1997)].

- des peptides dérivés d'une séquence signal, éventuellement conjuguée à une séquence de localisation nucléaire ; de tels peptides sont décrits par exemple par LIN *et al.* [J. Biol. Chem., 270, 14255-14258, (1995)] ; J. Biol.

Chem., 271, 5305-5308, (1996)], LIU et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11819-11824, (1996)], MORRIS et al. [Nucleic Acids Res., 25, 2730-2736, (1997)], CHALOIN et al. [Biochemistry, 36, 11179-11187, (1997) ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 243, 601-608, (1998)], ZHANG et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9184-9189, (1998)].

- les transportanes qui sont dérivés d'une fusion entre une portion d'un neuropeptide, la galanine, et un peptide du venin de guêpe [POOGA et al., FASEB J., 12, 67-77, (1998) ; Ann. New York Acad. Sci., 863, 450-453, (1998)].

SCHWARZE et al. [Science, 285, 1569-1572, (1999)] ont observé que la  $\beta$ -galactosidase couplée à un domaine de transduction de la protéine Tat, pouvait être détectée, après administration par voie intra-péritonéale, dans tous les tissus de l'organisme, y compris le cerveau.

ROUSSELLE et al. [Mol Pharmacol, 57, 679-686, (2000)] rapportent également que le couplage de la doxorubicine avec la D-pénétratine ou le peptide SynB1 accroît son passage à travers la barrière hémato-méningée.

Bien que l'utilisation de peptides transducteurs paraisse augmenter le passage à travers la barrière hémato-méningée celui-ci demeure toutefois très faible.

D'autre part, lors de travaux antérieurs, l'équipe des Inventeurs a mis en évidence, dans la protéine à homéodomaine Engrailed, l'existence d'une séquence d'export nucléaire participant à la sortie de cette protéine du noyau et à son passage dans un compartiment de sécrétion [JOLIOT et al., Curr Biol, 8, 856-863, (1998) ; MAIZEL et al., Development, 126, 3183-3190, (1999)]. Cette séquence diffère, par sa structure et sa position dans la molécule, d'une séquence de sécrétion classique de type peptide signal.

Les Inventeurs ont alors recherché si cette séquence d'export nucléaire était fonctionnelle en dehors du contexte de la protéine Engrailed entière. Dans ce but, ils ont comparé les propriétés de pénétration et de distribution intracellulaire d'un peptide comprenant uniquement un domaine de transduction (constitué par une pénétratine, en l'occurrence la troisième hélice du peptide pAntp), et d'un

peptide (NES-Pénét) comprenant, outre ce domaine de transduction, la séquence d'export nucléaire de la protéine Engrailed. Ils ont constaté qu'après pénétration dans les cellules à 37°C le peptide comprenant uniquement le domaine  
5 de transduction est localisé dans le noyau, et de manière diffuse, dans le cytoplasme, alors que le peptide comprenant également la séquence d'export nucléaire est principalement localisé dans un compartiment vésiculaire du cytoplasme. Après pénétration dans les cellules à 4°C le peptide  
10 comprenant uniquement le domaine de transduction ainsi que celui comprenant également la séquence d'export nucléaire restent localisés dans le noyau. Si les cellules sont alors portées à 37°C, on observe le passage du peptide comprenant le domaine de transduction et la séquence d'export nucléaire  
15 dans le compartiment vésiculaire, ce qui traduit un mécanisme d'export nucléaire énergie-dépendant.

Les Inventeurs ont également recherché si l'addition de la séquence d'export nucléaire modifiait la capacité d'interaction de la pénétratine avec le compartiment  
20 vésiculaire. Dans ce but, ils ont incubé chacun des 2 peptides avec des fractions membranaires purifiées, et les ont traités avec de la trypsine. Ils ont alors observé que le peptide contenant le domaine de transduction seul (pénétratine) était presque totalement dégradé par la  
25 trypsine, alors que le peptide comprenant le domaine de transduction et la séquence d'export nucléaire (NES-Penet) était protégé contre l'action de la trypsine. La même expérience de fractionnement et de protection a été menée après internalisation par les cellules vivantes ; la  
30 dégradation de la pénétratine et la protection du peptide NES-Penet ont également été observées. Le fait que la pénétratine incubée avec les membranes seules ne soit pas protégée suggère que le rôle de la séquence d'export nucléaire n'est pas limité à la sortie du noyau mais qu'elle  
35 permet aussi l'accès du peptide à un compartiment intracisternal, et son accumulation dans celui-ci.

Afin de déterminer si le passage dans le compartiment vésiculaire pouvait résulter en une

externalisation effective du peptide, et si cette externalisation était susceptible de faciliter le passage à travers un épithélium à jonctions serrées, les Inventeurs ont utilisé un modèle expérimental constitué par 2 compartiments  
5 séparés par une membrane microporeuse recouverte d'un tapis cellulaire reproduisant un épithélium à jonctions serrées. L'un des compartiments est en contact avec le pôle apical des cellules, et l'autre avec leur pôle baso-latéral. Ils ont ainsi constaté que lorsque l'on ajoute dans le compartiment  
10 baso-latéral le peptide pénétratine comprenant uniquement le domaine de transduction, on observe l'entrée de ce peptide dans les cellules, et un faible passage vers le compartiment apical. Lorsque le même peptide est ajouté dans le compartiment apical, il entre également dans les cellules ;  
15 par contre, on n'observe aucun passage vers le compartiment baso-latéral.

Les mêmes expériences ont été effectuées avec le peptide NES-Penet cas, le passage du compartiment baso-latéral au compartiment apical est très fortement augmenté,  
20 alors que le passage du compartiment apical au compartiment baso-latéral demeure faible ou inexistant.

En outre, les Inventeurs ont comparé, à 4°C et 37°C l'entrée et la sortie des peptides pénétratine et NES-Penet placés dans l'un ou l'autre des deux compartiments. Ils  
25 ont observé que l'entrée de l'un ou l'autre de ces peptides se produit à 4°C comme à 37°C, mais que la sortie de NES-Penet est bloquée à 4°C, ce qui confirme que les mécanismes d'entrée et de sortie sont distincts.

Il apparaît donc que l'association d'une séquence d'export nucléaire avec un domaine de transduction permet  
30 d'augmenter l'efficacité du transport à travers un épithélium à jonction serrées, dans le sens baso-latéral/apical.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un peptide comprenant au moins une séquence d'acides aminés  
35 constituant un domaine de transduction et une séquence d'acides aminés constituant une séquence d'export nucléaire, en tant que vecteur pour transporter une molécule d'intérêt à

travers un épithélium à jonctions serrées, notamment à travers la barrière hémato-méningée et le plexus choroïde.

En particulier la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins une séquence d'acides aminés  
5 constituant un domaine de transduction et d'au moins une séquence d'acides aminés constituant une séquence d'export nucléaire, pour l'obtention d'un vecteur destiné au transport d'une molécule d'intérêt diagnostique ou thérapeutique à travers un épithélium à jonctions serrées, notamment à  
10 travers la barrière hémato-méningée et le plexus choroïde.

Des domaines de transduction utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention sont connus en eux-mêmes et sont notamment décrits dans les publications de l'art antérieur mentionnées ci-dessus.

