



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 359 810**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03769800 .8**

(96) Fecha de presentación : **16.10.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1551867**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2005**

(54) Título: **Uso de péptidos miméticos del ácido poli- α 2,8-siálico para modular funciones de NCAM.**

(30) Prioridad: **16.10.2002 EP 02292548**

(73) Titular/es:

**Centre National de la Recherche Scientifique
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR
Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II,
SCHAFER-N y
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2011

(72) Inventor/es: **Rougon, Geneviève;
Torregrossa, Pascal;
Schachner, Melitta y
Schafer Nielsen, Claus**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2011

(74) Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 359 810 T3

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

Uso de péptidos miméticos del ácido poli-Alfa 2,8-siálico para modular funciones de NCAM

- 5 La invención se refiere al uso de péptidos miméticos del ácido poli-(2,8 siálico (PSA) para modular funciones de NCAM dependientes específicamente de PSA *in vitro* e *in vivo* y a su aplicación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, lesiones del cerebro y de la médula espinal, problemas de aprendizaje y memoria relacionados con la edad y cáncer.
- 10 La capacidad de las células de modificar sus interacciones en la superficie celular con otras células, incluyendo neuronas y células gliales, es un componente crítico del desarrollo, remodelación y reparación del tejido nervioso, así como de la formación tumoral y metástasis. Entre muchas moléculas candidatas que están implicadas potencialmente en un proceso de esto tipo, las isoformas de la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), un miembro de la superfamilia de IgG, que portan un polímero de carbohidrato no convencional, ácido poli-(2,8-siálico (PSA), son de interés particular.
- 15 15 El PSA es un polímero de restos de ácido N-acetilneuramínico cargados negativamente (ácido siálico) en un enlace alfa 2,8. La cadena de PSA única transportada por NCAM, consiste generalmente en al menos 30 unidades de repetición con la longitud de la cadena variando considerablemente en NCAM aislada a partir de diversas fuentes (von Der Ohe et al, Glicobiology, 2002, 12, 47-63; Rougon et al, Eur. J. Cell. Biol., 1993a, 61, 197-207). Por comparación, el ácido poli-(2,8-siálico que se encuentra en la cápsula de bacterias tales como *Neisseria meningitidis* de Grupo B y *E. coli* K1 forma polímeros más largos de aproximadamente 200 unidades de repetición.
- 20 20 Los estudios que usan microscopía de NMR indican que PSA tiene una estructura helicoidal en solución que consiste en ocho o más unidades de ácido siálico contiguas (Rougon et al, 1993a, mencionado anteriormente; Yamasaki et al 1991). PSA tiene un volumen hidratado grande y una densidad de carga negativa elevada y, por lo tanto, está en condiciones de atenuar las fuerzas de adhesión y de regular negativamente las interacciones globales de la superficie celular (Rutishauser et al., Science, 1988, 240, 53-57). Todas las isoformas de corte y empalme alternativo conocidas de NCAM se pueden polisializar en el quinto dominio similar a Ig (Rougon et al, 1993a, mencionado anteriormente) y NCAM es la única transportadora identificada claramente de ácido polisiálico en el sistema nervioso (Rougon et al, J. Cell. Biol., 1986, 103, 2429-2437). Aunque existe un informe que describe la asociación de PSA con la cadena ζ del canal de Na (Zuber et al, J. Biol. Chem., 1992, 267, 9965-9971), la ausencia de inmunorreactividad de PSA en ratones knock-out de NCAM (Cremer et al, Nature, 1994367, 455-457) sugiere que NCAM es la transportadora principal si no la única de PSA en el cerebro de vertebrados.
- 25 30 35 40 45 50 Los estudios que usan microscopía de NMR indican que PSA tiene una estructura helicoidal en solución que consiste en ocho o más unidades de ácido siálico contiguas (Rougon et al, 1993a, mencionado anteriormente; Yamasaki et al 1991). PSA tiene un volumen hidratado grande y una densidad de carga negativa elevada y, por lo tanto, está en condiciones de atenuar las fuerzas de adhesión y de regular negativamente las interacciones globales de la superficie celular (Rutishauser et al., Science, 1988, 240, 53-57). Todas las isoformas de corte y empalme alternativo conocidas de NCAM se pueden polisializar en el quinto dominio similar a Ig (Rougon et al, 1993a, mencionado anteriormente) y NCAM es la única transportadora identificada claramente de ácido polisiálico en el sistema nervioso (Rougon et al, J. Cell. Biol., 1986, 103, 2429-2437). Aunque existe un informe que describe la asociación de PSA con la cadena ζ del canal de Na (Zuber et al, J. Biol. Chem., 1992, 267, 9965-9971), la ausencia de inmunorreactividad de PSA en ratones knock-out de NCAM (Cremer et al, Nature, 1994367, 455-457) sugiere que NCAM es la transportadora principal si no la única de PSA en el cerebro de vertebrados.
- 55 PSA-NCAM se re-expresa en varias situaciones patológicas tales como regeneración muscular, regeneración axonal y tumores cerebrales (Figarella-Branger et al, Cancer res, 1990, 50, 6364-6370; Dubois et al, Neuromuscul. Disord., 1994, 4, 171-182; Aubert et al, Comp. Neurol. 1998, 399, 1-19; Muller et al, Neuroscience, 1994, 61, 441-445) o enfermedades neurodegenerativas cerebrales (Le Gal La Salle et al., J. Neurosci., 1992, 12, 872-882). Basándose en estas observaciones, PSA-NCAM surgió como un factor permisivo importante para los cambios dinámicos en las interacciones de la superficie celular necesarias para la morfogénesis y la remodelación de tejido (Rougon et al, 1993b, mencionado anteriormente; Figarella-Branger, 1993; Rutishauser, Development, 1992, 99-104).
- 60 Muchos tumores con características neurales y endocrinas expresaban PSA-NCAM. Por ejemplo, PSA-NCAM se ha detectado en neuroblastomas y méduloblastomas (Figarella-Branger et al., mencionado anteriormente), carcinoma de células pequeñas del pulmón (Patel et al, Int. J. Cancer, 1989, 44, 573-578) y rabdomiosarcomas y posiblemente está relacionado con el potencial invasivo y metastático de estos tumores (Rougon et al.1993b, mencionado anteriormente).

5 Recientemente, la inyección de neuraminidasa en un modelo de ratón desnudo para metástasis mostró que la eliminación de PSA en el tumor primario retardaba la metástasis. (Daniel et al., *Oncogene*, 2001, 20, 997-1004). Por tanto, la molécula de PSA-NCAM y más precisamente el PSA de carbohidrato representa una de las dianas potenciales de enfoques terapéuticos futuros para promover la plasticidad y recuperación funcional después de daño cerebral o para evitar la formación de metástasis.

Por lo tanto, se han desarrollado varias estrategias para modular las funciones de PSA:

- 10 – manipulaciones genéticas: ratones knock-out para NCAM o polisialiltransferasa (Cremer et al, mencionado anteriormente): esta estrategia no abre perspectiva para terapia,
- 15 – digestión enzimática: endoneuraminidasa (Theodosis et al, mencionado anteriormente; Daniel et al, mencionado anteriormente): su potencial terapéutico es más bien limitado debido a su gran tamaño y a la difusión limitada *in vivo* y a la posibilidad de inducir una respuesta inmune,
- 20 – anticuerpos monoclonales anti-PSA (Monnier et al, *Developmental Biology*, 2001, 229, 1-14); su potencial terapéutico es más bien limitado debido a su naturaleza de anticuerpo,
- 25 – Ácido colomínico, un análogo de PSA aislado a partir de cápsula bacteriana; su potencial terapéutico está más bien limitado debido a su inestabilidad a pH ácido y a la imposibilidad de controlar su composición exacta en función de la pureza y homogeneidad (calibración de la longitud de la cadena de ácido siálico, de un lote a otro),
- 30 – N-butanoilmanosamina (ManBut), una molécula pequeña capaz de inhibir la biosíntesis de PSA *in vitro* (Mahal et al, *Science*, 2001, 294, 380-382); su actividad no se ha demostrado *in vivo*.

25 Sin embargo, hasta la fecha estas estrategias que se han usado para descubrir mecanismos de acción o funciones de PSA, no han conducido al descubrimiento de nuevos fármacos capaces de modular las funciones de PSA *in vivo*. Por lo tanto, existe una necesidad de moléculas nuevas capaces de modular específicamente las funciones de NCAM dependientes de PSA *in vivo*, que se puedan usar como composiciones farmacéuticas para promover la plasticidad y la recuperación funcional después de daño cerebral o de la médula espinal o para evitar metástasis.

35 Los péptidos que representan miméticos moleculares de epítopos de carbohidrato a partir de microorganismos incluyendo epítopos específicos de PSA de *Neisseria meningitidis* de Grupo B se han descrito con miras a desarrollar candidatos de vacuna seguros y eficaces frente a estos microorganismos (Shin et al, *Infection and Immunity*, 2001, 69, 3335-3342); los péptidos específicos de PSA de *Neisseria meningitidis* de Grupo B descritos en Shin et al, representan epítopos que son diferentes de los epítopos de PSA de las células de vertebrado (neuronas) y, por tanto, no inducen anticuerpos que se unen a dicho PSA neuronal (PSA unido a NCAM) y pueden provocar daño neurológico. Adicionalmente, Shin et al describen sólo dos péptidos (DHQRFFV (SEC ID Nº: 31) y AHQASFV (SEC ID Nº: 32) que representan miméticos de PSA unidos a epítopos de NCAM, que se usan como control para demostrar la especificidad de los péptidos miméticos de PSA de *Neisseria meningitidis* de Grupo B.

40 Los inventores han aislado otros péptidos que son miméticos moleculares de PSA unidos a epítopos de NCAM y los mismos han demostrado que estos péptidos miméticos de PSA son capaces de modular (potenciar o inhibir), *in vivo*, de una manera dependiente de PSA, los procesos celulares que normalmente están influidos por la polisialilación de NCAM. Por ejemplo, los inventores han demostrado un efecto significativo de los péptidos miméticos de PSA, *in vivo*, sobre el crecimiento, guía y fasciculación de los axones así como sobre la migración de las neuronas. Adicionalmente, la administración de péptidos miméticos de PSA da como resultado la recuperación funcional después de lesión de médula espinal y también está acompañada por una gliosis reactiva reducida en el sitio de la lesión.

45 50 En el contexto de la invención, ácido poli- α 2,8 siálico o PSA significa PSA unido a NCAM, a diferencia de otro PSA tal como PSA de cápsulas bacterianas.

55 Estos péptidos miméticos de PSA que son activos *in vivo* en dosis bajas (concentración μ M) y no muestran ninguna citotoxicidad son útiles para:

- 55 – el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Corea de Huntington, Alzheimer, esclerosis múltiple): los mismos son útiles como adyuvantes para terapia celular; injerto de progenitores neuronales (que expresan PSA) en combinación con péptidos miméticos de PSA mejorarían significativamente la migración de progenitores y la extensión de axones en las áreas dañadas del cerebro,
- 60 – el tratamiento de lesión cerebral y de médula espinal: los mismos promoverían la recuperación funcional después de daño cerebral o de la médula espinal aumentando la supervivencia y la regeneración de los axones,
- 65 – la prevención y tratamiento de problemas de aprendizaje y memoria relacionados con la edad: los mismos promoverían la plasticidad del sistema nervioso aumentando la neurogénesis o la plasticidad sináptica,

5 - el tratamiento de cáncer: los mismos evitarían la formación de metástasis inhibiendo la migración celular a partir de tumores que expresan PSA, por ejemplo tumores neuroectodérmicos.
Además de dicho uso terapéutico, los péptidos miméticos de PSA son útiles como herramientas complementarias para descubrir mecanismos de acción y funciones desconocidas del PSA de carbohidrato.

La presente invención se refiere a un péptido para uso como un medicamento para modular las funciones de NCAM, comprendiendo dicho péptido un epítopo B de un ácido poli- α 2,8 siálico unido a NCAM, que se reconoce por un anticuerpo anti-ácido poli- α 2,8 siálico y dicho péptido siendo seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 10 - los péptidos lineales de hasta 30 restos aminoacídicos, preferiblemente aproximadamente 12 restos aminoacídicos, que comprenden al menos una de las secuencias SEC ID N°: 1 a 12, 14 y 15, que corresponden respectivamente a: DSPLVPFIDFHP, LWQPPLIPGIDF, QIEPWFTPEDFP, TRLAPLVFPLDY, SWLQMPWALVRT, EIHLRMKIQITI, WHLEYMWRWPRL, LIEQRLPKHILT, YETSSSRLLAYA, TLASQLSNTSAY, SDQGVNGWSNSP, WHNWNLWAPASPT, IKSPLTWLVPDD y SHLDLSTGHRTS, y
- 15 - los péptidos cíclicos de hasta 30 restos aminoacídicos, preferiblemente aproximadamente 12 restos aminoacídicos, que comprenden al menos una de las secuencias SEC ID N°: 16 a 26, correspondiendo respectivamente a: CYPLNPEVYHCG, CWPLSHSVIVCG, CSSVTAWTTGCG, CYMASGVFLCG, CWPLG PSTYICG, CSLIASMETGCG, CSKIASMETGCG, CYIGDPPFNPCG, CWPLGDSTVICG CPLRLAFTFGCG y CTRMSHGYWICG.
- 20 El "epítopo B reconocido por un anticuerpo anti-PSA" se refiere a un péptido que reacciona específicamente y selectivamente, *in vitro* e *in vivo* con el parátopo de un anticuerpo producido por células linfoides en respuesta a una estimulación con ácido poli- α 2,8 siálico como un inmunógeno. Los anticuerpos anti-PSA preparados mediante técnicas convencionales, siguiendo los protocolos como se ha descrito, por ejemplo, en Antibodies: A Laboratory Manual, E. Howell y D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 se conocen bien en la técnica; los mismos incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales 735 (Frosch et al, P.N.A.S; 1985, 82, 1194-1198), 30H12 (Coquillat et al, Infect. Immun., 2001, 69, 7130-7139) o MenB (ABCYS AbC0019; Rougon et al, J. Cell. Biol., 1986, 103, 2429-2437).
- 25

30 La invención incluye el uso de péptidos lineales y cíclicos. Los péptidos cíclicos preferidos como se definen en la invención comprenden péptidos en los que la cadena lateral de un aminoácido en la cadena peptídica está unida covalentemente a la cadena lateral de otro aminoácido en la cadena peptídica a través de la formación de un enlace covalente, tal como un puente de disulfuro entre dos restos de cisteína.

35 Los péptidos como se definen en la invención se refieren a péptidos que tienen las siguientes actividades:

- 40 - actividad de unión a anticuerpo: los mismos se reconocen específicamente por un anticuerpo monoclonal o policlonal anti-PSA, y
- actividad biológica: los mismos tienen la actividad de modular (potenciar o inhibir) las funciones de NCAM dependientes de PSA.

45 Los péptidos como se definen en la invención se denominan en lo sucesivo en este documento péptidos miméticos de PSA, péptidos miméticos o péptidos. A menos que se especifique de otra manera, dichos péptidos son lineales o cíclicos.

50 La actividad de unión a anticuerpo de los péptidos miméticos se verifica mediante inmunoensayo convencional que se conoce bien por un experto en la materia; por ejemplo, se observa una unión del péptido del 100% a concentraciones de 10^4 M y superiores en un ELISA con un anticuerpo monoclonal anti-PSA a la concentración de 2,5 μ g/pocillo y esta actividad de unión a anticuerpo se inhibe específicamente por un análogo de PSA tal como ácido colomínico.