15 Ledit domaine de transduction peut ou non comprendre une séquence de localisation nucléaire (NLS).

On définit par " séquence de localisation nucléaire " une séquence qui lorsqu'elle est présente dans un domaine de transduction, permet l'accès de celui-ci au noyau  
20 après son entrée dans la cellule.

A titre d'exemples non-limitatifs de peptides constituant des domaines de transduction comprenant une séquence de localisation nucléaire, on citera notamment :

25 (i) des peptides comprenant le fragment 48-60 de la protéine Tat de HIV1 ;

(ii) la fusion entre la NLS de NFκB et le peptide signal du K-FGF ;

(iii) la fusion entre NLS de l'antigène T de SV40 et le peptide signal du K-FGF ;

30 (iv) les pénétratines.

A titre d'exemples non-limitatifs de peptides constituant des domaines de transduction ne comprenant pas de séquence de localisation nucléaire, on citera notamment :

35 ID NO: 1) (i) le peptide amphiphile KLALKLALKALKALKLA (SEQ

(ii) certains variants des pénétratines [DEROSSI et al., J. Biol. Chem., 271, 18188-18193, (1996)].

Dans le cas où le domaine de transduction ne comprend pas de séquence de localisation nucléaire, on peut éventuellement, si on le souhaite, lui associer une séquence de localisation nucléaire hétérologue.

5 Par : " séquence d'export nucléaire " (NES), on entend toute séquence peptidique capable de conférer à un peptide comprenant ladite séquence la capacité de sortir du noyau cellulaire et de gagner un compartiment de sécrétion.

Des séquences d'export nucléaire connues en  
10 elles-mêmes sont utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention. 3 types de séquences d'export nucléaire ont été décrits à l'heure actuelle (pour revue cf. par exemple NAKIELNY et DREYFUSS, Current Opinion in Cell Biology 9, 420-429, 1997) : les séquences d'export nucléaire dites  
15 " riches en leucine ", qui sont des séquences d'environ 10 acides aminés comprenant une proportion importante d'acides aminés hydrophobes aliphatiques (leucine ou isoleucine, et également valine ou alanine), qui sont présentes dans un grand nombre de protéines, parmi lesquelles les protéines à  
20 homéodomaine ; la séquence M9 de hnRNP A1 [MICHAEL et al., Cell, 83, 415-422, (1995)] ; la séquence KNS (pour : " hnRNP K nuclear shuttling domain ") de hnRNP K [MICHAEL et al., EMBO J., 16, 3587-3598, (1997)].

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la  
25 présente invention, on utilisera une séquence d'export nucléaire riche en leucine, et notamment une séquence d'export nucléaire d'une protéine à homéodomaine. Des séquences d'export nucléaire des protéines à homéodomaine pouvant en particulier être utilisées pour la mise en œuvre  
30 de la présente invention, sont des séquences de 10 à 15 acides aminés environ, localisées, dans ces protéines, à l'extrémité N-terminale de la 3<sup>ème</sup> hélice, ou recouvrant partiellement celle-ci. On peut, à titre d'exemple, utiliser une séquence d'export nucléaire de la protéine " Engrailed ",  
35 comprenant au moins la séquence (code 1 lettre) AQELGLNESQI (SEQ ID NO: 2), et avantageusement, au moins la séquence (code 1 lettre) SLAQELGLNERQIKI (SEQ ID NO: 3).

La séquence d'export nucléaire et le domaine de transduction peuvent être directement adjacents, séparés par une autre séquence d'acides aminés, ou se recouvrir au moins partiellement.

5 La présente invention peut être mise en œuvre pour transporter à travers un épithélium à jonctions serrées, et notamment à travers la barrière hémato-méningée, toute molécule d'intérêt diagnostique ou thérapeutique pouvant être transportée à l'intérieur d'une cellule vivante par un  
10 peptide transducteur, y compris une protéine à homédomaine. Elle peut ainsi être mise en œuvre notamment pour le transport d'acides nucléiques, de polypeptides, de peptides/acides nucléiques, ou d'analogues de nucléotides utilisés notamment comme agents antinéoplasiques.

15 Pour la mise en œuvre de la présente invention, la molécule à transporter peut être fixée à n'importe quel niveau du peptide vecteur, à condition que cette fixation ne modifie pas les fonctionnalités du domaine de transduction ou du séquence d'export nucléaire. On peut par exemple fixer  
20 ladite molécule à l'extrémité N-terminale, à l'extrémité C-terminale, ou à l'intérieur dudit peptide, par exemple entre le domaine de transduction et la séquence d'export nucléaire.

La conjugaison entre la molécule à transporter et  
25 le peptide vecteur peut être effectuée directement, ou par l'intermédiaire d'un lieu, par les mêmes méthodes que celles utilisées pour la conjugaison à un peptide transducteur. Différentes méthodes appropriées sont connues en elles-mêmes, et sont notamment décrites dans les publications de l'art  
30 antérieur mentionnées ci-dessus.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs, illustrant le passage d'un peptide comprenant un domaine de transduction et un  
35 domaine d'export nucléaire à travers un épithélium à jonctions serrées.

10

**EXEMPLE 1 : LOCALISATION INTRACELLULAIRE D'UN PEPTIDE  
COMPRENANT LE DOMAINE DE TRANSDUCTION DU PEPTIDE pANTP ET LA  
SEQUENCE D'EXPORT NUCLEAIRE DE LA PROTEINE ENGRAILED.**

On synthétise le peptide biotinylé :

5 Biot-QSLAQELGLNERQIKIWFQNRRMKWKK-COOH (SEQ ID  
NO: 4).

Ce peptide (dénommé ci-après NES-Penet) comprend,  
avec un recouvrement partiel, une séquence :

QSLAQELGLNERQIKI (SEQ ID NO: 5)

10 contenant la séquence d'export nucléaire de la  
protéine Engrailed,

et une séquence pénétratine :

RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 6)

15 constituée par l'hélice 3 du peptide pAntp  
(homéodomaine de la protéine Antennapedia de drosophile).

Il est en outre marqué à son extrémité  
N-terminale par une biotine fixée par l'intermédiaire d'un  
bras aminopentanoïque.

A titre de témoin, le peptide biotinylé :

20 Biot-RQIKIWFQNRRMKWKK-COOH (dénommé ci-après  
Penet-1)

ne comprenant que la séquence pénétratine a  
également été synthétisé.

25 Chacun des 2 peptides a été incubé, à la  
concentration de 10  $\mu$ M, avec des cellules cérébrales  
d'embryon de rat (E17,  $10^7$  cellules/ml) en suspension,  
pendant 1 heure à 37°C.

Les cellules ont été lysées et fractionnées selon  
le protocole suivant :

30 On lyse les cellules dans 200  $\mu$ l de tampon Hepes  
10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, pH 7 contenant un cocktail d'inhibiteurs  
de protéases. La lyse est effectuée par dix aller-retour au  
travers d'une aiguille G26 montée sur une seringue de 1 ml.

35 Après centrifugation des extraits (150,000g  
1 heure, 4°C) au travers d'un coussin de saccharose  
discontinu 0,25 M et 1,7 M les noyaux sont récupérés dans le  
culot et la fraction membranaire à l'interface 0,25 M/1,7 M.

Une partie de chacune ces fractions a ensuite été traitée à la trypsine selon le protocole suivant : incubation en tampon phosphate (PBS) 1 heure, 4°C, en présence de trypsine 100 µg/ml ; arrêt de la réaction par addition  
5 d'acide trichloracétique (TCA) 10% (vol/vol) à 100°C pendant 5 min.