- 55 La actividad biológica de los péptidos miméticos se verifica mediante ensayos de crecimiento celular y migración celular *in vitro* o *in vivo*, que son bien conocidos por un experto en la materia; por ejemplo, los ensayos sobre neuronas primarias de diferentes fuentes (ganglio de la raíz dorsal, neuronas cerebelares, retina,...) muestran los siguientes efectos:
- un aumento significativo dependiente de la dosis de la longitud de neurita *in vivo* e *in vitro*,
- un efecto significativo sobre la guía axonal *in vivo* e *in vitro* (desfasciculación de los axones), y
- un aumento o inhibición significativos de la migración celular.

60 Adicionalmente, los ensayos funcionales que incluyen el estudio de la recuperación funcional a partir de hemi-sección de médula espinal mediante ensayos bien conocidas (ensayo BBB: ensayo de Basso, Beattie y Bresnahan; Basso et al, Restor. Neurol. Neurosci, 2002, 5, 189-218; ensayo de rodillo giratorio) muestran una recuperación significativa locomotora y de la coordinación motora fina en los animales tratados con péptido mimético, en comparación con los animales tratados con un péptido no relevante.

La actividad biológica del péptido mimético se inhibe específicamente mediante digestión enzimática con endoneuraminidasa y está ausente en los ratones knock-out de NCAM.

5 Preferiblemente, dicho péptido consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID Nº: 1 a 12 y SEC ID Nº: 14 a 26.

Más preferiblemente, dicho péptido se selecciona entre el grupo que consiste en:

10 - un péptido lineal que presenta SEC ID Nº: 1 (DSPLVPFIDFHP) denominado en lo sucesivo en este documento p21, y
- un péptido cíclico en el que la cadena lateral del resto de cisteína en la posición 1 de SEC ID Nº: 18 (CSSVTAWTTGCG) o SEC ID Nº: 22 (CSKIASMETGCG) está unida covalentemente al resto de cadena lateral de la cisteína en la posición 11 de SEC ID Nº: 18 o SEC ID Nº: 22 a través de un puente de disulfuro; dichos péptidos se denominan en lo sucesivo en este documento p65 y p66.

15 De acuerdo con una realización provechosa de la invención, dicho péptido está asociado con otro péptido o molécula no peptídica y/o incorporado en un soporte adecuado que incluye por ejemplo, polímeros, vesículas lipídicas, microesferas, proteínas y similares. Preferiblemente, el otro péptido o molécula no peptídica y/o el soporte como se ha definido anteriormente permite que el péptido mimético atraviese la barrera hematoencefálica.

20 Tal asociación que puede mejorar la solubilidad, absorción, biodisponibilidad, semi-vida biológica del péptido se forma usando técnicas bien conocidas en la técnica; puede ser a través de, sin limitación, formación de enlace covalente (por ejemplo, enlace de amida, puente de disulfuro) o a través de quelación, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, formación de enlaces de hidrógeno, interacciones ión-dipolo, interacciones dipolo-dipolo o cualquier combinación de los anteriores.

25 De acuerdo con otra realización provechosa de la invención, dicho péptido se incorpora en un complejo que comprende una pluralidad de péptidos idénticos o diferentes de acuerdo con la invención, unidos mediante enlaces covalentes o no covalentes.

30 El péptido como se define en la invención se puede asociar con un marcador tal como un marcador fluorescente, para facilitar la detección de dicho péptido o el mismo se puede incluir en una proteína de fusión, para permitir la expresión de dicho péptido.

35 De acuerdo con otra realización provechosa de la invención, dicho péptido es para la prevención y/o el tratamiento de una afección patológica seleccionada entre el grupo que consiste en: enfermedades neurodegenerativas, lesiones cerebrales y de médula espinal, problemas de aprendizaje y memoria relacionados con la edad.

De acuerdo con otra realización provechosa de la invención, dicho péptido es para la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

40 Los péptidos como se define en la presente invención se pueden preparar mediante cualquier proceso adecuado. Preferiblemente, se obtiene mediante síntesis química en fase líquida o sólida mediante acoplamientos sucesivos de los diferentes restos aminoacídicos que se tienen que incorporar (desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal en fase líquida o desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal en fase sólida) donde los extremos N-terminales y las cadenas laterales reactivas previamente se bloquean mediante grupos convencionales. Para síntesis en fase sólida se puede usar la técnica descrita por Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85, 2149-2154).

45 Los péptidos como se definen en la presente invención también se pueden obtener mediante tecnología de ingeniería genética. Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la invención se pueden obtener mediante métodos bien conocidos de tecnología de ADN recombinante y/o síntesis de ADN química. Un ejemplo típico comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho péptido, en condiciones adecuadas para la expresión del péptido y recuperar el péptido del cultivo de la célula hospedadora. El péptido se puede incluir en una proteína de fusión clonando un ADNc en un vector de expresión en fase con un polinucleótido que codifica el péptido de la invención. Como alternativa, también se pueden producir multímeros de péptidos idénticos o diferentes mediante la expresión de un polinucleótido que codifica copias múltiples de un monómero o que codifica diferentes monómeros.

55 El medicamento de acuerdo con la invención comprende una cantidad eficaz del péptido o el complejo peptídico como se ha definido anteriormente, en una combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable.

60 Los transportadores del medicamento de la invención pueden ser cualquier vehículo para administración parenteral, intra-tecal, oral, mediante aerosol, nasal u ocular de fármacos que actúa sobre el sistema nervioso. Por ejemplo, el medicamento de acuerdo con la invención se administra por vía intra-tecal lo cual permite la penetración de la composición directamente al Sistema Nervioso Central. Como alternativa, se administra a través de la nariz que permite la penetración de la composición en aerosol al Sistema Nervioso Central a través del nervio olfatorio o a través de la vía ocular o mediante cualquier otro método adecuado de administración como se describe en W.M. Pardridge, Peptide drug Delivery, Raven Press, Nueva York, 1991.

La cantidad de péptido en el medicamento está en unos intervalos de concentración de aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 10 μ M. La frecuencia preferida de administración y la dosis eficaz variará de un sujeto a otro.