Les fractions, non-traitées ou traitées à la trypsine, ont ensuite été analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide 22% en  
10 présence de SDS.

La révélation des peptides Penet-1 et NES-Penet est effectuée à la streptavidine peroxydase selon le protocole décrit par DEROSI et al. [J. Biol. Chem., 271, 18188-18193, (1996)].

15 Les résultats sont illustrés par la Figure 1.

En l'absence de traitement par la trypsine (-), on observe une association des peptides Penet-1 et NES-Penet avec la fraction nucléaire (Noyaux) et avec la fraction membranaire (Mb).

20 Le traitement par la trypsine (+) induit la dégradation du peptide Penet-1 dans la fraction nucléaire et la fraction membranaire. En revanche, dans le cas du peptide NES-Penet, on n'observe pas de dégradation dans la fraction membranaire, et une protection partielle contre la  
25 dégradation dans la fraction nucléaire. Cette protection reflète probablement une légère contamination de cette fraction par des membranes périnucléaires.

Dans une 2<sup>ème</sup> série d'expériences, les cellules en culture ont été lysées et les fractions membranaires  
30 purifiées selon le protocole décrit ci-dessus, sans incubation préalable avec les peptides.

Chacun des 2 peptides Penet-1 et NES-Penet a été incubé, à la concentration de 10 µM, avec la préparation de fractions membranaires issue de 10<sup>7</sup> neurones (comme ci-  
35 dessus), pendant 1 heure à 37°C, puis traité à la trypsine selon le protocole décrit ci-dessus.

Après incubation, le mélange peptide/préparation membranaire a été traité à la trypsine selon le protocole décrit ci-dessus.

5 Parallèlement, chacun des 2 peptides Penet-1 et NES-Penet a été traité à la trypsine, dans les mêmes conditions, sans incubation préalable avec la préparation membranaire.

Les lysats tryptiques ont été analysés par électrophorèse comme décrit ci-dessus.

10 Les résultats sont illustrés par la Figure 2.

En l'absence d'incubation avec la préparation membranaire (A), on observe une dégradation totale des peptides Penet-1 et NES-Penet après traitement par la trypsine (+).

15 Après incubation avec la préparation membranaire (B), on observe, après traitement par la trypsine (+), une protection partielle du peptide Penet-1 (la quantité de peptide protégé pouvant être évaluée à moins de 30%), et une protection quasi-totale du peptide NES-Penet.

20 Ces résultats montrent qu'indépendamment de la présence de noyaux, la séquence d'export nucléaire favorise l'accès du peptide à un compartiment intra-membranaire, et/ou son maintien dans ce compartiment.

**EXEMPLE 2 : PASSAGE D'UN PEPTIDE COMPRENANT LE DOMAINE DE  
25 TRANSDUCTION DU PEPTIDE pANTP ET LA SEQUENCE D'EXPORT  
NUCLEAIRE DE LA PROTEINE ENGRAILED A TRAVERS UN EPITHELIUM A  
JONCTIONS SERREES.**

Le passage des peptides Penet et NES-Penet à travers un épithélium à jonctions serrées a été évalué à  
30 l'aide du dispositif (système TRANSWELL, CORNING-COSTAR) représenté sur la Figure 3.

Ce dispositif comprend deux compartiments (1, 2) séparés par une membrane microporeuse en polyester (3) sur laquelle un épithélium (4) constitué de cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney, lignée de cellules de rein de chien) a  
35 été établi. Les cellules sont ensemencées et poussent jusqu'à confluence.

Le compartiment (1) au contact de la membrane microporeuse et du pôle baso-latéral des cellules est dénommé compartiment baso-latéral. Le compartiment (2), au contact du pôle apical des cellules est dénommé compartiment apical.

5 Chacun des compartiments est rempli de milieu dont la constitution est la suivante : Minimum Essential Medium with Earle Salt (MEM), Glutamine 2 mM, HEPES pH 7 2 mM, Pénicilline 5 U/ml, Streptomycine 5 µg/ml, additionné d'un mélange d'inhibiteurs des protéases.

10 Pour chaque expérience, l'intégrité des jonctions serrées est contrôlée par la mesure de la résistance entre les deux compartiments ( $R > 2000 \Omega / \text{cm}^2$ ).

Par ailleurs l'étanchéité de l'épithélium a également été vérifiée en ajoutant de l'inuline tritiée  
15 ( $6,5 \times 10^5$  cpm/compartiment), soit au compartiment apical, soit au compartiment baso-latéral, et en mesurant la radioactivité dans l'autre compartiment 180 minutes plus tard. Dans ces conditions, aucun passage de l'inuline tritiée n'a été observé, dans le sens apical/baso-latéral, ou dans le sens  
20 baso-latéral/apical.

Le peptide biotinylé Penet-1 ou le peptide biotinylé NES-Penet, utilisés chacun à la concentration de 10 µM, sont placés soit dans le compartiment apical, soit dans le compartiment baso-latéral). L'autre compartiment  
25 contient de la streptavidine, à une concentration de 10 µM permettant la capture du peptide biotinylé. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, ou à 4°C, le milieu du compartiment de départ, et le milieu du compartiment d'arrivée sont prélevés.

Les peptides sont précipités par addition d'acide  
30 trichloracétique (TCA) à 10%, et repris dans du milieu de Laemmli bouillant. Les cellules sont rincées dans une solution de NaCl à 0,5M, puis lysées dans du milieu de Laemmli bouillant. La présence des peptides Penet-1 ou NES-Penet dans le compartiment de départ, dans le compartiment  
35 d'arrivée, ou à l'intérieur des cellules, est détectée par révélation à la streptavidine-peroxydase comme indiqué à l'Exemple 1 ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par les Figures 4A et 4B.

La Figure 4A représente l'analyse électrophorétique des peptides NES-Penet et Penet-1 après 5 30 minutes d'incubation, lorsque le compartiment de départ est le compartiment baso-latéral. A 37°C (panneaux de gauche), on observe une pénétration des 2 peptides dans les cellules, et un très faible passage du peptide Penet-1 dans le compartiment apical ; en revanche le passage du peptide 10 NES-Penet dans le compartiment apical est beaucoup plus important. On observe en outre que le passage ne s'accompagne d'aucune dégradation du peptide. A 4°C (panneaux de droite), on observe également une pénétration des 2 peptides dans les cellules ; en revanche aucun des 2 peptides ne passe dans le 15 compartiment apical.

La Figure 4B représente l'analyse électrophorétique des peptides NES-Penet et Penet-1 après 30 minutes d'incubation, lorsque le compartiment de départ est le compartiment apical. A 37°C comme à 4°C, on observe 20 une pénétration des 2 peptides dans les cellules, mais aucun passage dans le compartiment baso-latéral.

Lorsque les mêmes expériences sont effectuées en présence de sérum de veau, à une concentration de 10% dans le compartiment de départ on observe des résultats identiques, 25 ce qui montre que le passage n'est pas bloqué par des composants sériques.

Ces résultats démontrent que les deux peptides peuvent être internalisés par les deux faces de l'épithélium, mais que la présence de la séquence d'export nucléaire 30 augmente sensiblement le passage du peptide Nes-Penet à travers l'épithélium, et que ce passage est polarisé et se fait uniquement dans le sens baso-latéral/apical.

En outre, la température est sans effet sur l'entrée (elle se produit à 4°C et 37°C) alors que la sortie 35 est température dépendante (elle est bloquée à 4°C), ce qui montre que ces 2 phénomènes correspondent à des processus distincts.

Dans une autre série d'expérimentations, l'effet de la brefeldine A (BFA) qui bloque la sécrétion protéique faisant intervenir l'appareil de Golgi, sur le passage du peptide NES-Penet a été étudié.

5 Le peptide biotinylé NES-Penet (10  $\mu$ M) est incubé dans le compartiment basolatéral, dans les conditions décrites ci-dessus, pendant une heure à 4°C ou à 37°C, en l'absence ou en présence de brefeldine A (10  $\mu$ M).

10 A la fin de l'incubation, les contenus du compartiment basolatéral et du compartiment apical, et celui des cellules sont analysés comme décrit ci-dessus pour détecter la présence du peptide NES-Penet.

Les résultats sont illustrés par la Figure 5.

15 Ces résultats confirment que le peptide NES-Penet entre à 4°C (panneaux de gauche) mais ne ressort pas à cette température, que ce soit en présence (+) ou en l'absence (-) de brefeldine A. En revanche, à 37°C (panneaux de droite), on observe la sortie du peptide NES-Penet en présence (+) ou en l'absence (-) de brefeldine A.

20 Ces résultats montrent que la traversée de l'épithélium par le peptide Nes-Penet n'implique pas un passage par l'appareil de Golgi.

**EXEMPLE 3 : PASSAGE IN VIVO DE NES-PENET A TRAVERS LA BARRIERE HEMATOMENINGEE.**

25 Le peptide NES-Penet biotinylé (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l de PBS) ou du PBS (50  $\mu$ l) sont injectés dans la veine de la queue d'une souris; celle-ci est sacrifiée une heure après l'injection. Le cerveau est prélevé et fixé au paraformaldéhyde 4%, et cryoprotégé par immersion pendant une  
30 nuit à 4°C dans une solution de PBS contenant 20% de saccharose. Des coupes frontales du cerveau (10  $\mu$ M d'épaisseur) sont ensuite effectuées au cryostat. Le peptide est ensuite révélé sur ces coupes à l'aide d'un complexe streptavidine-fluorescéine, et la fluorescence est analysée  
35 par microscopie confocale.

Les résultats sont illustrés par la Figure 6 (A : PBS ; B : peptide NES-Penet). Ces résultats montrent que le

peptide NES-Penet biotinylé passe la barrière hémato-méningée de façon très importante, et parvient dans le cortex et les régions sub-corticales.

**EXEMPLE 4 : INFLUENCE DE LA SEQUENCE D'EXPORT NUCLEAIRE SUR LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE ET LE PASSAGE TRANS-EPITHELIAL DE PEPTIDES CONTENANT DES DOMAINES DE TRANSDUCTION DE DIFFERENTS TYPES.**

La localisation intracellulaire, et le passage à travers un épithélium à jonctions serrées du peptide NES-Penet décrits ci-dessus ont été comparés avec ceux d'un peptide, dénommé ci-après NES-Pen3P, comprenant la séquence d'export nucléaire de la protéine Engrailed décrite à l'Exemple 1, et une séquence pénétratine (dénommée ci-après Pen3P), dérivée de l'hélice 3 du peptide pAntp par substitution des résidus Ile, Gln et Lys situés respectivement en positions 45, 50 et 55 de l'homéodomaine Antp, par 3 résidus proline. Le peptide Pen3P pénètre dans les cellules, mais n'est pas adressé au noyau. La séquence Pen3P initialement décrite dans DEROSI et al. [J. Biol. Chem., 271, 30, 18188-18193, (1996)] est RQPKIWFNRRKPWKK (SEQ ID NO: 7)

La séquence du peptide biotinylé NES-Pen3P est la suivante :

Biot-QSLAQELGLNERQPKIWFNRRKPWKK-COOH (SEQ ID NO: 8)

Les peptides biotinylés Penet, NES-Penet, Pen3P et NES-Pen3P sont ajoutés, à une concentration de 100  $\mu$ M, à des cultures de cellules MDCK. Après incubation durant deux heures à 4°C, les cellules sont rincées avec du milieu prérefroidi à 4°C contenant du NaCl à une concentration de 0,5M ; elles sont ensuite immédiatement fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 4% (5 minutes à température ambiante) ou, alternativement, elles subissent une chasse à 37°C avec du milieu de culture dépourvu de peptide durant 30 minutes avant fixation au paraformaldéhyde. Elles sont ensuite perméabilisées durant 5 min à -20°C avec du méthanol, et préincubées une heure dans du PBS contenant 5% de sérum de veau fœtal. Les peptides sont révélés à l'aide d'un complexe

streptavidine-fluorescéine. La fluorescence est ensuite analysée en microscopie confocale

Le peptide Penet entre à 4°C ; on observe à cette température un marquage cytoplasmique diffus, et un marquage  
5 nucléaire plus intense, qui s'accroît après passage à 37°C.

Le peptide NES-Penet entre à 4°C ; on observe à cette température un marquage diffus, sans localisation cytoplasmique ou nucléaire notable. Après passage à 37°C on observe une forte association du marquage à des vésicules  
10 intra-cytoplasmiques qui correspondent probablement à un compartiment de sécrétion non post-golgien (Cf. Exemple 2).

Le peptide Pen3P entre à 4°C ; comme dans le cas du peptide NES-Penet, on observe à cette température un marquage cytoplasmique et nucléaire diffus. En revanche,  
15 contrairement au peptide NES-Penet ce marquage n'est pas modifié à 37°C.

Le peptide NES-Pen3P entre à 4°C ; comme dans le cas du peptide NES-Penet, on observe à cette température un marquage cytoplasmique et nucléaire diffus. A 37°C on observe  
20 une forte association du marquage à des vésicules intra-cytoplasmiques, semblable à celle observée pour NES-Penet.

D'autre part, le passage des peptides à travers un épithélium à jonctions serrées a été évalué en utilisant le dispositif décrit à l'exemple 2 ci-dessus.

25 Les peptides biotinylés (10 µM) sont incubés dans le compartiment basolatéral, dans les conditions décrites ci-dessus, pendant 30 minutes à 37°C. A la fin de l'incubation, les contenus du compartiment basolatéral et du compartiment apical, et celui des cellules sont analysés comme décrit à  
30 l'exemple 2.

On observe une pénétration des peptides Pen3P et NES-Pen3P dans les cellules, et un très faible passage du peptide Penet3P dans le compartiment apical ; en revanche le passage du peptide NES-Penet3P dans le compartiment apical  
35 est beaucoup plus important.

Ces résultats montrent que l'adressage à un compartiment de sécrétion, et le passage à travers un

épithélium à jonction serrées ne nécessitent pas l'adressage nucléaire préalable des peptides.