- 5 Los péptidos como se definen en la invención tienen las siguientes ventajas:
- los mismos son activos *in vivo* en dosis bajas (concentración 0,5 μ M),
 - los mismos son estables *in vivo*,
 - los mismos son muy eficaces *in vivo* ya que los mismos actúan extracelularmente; por tanto, su actividad no está limitada por su capacidad de penetrar dentro de la célula,
- 10 - los mismos no son tóxicos, y
- los mismos se pueden producir fácilmente en grandes cantidades.
- 15 La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante la descripción adicional y los dibujos a continuación, que se refieren a ejemplos que ilustran el aislamiento, la especificidad de unión y los efectos biológicos de los péptidos miméticos de PSA de acuerdo con la invención. Sin embargo, se ha de apreciar que estos ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ilustración de la invención y no constituyen de ninguna manera una limitación de la misma.
- 20 - La Figura 1 ilustra la estructura de PSA-NCAM.
- La Figura 2 ilustra el efecto de péptidos miméticos de PSA p65 y p66, sobre la extensión de neurita *in vitro*: explantes de ganglio de raíz dorsal de ratón (E13,5) se cultivaron en ausencia (A, D) o presencia de los péptidos p65 y p66 aplicados como recubrimiento en las microplacas como conjugado de BSA (B,E) o en forma soluble (C,F). (G) cuantificación del efecto de péptidos miméticos sobre la longitud media de la neurita más larga. ***P< 0,001 comparado con control con ensayo t de Student. (H) representación de la distribución de frecuencia acumulativa de la longitud media de la neurita más larga.
- 25 - La Figura 3 ilustra el efecto del péptido mimético de PSA p65 sobre la fasciculación y la guía *in vivo*: preparación montada de retina completa de pollo E9 (A) y su dibujo esquemático que demuestra la posición del cristal Dil (B). El rectángulo de puntos indica el área de la que se tomaron fotografías. Las flechas apuntan hacia la fisura óptica. Axones de retina de pollo E9 inyectada en E3 con el péptido inverso (C,F) o el péptido p65 (D,G,E,H). Las puntas de las flechas muestran los ejemplos de axones que dejan su fascículo y se extienden perpendicularmente al mismo.
- 30 - Las Figuras 4 a 7 ilustran el efecto de péptidos miméticos de PSA sobre la migración celular *in vitro*, analizadas en explantes de zona sub-ventricular (P1) a partir de ratones normales (NCAM +/+), ratones heterocigotos (NCAM +/-) o ratones knock-out (NCAM -/-), cultivados en presencia de los péptidos miméticos (p65, p21, p66), forma diferente de dichos péptidos (cíclicos, lineales, lineales y acetilados), los péptidos de control (p65 inverso y p66 y p22 inversos) o endosialidasa N:
- 35 - La figura 4 ilustra el efecto del péptido p65 inverso (A,D), endosialidasa N (B,E) o los péptidos miméticos p65 y p66 (C,F). (G) cuantificación del efecto de los péptidos miméticos sobre la distancia media de migración celular. ***P< 0,001 en comparación con control con ensayo t de Student. (H) representación de la distribución de frecuencia acumulativa de la distancia media de migración. (I) Efecto dependiente de la dosis del péptido p65 sobre la distancia media de migración celular,
- 40 - La figura 5 ilustra el efecto de formas diferentes de péptido mimético p65 (cíclico, lineal, lineal y acetilado) sobre la distancia media de migración celular, en comparación con el péptido de control p65 inverso. *** P< 0,001 en comparación con el control con ensayo t de Student,
- 45 - La figura 6 ilustra el efecto de péptido mimético p65 sobre la distancia media de migración celular en ratones knock-out (NCAM -/-) o ratones heterocigotos (NCAM +/-). Células tratadas con Endo N a partir de ratones NCAM +/- y células tratadas con p65 inverso se incluyen para comparación. ***P< 0,001 en comparación con control con ensayo t de Student, y
- 50 - La figura 7 ilustra el efecto de los péptidos miméticos p65 y p21 sobre la distancia media de migración celular. Células tratadas con Endo N y células tratadas con péptidos de control (p65 y p22 inverso) se incluyen para comparación. ***P< 0,001 en comparación con control con ensayo t de Student.
- 55 - La Figura 8 ilustra el efecto de péptidos miméticos de PSA p65 sobre la migración celular *in vivo*: (A) dibujo esquemático del trasplante. (B) Fotografía de microscopía confocal de un corte que muestra la RMS (Corriente de Migración Rostral) de ratones injertados en presencia de péptido p65. Las puntas de las flechas muestran los ejemplos de células positivas de GFP y PSA. Explantes de SVZ (PI) se injertaron en presencia del péptido inverso (C,D) o el péptido p65 (E,F) y los cerebros se analizaron tres días después del injerto (C,E) o cuatro días después del injerto (D,F).

(G) cuantificación del efecto del péptido p65 sobre el número de células positivas de GFP que alcanzan el bulbo olfatorio tres días después del injerto. *P< 0,05 en comparación con el control con ensayo t de Student.

5 - La Figura 9 ilustra el protocolo usado para analizar la recuperación funcional de lesión de médula espinal después de inyección de péptido p65 o péptido inverso p65 tomado como control.

10 - La Figura 10 ilustra la recuperación funcional a partir de lesión de médula espinal después de la inyección de péptido p65 (p65) o péptido inverso p65 (Inv) tomado como control. A: Ensayo de Basso, Beattie y Bresnahan (ensayo BBB). B: Ensayo de rodillo giratorio. n = 11 para p65 y n = 8 para Inv. ***P< 0,01, **P< 0,01, *P< 0,05, en comparación con el control con ensayo t de Student.

15 - La Figura 11 ilustra la disminución de gliosis reactiva después de la lesión de médula espinal, en ratones tratados con péptido p65 o péptido inverso p65 tomado como control. A: análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-GFAP y anti-PSA solos o en combinación (doble marcación). B: cuantificación de la tinción de GFAP. *P< 0,05, en comparación con el control con ensayo t de Student.

- La Figura 12 ilustra la especificidad de unión de los péptidos miméticos cílicos:

20 - Figura 12A: ELISA usando placas recubiertas con anticuerpos monocionales anti-PSA 30H12. Los números 1 a 16 corresponden a las secuencias peptídicas presentadas en la Tabla IV.

- Figura 12B, 12C y 12D: unión competitiva a células que expresan PSA-NCAM. B: pre-incubación de p65 (1 mM) o p66 (1 mM) con anticuerpo anti-PSA MenB. C: anticuerpo anti-PSA 30H12 sin péptido. D: pre-incubación de p65 (1 mM) o p66 (1 mM) con anticuerpo anti-PSA 30H12.

25 **EJEMPLO 1: EXPLORACIÓN DE BIBLIOTECA DE PÉPTIDOS CON ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-PSA**

1) Materiales y Métodos

1.1) Materiales

30 - Biblioteca de Presentación en Fago de Péptido de 12 unidades

35 Se exploraron dos bibliotecas. La primera biblioteca (12TM Phage Display peptide Library, NEW ENGLAND BIOLABS) comprende péptidos lineales de 12 unidades presentados en la superficie de partículas de fago similares a M13 como proteínas de fusión al extremo N de la proteína de cubierta menor pIII (5 copias/partícula de fago). La varianza de la biblioteca difiere de 10⁸ a 10⁹ péptidos con longitud de secuencia constante.

40 La segunda biblioteca, preparada como se ha descrito en Felici et al. (J. Mol. Biol., 1991, 222, 301-301), comprende péptidos cílicos de 2 unidades que incluyen 2 restos de cisteína en la posición 1 y 11 unidos mediante un puente de disulfuro, presentados sobre la superficie de partículas de fago similares a M13 como proteínas de fusión al extremo N de la proteína de cubierta mayor pVIII (100 copias/fago). La biblioteca comprende aproximadamente 10⁸ péptidos con longitud de secuencia constante.

45 - Anticuerpos monoclonales Anti-PSA (mAb)

50 Se usan anticuerpos monoclonales anti-PSA, preparados mediante técnicas convencionales como se describe en Antibodies: A Laboratory Manual, E. Howell and D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos monoclonales 735 (Frosch et al., P.N.A.S.;1985, 82, 1194-1198), 30H12 (IgG 2a; Coquillat et al., Infect. Immun., 2001, 69, 7130-7139) o MenB (IgM; ABCYS AbC0019).

- placas (MaxisorpTM NUNC)
 - tubos (MaxisorpTM, NUNC)
 - E.coli cepa ER2537 (NEW ENGLAND BIOLABS)
 - cebador de secuenciación 96 qIII (NEW ENGLAND BIOLABS)

55 5' CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' (SEC ID Nº: 27)

1.2) Tampones

60 - Solución de bloqueo: BSA al 0,5% en PBS
 - Solución de recubrimiento: 25 µg/ml de mAb anti-PSA en PBS.
 - TBS: Tris-HCl 50 mM pH 8,6, NaCl 150 mM.
 - TBST: TBS que contiene Tween 20 al 0,1% o al 0,5%.

- PEG/NaCl: polietilen glicol-8000 al 20% (p/v), NaCl 2,5 M.
 - Tampón Ioduro: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 4M.