1

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CNRS

Joliot, Alain

Dupont, Edmond

Prochiantz, Alain

&lt;120&gt; Vecteurs de transport à travers un épithélium à jonctions serrées

&lt;130&gt; MJPcb644/44

&lt;150&gt; FR 0014945

&lt;151&gt; 2000-11-20

&lt;160&gt; 8

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic peptide

&lt;400&gt; 1

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys  
1 5 10 15

Leu Ala

2

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic peptide

&lt;400&gt; 2

Ala	Gln	Glu	Leu	Gly	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ile
1			5						10	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic peptide

&lt;400&gt; 3

Ser	Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Gly	Leu	Asn	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile
1			5						10				15	

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic peptide

&lt;400&gt; 4

Gln	Ser	Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Gly	Leu	Asn	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile
1			5						10					15	

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
20 25

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 5

Gln Ser Leu Ala Gln Glu Leu Gly Leu Asn Glu Arg Gln Ile Lys Ile  
1 5 10 15

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 6

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10 15

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 7

Arg Gln Pro Lys Ile Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Lys  
1 5 10 15

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 8

Gln Ser Leu Ala Gln Glu Leu Gly Leu Asn Glu Arg Gln Pro Lys Ile  
1 5 10 15

Trp Phe Pro Asn Arg Arg Lys Pro Trp Lys Lys  
20 25

## REVENDICATIONS

1) Utilisation d'un peptide comprenant au moins une séquence d'acides aminés constituant un domaine de transduction et une séquence d'acides aminés constituant une séquence d'export nucléaire, pour l'obtention d'un vecteur destiné au transport d'une molécule d'intérêt diagnostique ou thérapeutique à travers un épithélium à jonctions serrées.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit épithélium à jonctions serrées est la barrière hémato-méningée ou le plexus choroïde.

3) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit domaine de transduction est choisi parmi :

- les domaines de transductions dérivés de la troisième hélice d'un homéodomaine ;

- les domaines de transduction dérivés de la protéine Tat de HIV1 ;

- les domaines de transduction dérivés de la protéine VP22 de HSV ;

- les domaines de transduction dérivés d'une séquence signal ;

- les domaines de transduction des transportanes.

4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'on utilise une séquence d'export nucléaire riche en leucine.

5) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ladite séquence d'export nucléaire est une séquence d'export nucléaire d'une protéine à homéodomaine.

6) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que ladite séquence d'export nucléaire comprend au moins la séquence peptidique AQELGLNESQI.

7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ladite séquence d'export nucléaire comprend au moins la séquence peptidique SLAQELGLNERQIKI.

8) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la molécule d'intérêt diagnostique ou thérapeutique à transporter est

choisi parmi les acides nucléiques, les polypeptides, les peptides/acides nucléiques, et les analogues de nucléotides.

1 / 5

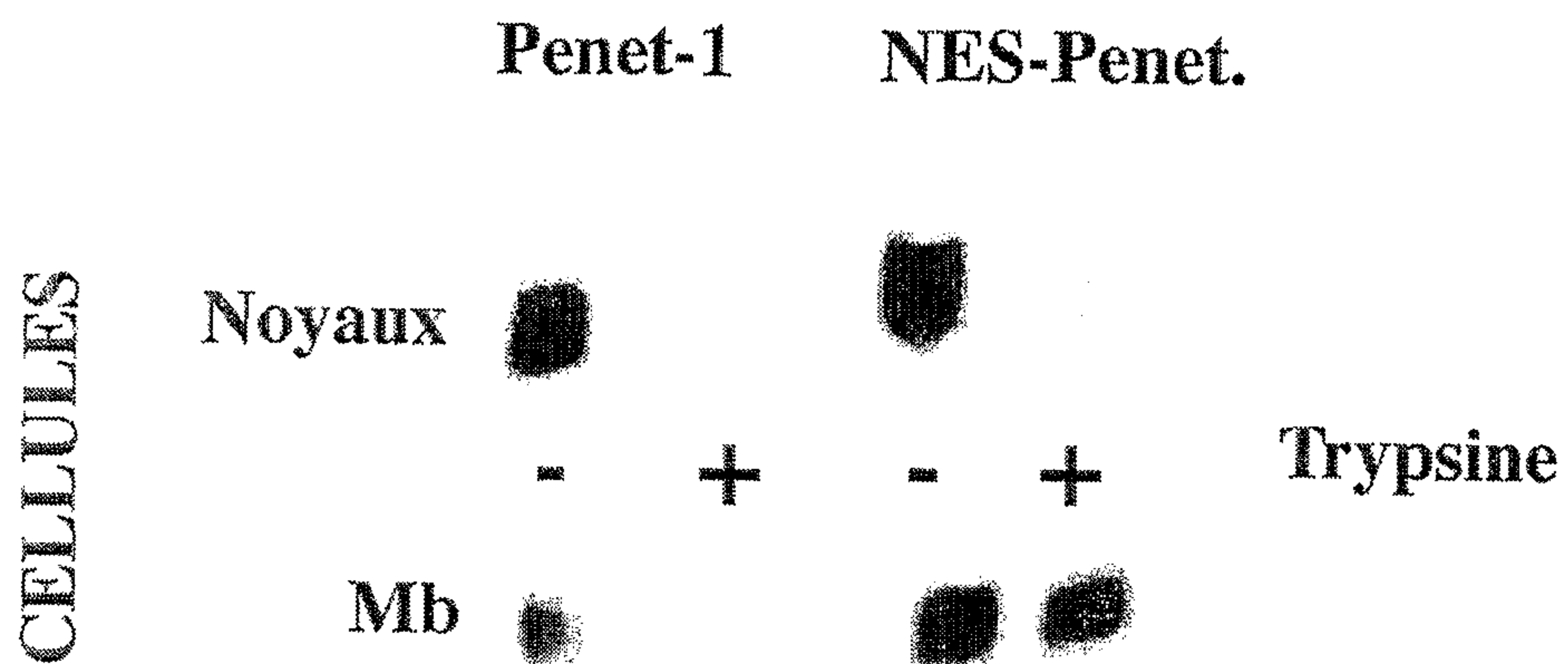


Figure 1

37°C

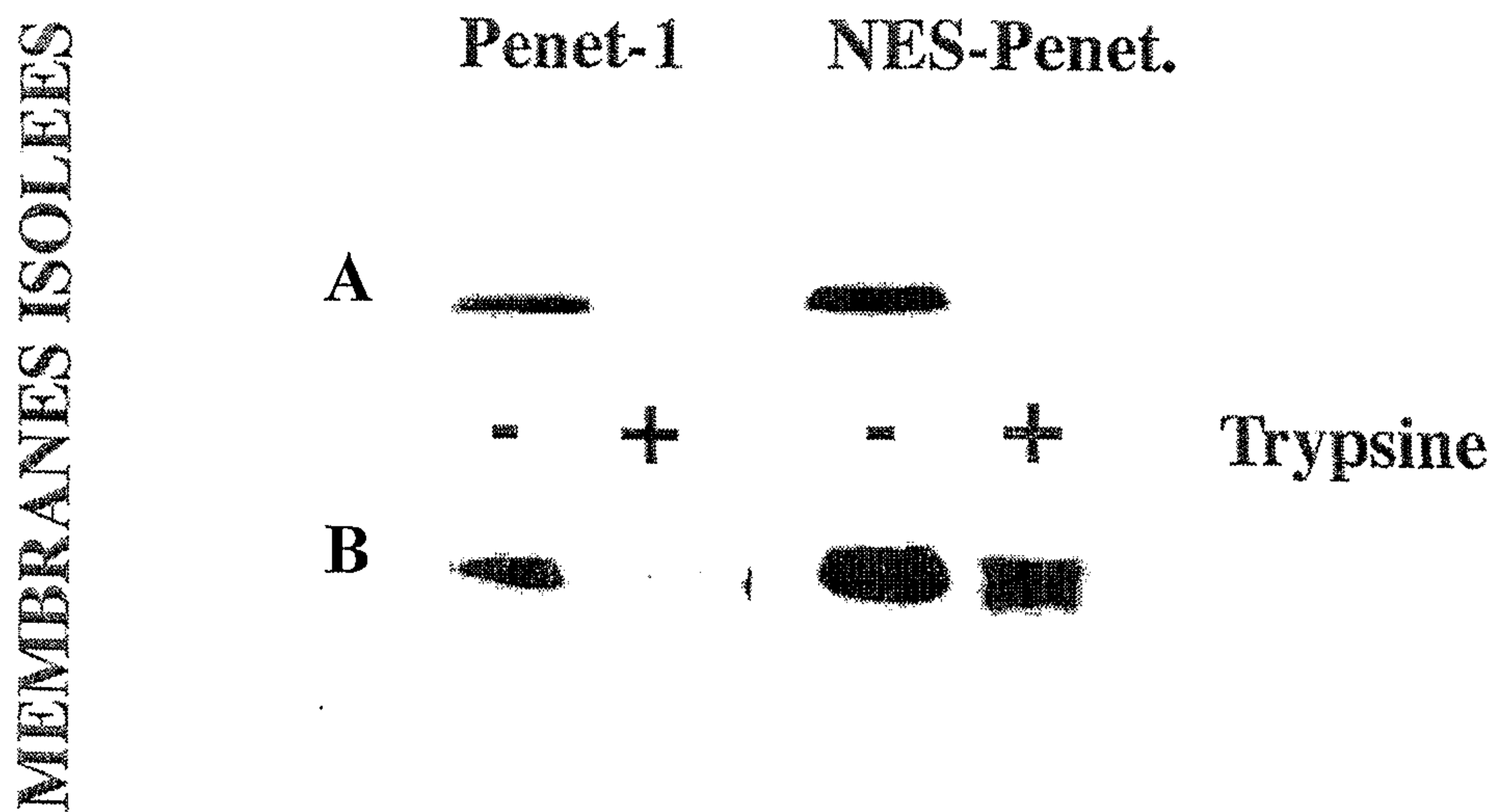