1.3) Método

5 Tubos MaxisorpTM se incubaron durante una noche con 2 ml de solución de recubrimiento, a 4°C, con agitación suave, de acuerdo con el manual del kit Ph.D. 12TM Phage Display peptide Library (NEW ENGLAND BIOLABS). La solución de recubrimiento se retiró y se usó para el recubrimiento de tubos nuevos para ciclos nuevos de bioselección. Los tubos recubiertos se incubaron con 2 ml de solución de bloqueo durante 1 h y se lavaron 6 veces con TBST. Los tubos se 10 llenaron con 2 ml de solución de fago ($7,5 \cdot 10^{10}$ pfu/ml en TBST que contenía Tween 20 al 0,1%) y se incubaron con agitación suave a temperatura ambiente durante 1 h. Después de retirar la solución de fago, los tubos se lavaron 10 veces con TBST. Los fagos unidos se eluyeron, específicamente con ácido colomínico 1 mM en TBS durante 1 h o 15 inespecíficamente con glicina HCl 0,2 M (pH 2,2) durante 10 min con neutralización inmediata con Tris-HCl 1 M. Los eluidos se amplificaron en 20 ml de cultivo de *E. coli* ER2537 (OD₆₀₀ de partida: 0,03), durante 4,5 h a 37°C con agitación vigorosa. Los cultivos se centrifugaron durante 10 min a 10.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo fresco y se centrifugó durante 10 minutos adicionales. Se añadió solución de PEG/NaCl al sobrenadante (1 volumen de PEG/NaCl para 6 volúmenes de sobrenadante) y el fago se precipitó durante una noche a 4°C. La solución que contenía precipitado se centrifugó durante 15 min a 10.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se decantó y el sedimento se suspendió en 1 ml de PBS y se volvió a precipitar con 1/6 volumen de PEG/NaCl durante 1 h en hielo. Después de la 20 centrifugación, el sedimento se suspendió finalmente en 200 ml de TBS, Na₃N al 0,02%.

Este eluido amplificado se disolvió en TBST y se llevaron a cabo un segundo y tercer ciclo de bioselección como se ha descrito anteriormente; para el segundo ciclo, el TBST usado para el lavado y la incubación de fago contenía Tween 20 al 0,1%; en el tercer ciclo el contenido fue del 0,5%.

25 25 El eluido no amplificado a partir del tercer ciclo se tituló posteriormente en placas LB/IPTG/X-gal. Se escogieron placas azules y el clon de fago se amplificó en 2 ml de cultivo de *E. coli* ER2537 durante 4,5 h a 37°C, con agitación vigorosa. Despues de la centrifugación durante 10 min a 10.000 rpm a 4°C, el sobrenadante se mezcló con 1/6 volumen de PEG/NaCl y el fago se precipitó a 4°C durante una noche. El precipitado se centrifugó durante 15 min a 10.000 rpm a 4°C. El sedimento se suspendió en 100 µl de TBS. 10 µl de esta solución se mezclaron con 100 µl de tampón ioduro y 250 µl de etanol para la precipitación del ADN de fago de cadena única. Despues de la incubación durante 10 min a temperatura ambiente, la solución se centrifugó durante 10 min a 15.000 rpm. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó en etanol al 70% y se secó brevemente bajo vacío. El sedimento se suspendió en 10 µl de agua destilada que contenía el cebador de secuenciación para secuenciación automatizada del inserto peptídico (secuenciación de ciclo BigDye Terminator con cebador M13-40 convencional en un Applied Biosystem 377/377). La solución de fago único restante se usó para experimentos de ELISA.

2) Resultados

40 40 Despues de tres ciclos de bioselección, los fagos que presentan las siguientes secuencias se aislaron (Tabla I, II, III y IV).

Tabla I: Secuencias de péptidos lineales aislados a partir de 17 fagos diferentes eluidos con ácido colomínico 1 mM

SEC ID Nº:	Secuencia
5	SWLQMPWALVRT
5	SWLQMPWALVRT
4	TRLAPLVFPLDY
6	EIHLRMIKQITI
7	WHLEYMWRWPRL
5	SWLQMPWALVRT
5	SWLQMPWALVRT
8	LIEQRLPKHILT
9	YETSSSRLLAYA

SEC ID Nº:	Secuencia
5	SWLQMPWALVRT
10	TLASQLSNTSAY
5	SWLQMPWALVRT
11	SDQGVNGSWSNP
4	TRLAPLVFPLDY
5	TRLAPLVFPLDY
5	SWLQMPWALVRT
4	TRLAPLVFPLDY

Tabla II: Secuencias de péptidos lineales aislados a partir de 20 fagos diferentes eluidos con glicina 0,2 M.

SEC ID Nº:	SEC ID Nº
1	DSPLVPFIDFHP
2	LWQPPLIPGIDF
2	LWQPPLIPGIDF
12	WHNWNLWAPASPT
3	QIEPWFTPEDFP
1	DSPLVPFIDFHP
3	QIEPWFTPEDFP
13 ¹⁾	WHWQWTPWSIQP
2	LWQPPLIPGIDF
5	SWLQMPWALVRT
2	LWQPPLIPGIDF
1	DSPLVPFIDFHP
15	SHLDLSTG H RTS
1	DSPLVPFIDFHP
1	DSPLVPFIDFHP
5	SWLQMPWALVRT
1	DSPLVPFIDFHP
14	IKSPLTWLVPPD
1	DSPLVPFIDFHP
1	DSPLVPFIDFHP

¹⁾no es parte de la invención

5 péptidos lineales tienen una aparición elevada en los fagos aislados después de tres ciclos de bioselección (Tabla III).

Tabla III: Alineación de las 5 secuencias lineales más frecuentes

Frecuencia	SEC ID Nº:	Secuencia												
9/40	5	S	W	L	Q	M	P	W	A	L	V	R	T	
8/40	1	D	S	P	L	V	P	F	I	D	F	H	P	
4/40	4	T	R	L	A	P	L	V	F	P	L	D	Y	
4/40	2	L	W	Q	P	P	L	I	I	G	I	D	F	
2/40	3	Q	I	E	P	W	F	T	P	E	D	F	P	

5 Una alineación en la página de inicio de GeneStream Align a la SEC ID Nº: 1, mostró que la similitud de secuencia varía del 42,9 % para SEC ID Nº: 2, el 30,8 % para SEC ID Nº: 3, el 28,6 % para SEC ID Nº: 4, al 8,3 % para SEC ID Nº: 5.

34 clones de fago que presentan péptidos cílicos unieron el anticuerpo de una manera dependiente de la dosis 10 después de tres ciclos de bioselección y no se unieron a un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo. Los AND de 16 de estos clones que muestran el valor más alto en el ensayo de ELISA se prepararon y secuenciaron (Tabla IV). 3 clones mostraron la misma secuencia (SEC ID Nº: 17) y el motivo dimérico WP se encontró en 5 clones.

Tabla IV: Secuencias de péptidos cílicos aisladas de fagos

SEC ID Nº:	nº de péptido	Secuencia
SEC ID Nº: 16	2	CYPLNPEVYHCG
SEC ID Nº: 17	3	<u>CWPLSHSVIVCG</u>
SEC ID Nº: 17	5	<u>CWPLSHSVIVCG</u>
SEC ID Nº: 18	6 (p65)	CSVTAWTTGCG
SEC ID Nº: 19	8	CYMASGVFLCG
SEC ID Nº: 17	9	<u>CWPLSHSVIVCG</u>
SEC ID Nº: 20	10	<u>CWPLGPSTYICG</u>
SEC ID Nº:21	11 (p66)	CSLIASMETGCG
SEC ID Nº: 22		CSKIASMETGCG
SEC ID Nº: 16	12	CYPLNPEVYHCG
SEC ID Nº: 23	13	CYIGDPPFNPCG
SEC ID Nº: 24	14	CWPLGDSTVICG
SEC ID Nº: 25	15	CPLRLAFTFGCG
SEC ID Nº: 26	16	CTRMSHGYWICG