Figure 2

2 / 5

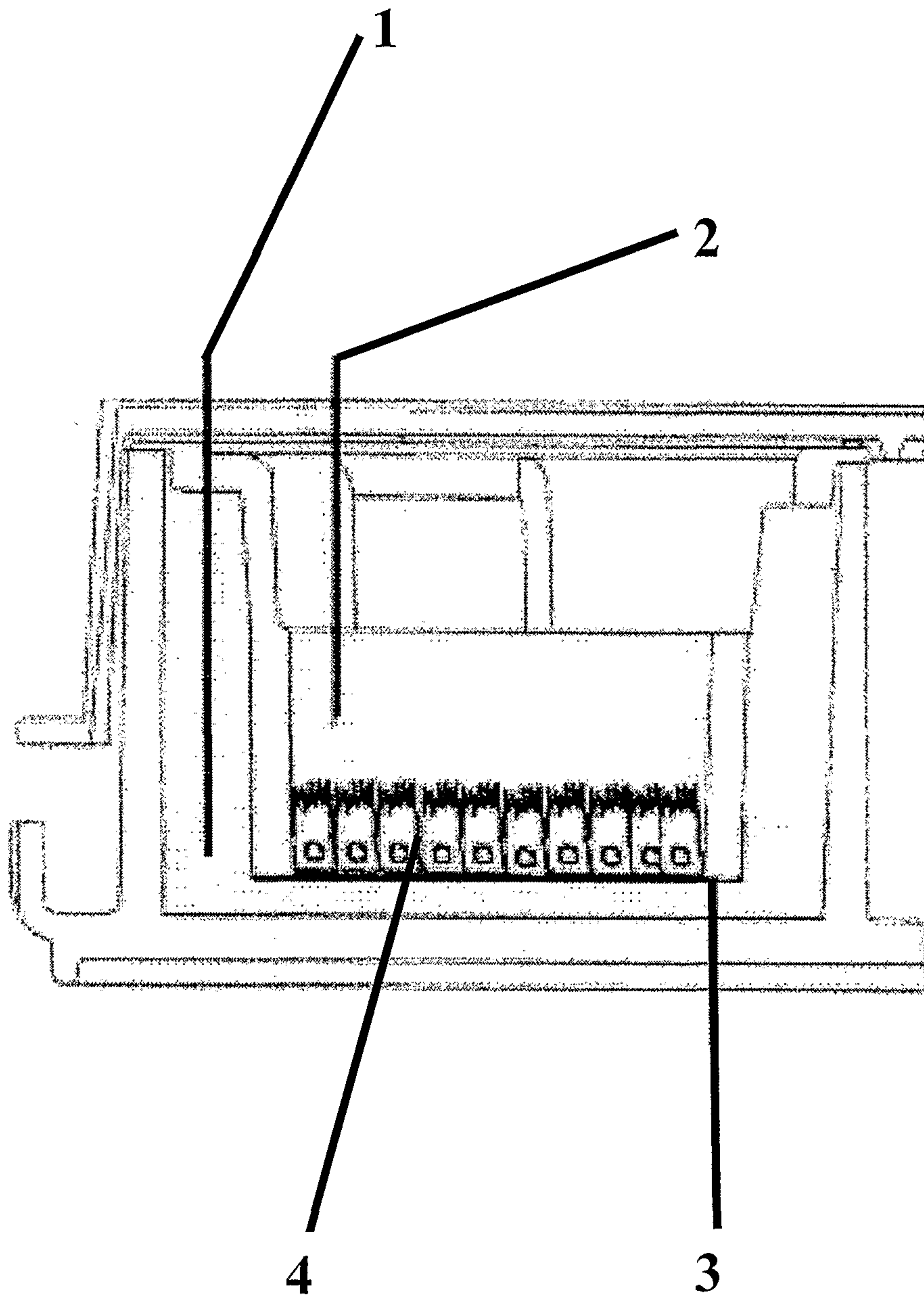
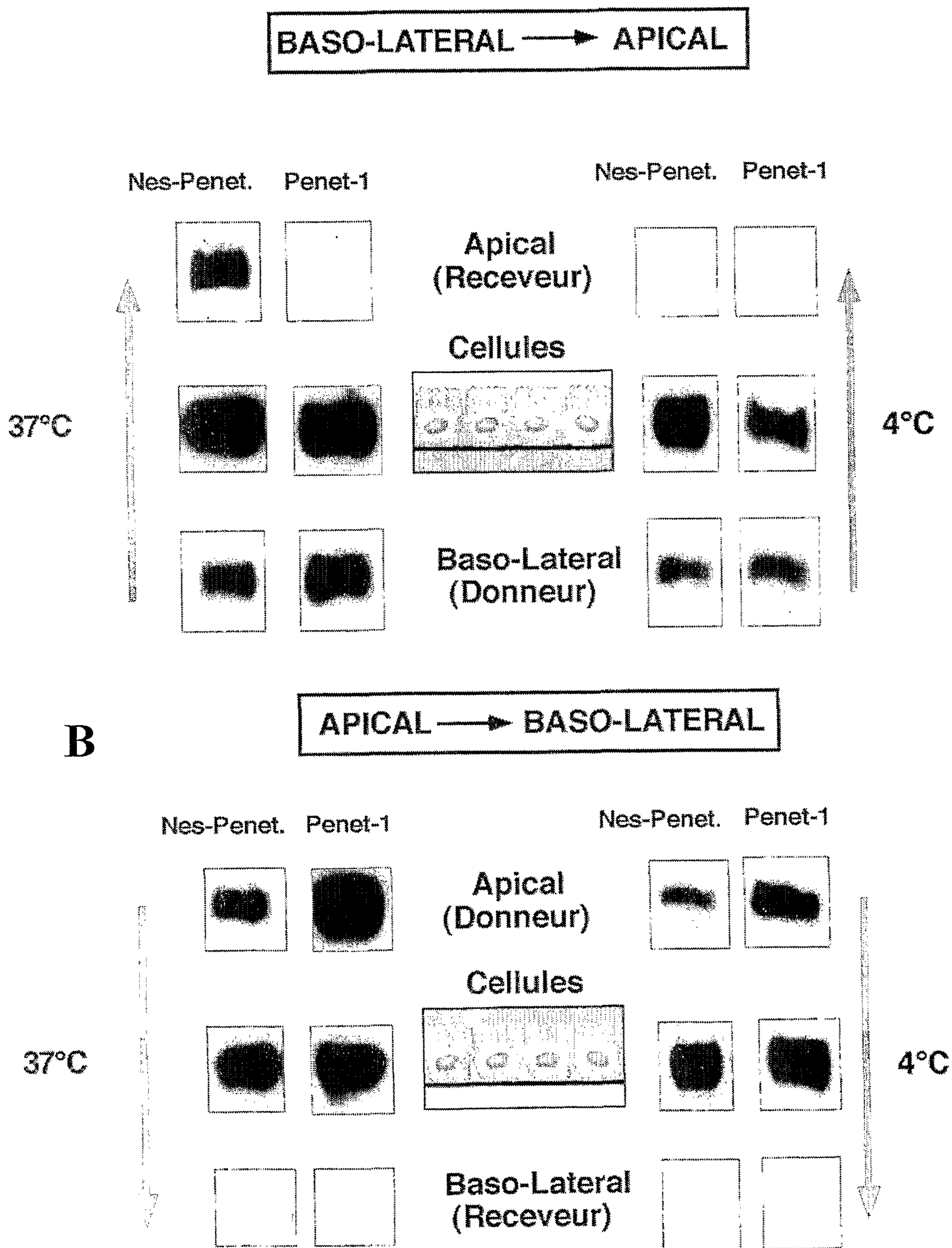