15

EJEMPLO 2: ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD DE PÉPTIDOS MEDIANTE ELISA DE FAGO COMPETITIVO

1) Materiales y Métodos

20 1.1) Materiales

- anticuerpo monoclonal anti-PSA 735 ó 30H 12
- placas Maxisorp™ (NUNC) para recubrimiento de anticuerpo: placas ELISA
- placas de microtitulación (NUNC) para dilución de fago: placas de dilución
- bacteriófagos M 13 que presentan péptidos de las Tablas III y IV del ejemplo 1
- anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (PHARMACIA 27-9411-01)
- ABTS [ácido 2,2'Azino-bis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfónico), SIGMA]
- Ácido colomínico (SIGMA)

- Dextrano (SIGMA)

1.2) Tampones

- 5 - PBS pH 7,4
 - Solución de bloqueo: BSA al 0,5 % en PBS
 - TBS
 - TBST: TBS que contiene Tween 20 al 0,05 %
 - Solución de anticuerpo anti-M13 conjugado con Peroxidasa de Rábano Picante: 1/5000 en TBST
 10 - Solución de sustrato de Peroxidasa de Rábano Picante (HRP): 22 mg de ABTS en 100 µl de citrato de sodio 50 mM pH 4,0. Antes de la reacción enzimática, añadir 36 ml de H₂O₂ al 30% a 21 ml de solución de ABTS.
 - solución competitidora: ácido colómico 1 mM en TBST
 - solución de control: dextrano 1 mM en TBST

15 1.3) Método

Pocillos de placa Maxisorp™ se recubrieron con 100 µl de solución de mAb (25 µ/ml) durante 2 h a temperatura ambiente. Los pocillos de control se recubrieron únicamente con la solución de bloqueo. Paralelamente, las placas de dilución de fago se bloquearon con 200 µl de solución de bloqueo durante 2 h. Los pocillos recubiertos con anticuerpo y los pocillos de control de las placas de ELISA se bloquearon con 200 µl de solución de bloqueo durante 1 h. Paralelamente, las placas de dilución de fago se lavaron 6 veces con TBST y se añadieron 120 µl de TBST a los pocillos. Un volumen apropiado de una solución de fago se añadió al primer pocillo y el volumen se ajustó a 140 µl con TBST. La solución de fago en el pocillo uno se diluyó en la proporción 1/7 extrayendo 20 µl del primer pocillo y transfiriéndolo al segundo, también para conseguir el volumen total del 140 µl. Esto se repitió para los pocillos restantes. 20 Las diluciones de fago para los pocillos de control se realizaron de la misma manera. La placa de ELISA bloqueada se lavó 6 veces con TBST y se añadieron las diluciones de fago o la solución competitidora. Después de incubación durante 1 h las placas se lavaron 10 veces con TBST. Después de incubación durante 1 h, los pocillos se lavaron 10 veces con TBST. Se añadieron 100 µl de la solución de anticuerpo M13 conjugado con HRP a los pocillos. Después de incubación 25 durante 1 h, los pocillos se lavaron 10 veces con TBST y se añadieron 100 µl de la solución de sustrato de HRP (con H₂O₂) a los pocillos. Las placas se leyeron a 405 nm usando un lector de microplacas.

2) Resultados

35 La especificidad de unión de los péptidos de SEC ID Nº: 1 a 5 del ejemplo I se ensayó en un ELISA competitivo usando ácido colomínico como competidor. Los resultados presentados en las Tablas V a IX se expresan como porcentaje de unión, en comparación con el fago que presenta SEC ID Nº: 5 en una concentración de 710 ng/pocillo (100 %).

Tabla V: Unión de fago que presenta SEC ID Nº: 5 a mAb 735

	Concentración de fago (ng/pocillo)						
	710	109	18	3	1	0	0
fago	100±3	102±0	98±0	73±4	18±2	4±3	2±1
fago + ácido colomínico	106±0	103±5	90±0	36±0	5±0	1±0	1±0
fago + dextrano	102 ± 2	103 ± 1	97 ± 1	62 ± 1	14± 0	5 ± 0	1± 0
fago + BSA	5 ± 1	3 ± 1	1± 0	1 ± 0	0± 0	0 ± 0	0 ± 0

40 **Tabla VI: Unión de fago que presenta SEC ID Nº: 1 a mAb 735**

	Concentración de fago (ng/pocillo)						
	1003	154	26	4	1	0	0
fago + mAb735	108± 2	111 ± 7	111 ± 3	112 ± 12	86 ± 15	28 ± 2	7 ± 0
fago + ácido colomínico + mAb735	108 ± 0	109 ± 12	90 ± 3	42 ± 3	12 ± 1	2 ± 1	0 ± 0
fago + dextrano + mAb735	109 ± 6	110 ± 6	112 ± 5	107 ± 1	77 ± 4	24 ± 4	8 ± 0
fago + BSA	10 ± 1	4 ± 1	3 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tabla VII: Unión de fago que presenta SEC ID N°: 4 a mAb 735

	Concentración de fago (ng/pocillo)						
	870	134	22	4	1	0	0
fago + mAb735	107 ± 7	112 ± 10	109 ± 1	108 ± 2	67 ± 2	17 ± 0	4 ± 0
fago + ácido colomínico + mAb735	96 ± 7	106 ± 3	89 ± 1	29 ± 1	5 ± 0	1 ± 0	0 ± 0
fago + dextrano + mAb735	96 ± 12	108 ± 7	113 ± 0	105 ± 0	66 ± 3	16 ± 1	5 ± 0
fago + BSA	10 ± 1	4 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tabla VIII: Unión de fago que presenta SEC ID N°: 2 a mAb 735

	Concentración de fago (ng/pocillo)						
	796	122	20	3	1	0	0
fago + mAb735	108 ± 5	109 ± 3	112 ± 10	89 ± 11	27 ± 4	4 ± 2	2 ± 1
fago + ácido colomínico + mAb735	109 ± 6	114 ± 12	100 ± 6	48 ± 6	10 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
fago + dextrano + mAb735	109 ± 8	111 ± 6	110 ± 5	99 ± 1	27 ± 1	5 ± 1	1 ± 0
fago + BSA	12 ± 1	9 ± 1	4 ± 3	2 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

5 Tabla IX: Unión de fago que presenta SEC ID N°: 3 a mAb 735

	Concentración de fago (ng/pocillo)						
	859	132	22	4	1	0	0
fago + mAb735	111 ± 8	109 ± 16	114 ± 8	99 ± 10	50 ± 1	13 ± 1	6 ± 0
fago + ácido colomínico + mAb735	104 ± 2	107 ± 2	85 ± 7	27 ± 3	4 ± 1	1 ± 1	0 ± 0
fago + dextrano + mAb735	109 ± 2	108 ± 0	108 ± 3	107 ± 8	57 ± 3	13 ± 1	6 ± 0
fago + BSA	10 ± 0	5 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

El fago que presenta la SEC ID N° 1: (DSPLVPFIDFHPC) mostró la mejor unión a mAb 735 en comparación con los otros fagos. Esta unión estuvo en competencia con el ácido colomínico, mientras que el dextrano no mostró efectos de competición. El fago que presenta la secuencia SEC ID N°: 4 mostró valores similares. Debido a la baja ocurrencia de la secuencia SEC ID N°: 4 se decidió sintetizar la secuencia SEC ID N°: 1 (péptido p21) y una variante aleatorizada de la secuencia SEC ID N°: 1 (péptido p22: PDHIFVFSPDLP, SEC ID N°: 28) como control.

Los fagos que presentan péptidos cílicos que corresponden a la secuencia CSSVTAWTTGCG (SEC ID N°: 18) y CSKIASMETGCG (SEC ID N°: 22) respectivamente, en los que los dos restos de cisteína están enlazados a través de un puente de disulfuro, mostraron la mejor unión a mAb 30H12 en comparación con los otros fagos. Por tanto, se decidió sintetizar los péptidos cílicos correspondientes (p65 y p66).

EJEMPLO 3: ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD DE p21, p65 y p66 MEDIANTE ELISA DE PÉPTIDO COMPETITIVO, ELISA Y UNIÓN COMPETITIVA A CÉLULAS QUE EXPRESAN PSA-NCAM

20

1) Preparación de conjugados de péptido biotinilado -BSA

1.1) Materiales

- éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccimida (MBS, SIGMA M2786, PIERCE 22311)
- éster de biotinamidocaproato-N-hidroxisuccimida (NHS-Biotin, SIGMA 02643, PIERCE 20217)
- dimetilformamida (DMF, SIGMA)
- BSA (CALBIOCHEM 122605)
- péptidos sintéticos que contienen cisteína que se obtienen a partir de p21 (DSPLVPFIDFHPC, SEC ID N°: 29), p65 y p66 y péptidos de control que contienen cisteína correspondientes que se obtienen a partir de los péptidos inversos p22 (PDHIFVFSPDLP, SEC ID N°: 30), p65 y p66 respectivamente.
- columna de exclusión por tamaño PD-10 (AMERSHAM-PHARMACIA 17-0851-01)
- filtros de centrifuga Ultrafree-4 y membrana tub Biomax 50K NMWL, volumen 4 ml (MILLIPORE UFV4BQK25)
- L-cisteína (SIGMA)

1.2) Tampones

- solución madre de MBS: 13 mg/ml en DMF
- solución madre de NHS-Biotina: 2,5 mg/ml en DMF (Estas concentraciones conducen a moléculas de BSA altamente activadas con aproximadamente 5 moléculas de biotina/molécula de BSA)
- tampón de conjugación: NaH₂PO₄, 0,083 M, NaCl 0,9 M, pH 7,2.
- PBS pH 7,4
- solución de cisteína: 100 mg/ml de L-cisteína en un tampón de conjugación.

10 1.3) Método

Se disolvieron 10 mg de BSA en 2 ml de tampón de conjugación y se añadieron 140 µl de la solución madre de MBS/NHS-Biotina. La solución se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación suave. La columna PD-10 se equilibró con 50 ml de tampón de conjugación. Después de añadir 2,4 ml de la solución a la columna, el BSA activado se eluyó con alícuotas de 0,5 ml de tampón de conjugación. La elución de proteínas de supervisó a 280 nm. Una cantidad apropiada del péptido que contiene cisteína se disolvió en 1 ml de tampón de conjugación. Para 5 unidades (PM 1500, 1,14 mg de péptido se añadieron a 10 mg de BSA). Esta solución de péptido se añadió a las fracciones agrupadas que contenían BSA activado por maleimida /biotinilado. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 100 ml de solución de cisteína para bloquear los grupos maleimida que no habían reaccionado. Después de 1 h, la solución de reacción se sometió a diálsis 5 veces con 1 ml de PBS, en una unidad de ultrafiltración. El conjugado biotinilado se disolvió en PBS y las alícuotas se almacenaron a -20°C.

2) ELISA competitivo de conjugados de péptido biotinilado-BSA en mAb anti-PSA

25 2.1) Materiales, tampones y método

2.1.1) Materiales

- mAb 735 y 30H12
- placas MaxiSorp™ (NUNC) para recubrir el anticuerpo: placas ELISA
- placas de microtitulación (NUNC) para dilución de péptido: placas de dilución.
- Se preparan conjugados de péptido biotinilado-BSA como se ha descrito anteriormente.
- Conjugado de extravidina fosfatasa alcalina-avidina (SIGMA E2636)
- sustrato de p-nitrofenil-fosfatasa alcalina (SIGMA 104-105)

35 2.1.2) Tampones

- PBS pH 7,4
- Solución de bloqueo: BSA al 0,5 % en PBS
- TBS
- TBST: TBS que contiene Tween 20 al 0,05 %
- Solución de conjugado de extravidina fosfatasa alcalina-avidina: 1/5000 en TBST
- Solución de sustrato de fosfatasa alcalina; 1 comprimido en 5 ml de NaHCO₃ 50 mM, solución de MgCl₂ 1 mM, pH 9,6.
- solución de competidor mezclado: ácido colomínico 1 mM con un gradiente de conjugado de péptido-BSA en TBST.

45 2.1.3) Método

Pocillos de placas Maxisorp™ se recubrieron con 100 µl de solución de mAb (25 µg/ml) durante 2 h a temperatura ambiente. Los pocillos de control de las placas de ELISA únicamente se recubrieron con la solución de bloqueo. Paralelamente, las placas de dilución de conjugado péptido-BSA se bloquearon con 200 µl de solución de bloqueo durante 2 h. Los pocillos recubiertos con anticuerpo y los pocillos de control se bloquearon con 200 µl de solución de bloqueo durante 1 h. Paralelamente, las placas de dilución de conjugado péptido-BSA se lavaron 6 veces con TBST y se añadieron 120 µl de TBST a los pocillos. Se añadió un volumen apropiado de una solución de conjugado péptido-BSA al primer pocillo y el volumen se ajustó a 140 µl con TBST. El conjugado péptido-BSA en el pocillo uno se diluyó en la proporción 1/7 sacando 20 µl del primer pocillo y transfiriéndolo al segundo para conseguir también el volumen total de 140 µl. Esto se repitió para los pocillos restantes. Las diluciones de conjugado péptido-BSA para los pocillos de control se realizaron de la misma manera. Las placas de ELISA bloqueadas se lavaron 6 veces con TBST y se añadieron las diluciones de conjugado péptido-BSA o 100 µl de la solución de competidor mezclado a los pocillos. Después de incubación durante 1 h, los pocillos se lavaron 10 veces con TBST y se añadieron 100 µl de la solución de sustrato de fosfatasa alcalina a los pocillos. Las placas se leyeron después de 10 a 60 min usando un lector de microplacas a 405 nm.

2.2) Resultados

- 65 La especificidad de péptido p21 (SEC ID N°: 1) se investigó en un ELISA de competición usando conjugado p21 biotinilado-BSA y una variante aleatorizada del conjugado p21 (p22) como un control. Los resultados mostrados en las

Tablas X y XI se expresan como porcentaje de unión en comparación con el péptido p21 a la concentración más elevada (9,45 10⁻⁵ M) que corresponde al 100 % de unión.

Tabla X: Unión de p21 a mAb 735 en ELISA competitivo

	Concentración de péptido (M)									
	9,45 10,5	1,67 10 ⁻⁵	2,94 10 ⁻⁶	5,20 10 ⁻⁷	9,27 10 ⁻⁸	1,62 10 ⁻⁹	2,86 10 ⁻⁹	5,04 10 ⁻¹⁰	8,89 10 ⁻¹¹	
Péptido + mAb 735	100 ± 11	93 ± 10	95 ± 1	91 ± 2	93 ± 9	56 ± 4	13 ± 1	2 ± 0	0 ± 0	
Péptido + ácido colomínico + mAb 735	43 ± 3	34 ± 3	23 ± 1	15 ± 3	5 ± 2	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
Péptido + Condroitín sulfato C + mAb 735										
	96 ± 8	99 ± 4	99 ± 8	94 ± 7	92 ± 2	50 ± 1	11 ± 2	3 ± 0	2 ± 0	
Péptido + BSA	3 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	

5

Tabla XI: Unión de p22 a mAb 735 en ELISA competitivo

	Concentración de péptido (M)									
	9,45 10,5	1,67 10 ⁻⁵	2,94 10 ⁻⁶	5,20 10 ⁻⁷	9,27 10 ⁻⁸	1,62 10 ⁻⁹	2,86 10 ⁻⁹	5,04 10 ⁻¹⁰	8,89 10 ⁻¹¹	
Péptido + mAb 735	32 ± 1	9 ± 0	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
Péptido + ácido colomínico + mAb 735	27 ± 0	5 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
Péptido + Condroitín sulfato C + mAb 735										
	29 ± 0	8 ± 1	3 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	
Péptido + BSA	3 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	

La Tabla X muestra una inhibición clara de la unión de p21 en presencia de ácido colomínico. En comparación, el condroitín sulfato C no tuvo influencia sobre la unión del péptido B. La Tabla XI muestra que no hubo unión a mAb 735 para la variante aleatorizada del conjugado p21 (p22); no se observaron diferencias cuando estuvo presente ácido colomínico o condroitín sulfato C. Estos resultados llevan a la conclusión de que la secuencia SEC ID N°: 1 (p21) se une específicamente a mAb 735 de una manera dependiente de la concentración.