Figure 3

3 / 5



**Figure 4**

4 / 5

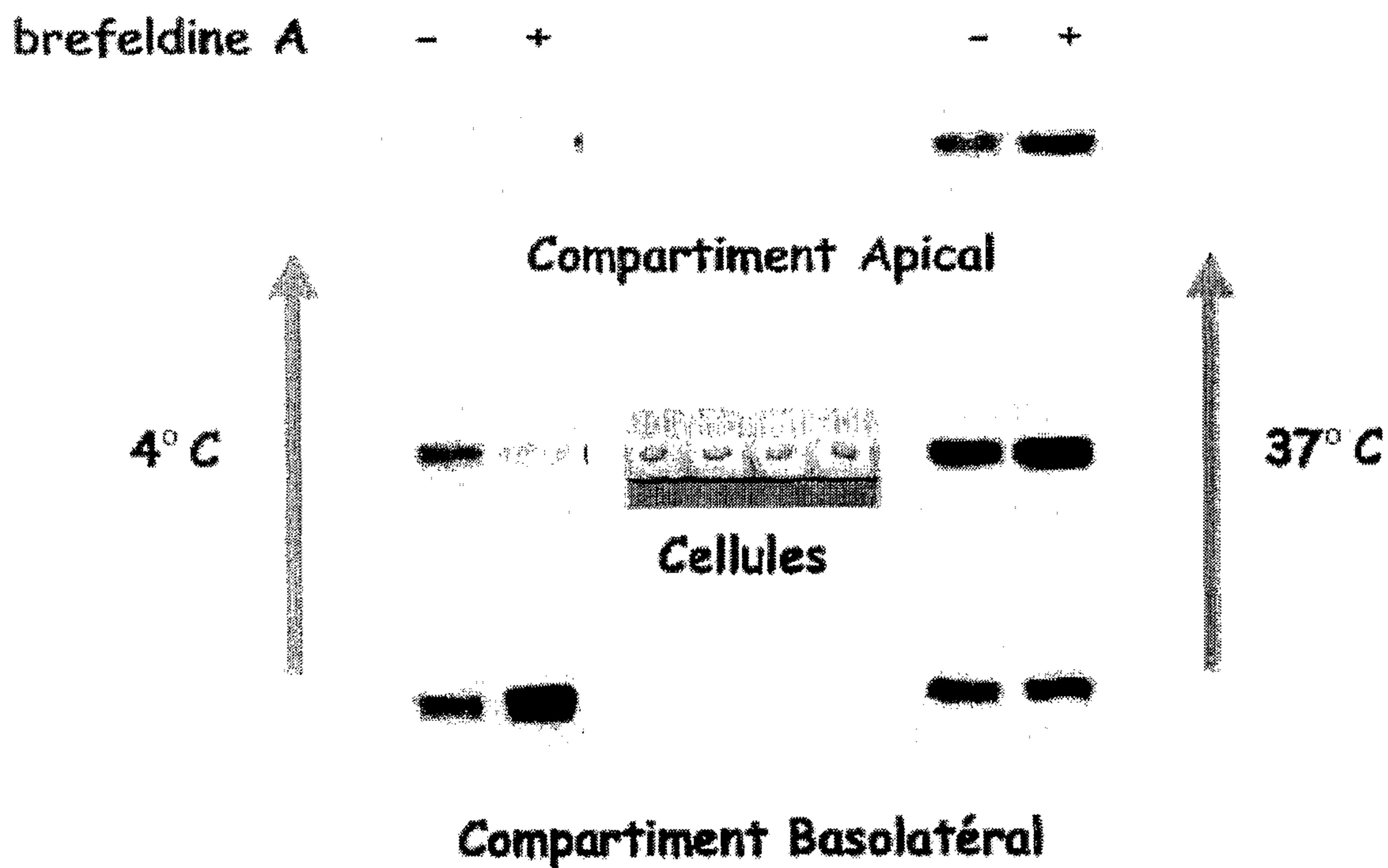
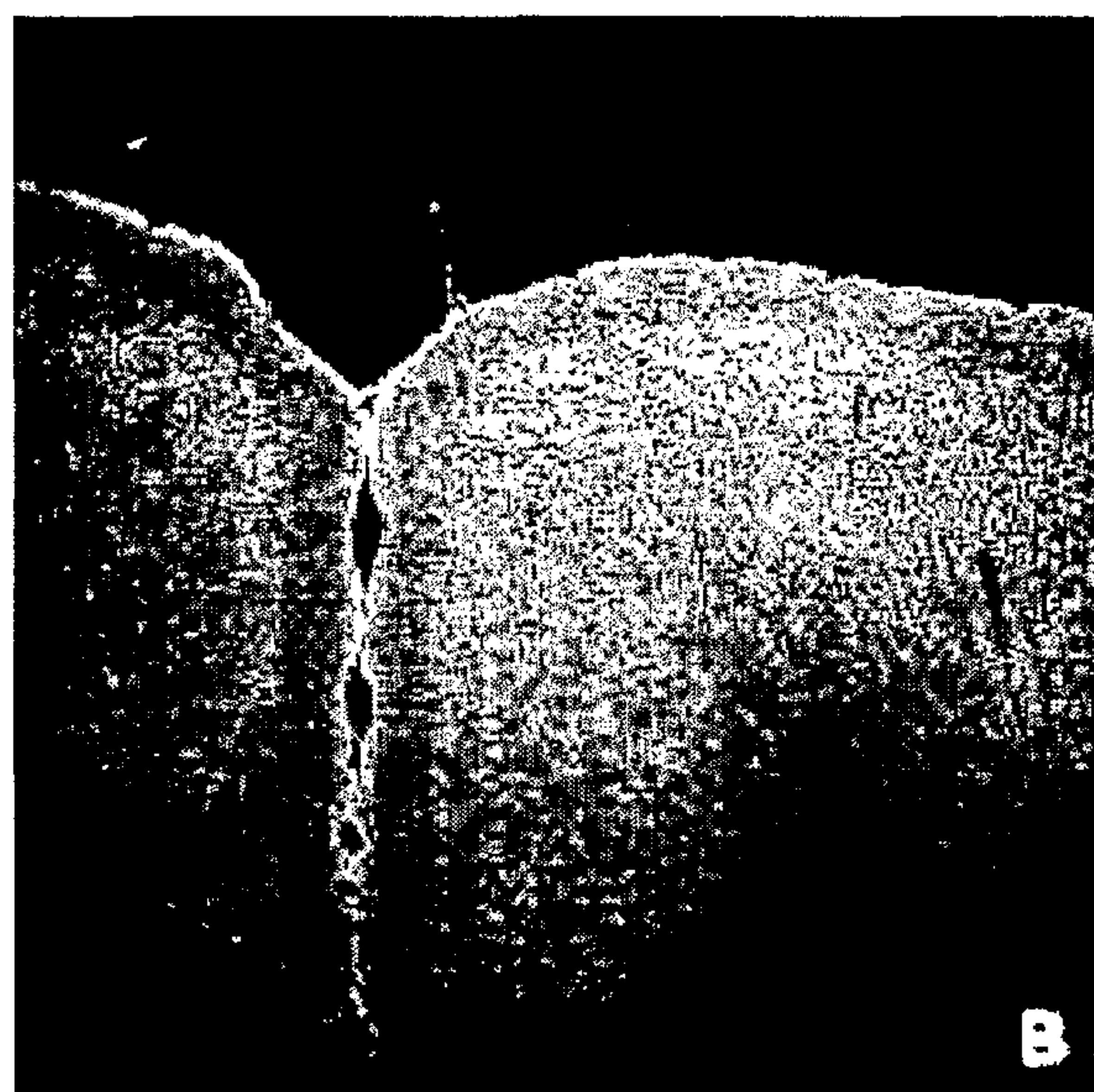
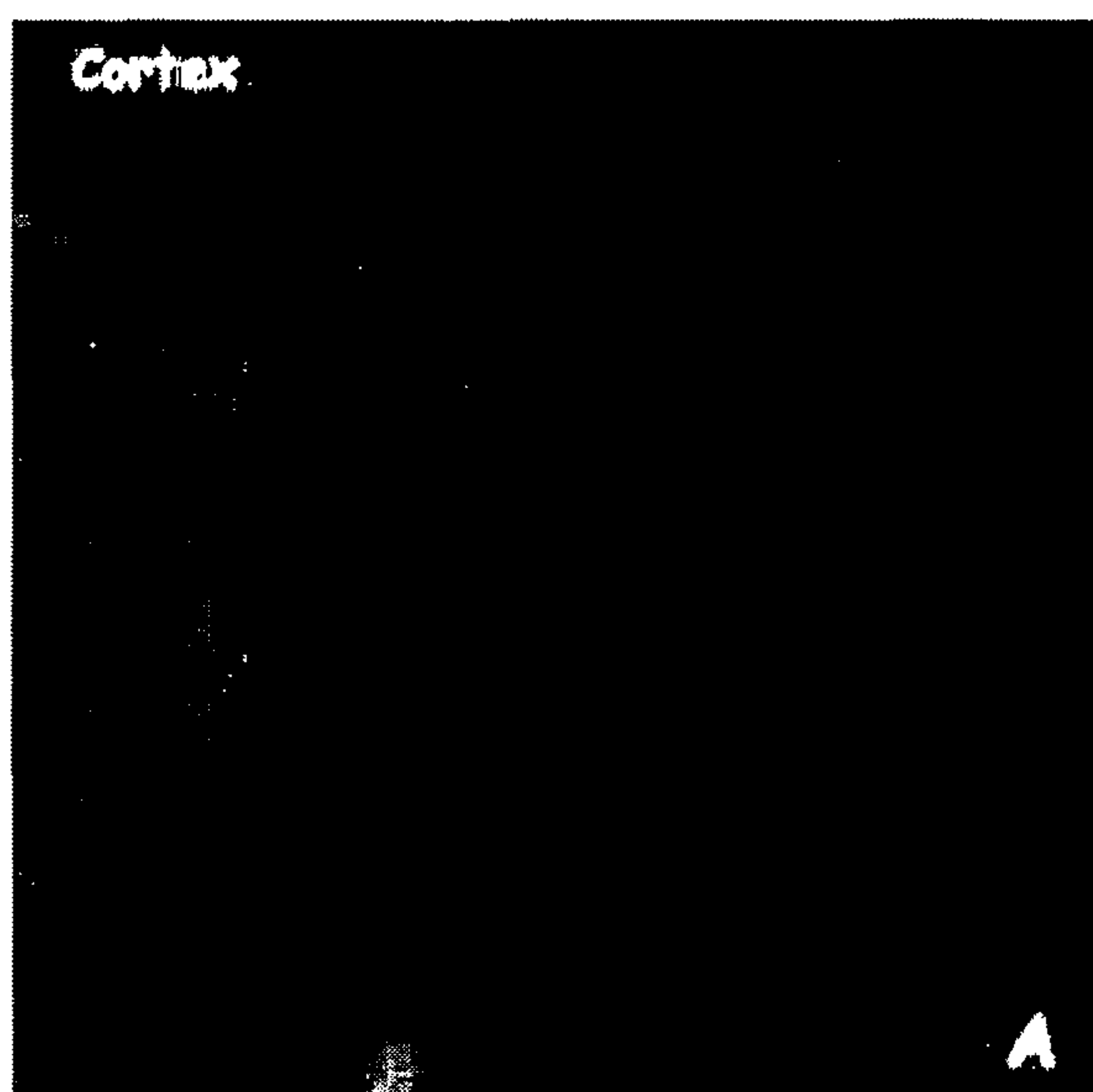


Figure 5

Injection intraveineuse contrôle (PBS)

Injection intraveineuse de NES-Pen



**Figure 6**