3) ELISA con conjugado péptido-BSA

15

La especificidad de los péptidos cílicos se investigó en un ensayo de ELISA usando placas recubiertas con anticuerpo 30H12, siguiendo el protocolo como se ha descrito anteriormente para el ELISA competitivo, con la excepción de que se omitió el competidor. Los resultados presentados en la Figura 12A demuestran que los péptidos cílicos se unen al anticuerpo de una manera específica de antígeno. Los péptidos p65 y p66 que muestran la unión más elevada se eligieron para estudios adicionales.

4) Unión competitiva a células que expresan PSA-NCAM

25

La especificidad de los péptidos p65 y p66 se ensayó en un ensayo de competición usando anticuerpos anti-PSA y células que expresan PSA-NCAM. La pre-incubación del anticuerpo monoclonal 30H12 con 0,1 mM de péptido p65 o p66 evitó su unión a células que expresan PSA-NCAM (Figura 12D frente a Figura 12B). La especificidad de unión se examinó con mayor detalle ensayando el reconocimiento peptídico por otro anticuerpo monoclonal anti-PSA (MenB). Los resultados presentados en la figura 12C demuestran que los péptidos p65 y p66 se unen únicamente a 30H12; la pre-incubación de los péptidos con MenB no evitó el reconocimiento de PSA-NCAM (figura 12 C). Por tanto, parece que los mimótopos p65 y p66 son específicos para una determinante única (idiotípica).

EJEMPLO 8: ANÁLISIS DE BIOACTIVIDAD DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE PSA**1) Materiales y métodos****5 1.1) Animales**

Ratones transgénicos para GFP se han descrito previamente en Hadjantonakis et al. (Biotechnol., 2002, 2, 11-), y todos los análisis se realizaron en antecedente suizo. Ratones knock out de NCAM (NCAM -/-) se han descrito previamente en Cremer et al., mencionado anteriormente.

10

1.2) Cultivo de explante de ganglios de la Raíz Dorsal (DRG)

DRG E13,5 se diseccionaron de embriones de ratones en medio HBSS y se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con polilisina o con péptidos unidos a BSA. Los explantes se cultivaron en presencia o ausencia de los péptidos en forma soluble. (40 μ M) en dos ml de medio neurobasal (DMEM/Ham F12, 3: 1 (V/V), GIBCO, tamponado con Hepes 20mM), complementado como se ha descrito en Faivre-Sarrailh et al., J.Cell. Sci., 1999, 18, 3015-3027 and Chazal et al., J.Neurosci., 2000, 20, 1446-1457.

15

1.3) Cultivo de explante de zona sub-ventricular (SVZ)

20

Los cultivos de explantes de SVZ se realizaron como se ha descrito en Chazal et al., mencionado anteriormente. En resumen, ratones de 1 día de edad se sacrificaron mediante decapitación rápida. Los cerebros se disecaron y se seccionaron mediante Vibratome (Leica). La SVZ de la pared lateral del asta anterior del ventrículo lateral se disecó en medio HBSS (LIFE TECHNOLOGIES) y se cortó en explantes de 200-300 μ M de diámetro. Los explantes se mezclaron con Matrigel (BECKTON DICKINSON) y se cultivaron en placas de cuatro pocillos. Después de la polimerización, el gel se cubrió con 400 μ l de medio sin suero que contenía complemento de B-27 (LIFE TECHNOLOGIES), en presencia o ausencia de 40 μ M de péptidos (p65, p66, p65 inverso, p21 o p22) y 70 U de Endo N por mililitro.

25

1.4) Inmunohistoquímica

30

Explantes y cortes de DRG fijados (*Ganglios de la Raíz Dorsal*) se incubaron a 4°C respectivamente 2 h con un anti-neurofilamento (SMI-31, dilución 1:800, STERNBERGER MONOCLONALS) y durante una noche con un anticuerpo anti-PSA (dilución 1:200, Rougon et al., J. Cell. Biol., 1986, 103, 2429-2437). El revelado se realizó mediante una incubación de 1 h con el anticuerpo secundario marcado fluorescente correspondiente (anti-IgM o IgG de ratón de cabra conjugado con rojo de Texas, IMMUNOTECH)

35

1.5) Distancia de migración celular (explantes de SVZ) y extensión neuronal (explantes de DRG).

Después de 48 h en cultivo, los explantes se examinaron directamente (SVZ) o después de una fijación durante una noche con una solución de paraformaldheído al 4% en PBS e inmunotinción (DRG). Se realizó la observación usando objetivos 2,5X, 5X, 10X y 32X (Axiovert 35M, ZEISS). Las imágenes se recogieron con una cámara de video (Cool View, PHOTONIC SCIENCE) y se analizaron usando software de procesamiento de imágenes (Visiolab1000, BIOCOP). La distancia de migración media (calculada en cinco experimentos diferentes, incluyendo al menos cinco explantes por condición) o la longitud media de la neurita más larga (calculada en dos experimentos diferentes, incluyendo al menos ocho explantes por condición), fue la distancia en micrómetros entre el borde del explante y el límite del frente de migración celular. Se realizaron cuatro mediciones para cada explante. La significancia de las diferencias entre el control y las diferentes condiciones experimentales se calculó mediante el ensayo t de Student.

40

1.6) Trasplante

50

Explantes de SVZ de 100 μ m de diámetro de ratones GFP de 1 día de edad se incubaron quince minutos en DMEM complementado con suero fetal bobino al 10% en presencia de p65 0,01 M o péptido inverso y se injertó de forma estereotáctica (0,5 μ l) en SVZ de ratones de seis semanas de edad como se ha descrito en Lois y Alvarez-Buylla (Science, 1994, 264, 1145-1148). Tres o cuatro días después del injerto, los animales se perfundieron por vía intracardíaca con una solución de paraformaldheído al 4% en PBS. Los cerebros se disecaron, se fijaron posteriormente, se crioprotegieron y se congelaron en isopentano. Cortes en series sagitales (12 μ m) se cortaron con un microtomo Leica y se inmunotincieron como se ha descrito anteriormente. Las células GFP que llegan al bulbo olfatorio después de tres días se observaron usando fluorescencia UV con un objetivo 40X (Axioscope, ZEISS) y se realizó el recuento en dos experimentos diferentes (cuatro animales por condición). La significancia de la diferencia entre las dos condiciones se calculó mediante ensayo de t de Student.

55

1.7) Inyecciones intra-vítreas y montaje completo de retina.

60

Se realizaron inyecciones como se ha descrito en Monnier et al. (Developmental Biology, 2001, 229, 1-14). En resumen, se cortó una ventana de 2 x 2 cm en la cáscara sobre embriones de pollo E3. Se inyectó un μ l de verde Rápido con 10

5 mM de p65 o péptido inverso en el cuerpo vítreo del ojo derecho usando un capilar. Después de una incubación de cinco días a 37°C, se disecaron las retinas (E8), se extendieron sobre filtros de nitrocelulosa (MILLIPORE) y se fijaron con solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Se aplicaron dos cristales Dil pequeños (perclorato de 1,1'-diacetadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) dorsalmente a la fisura óptica. Las retinas se almacenaron en la oscuridad a 37°C durante 10 días hasta que el colorante alcanzó los conos de crecimiento axonal en la fisura, se montaron en glicerol:PBS (9: 1, v: v) y se analizaron usando microscopía confocal.

2) Resultados

10 2.1) Efecto de péptidos miméticos de PSA sobre el crecimiento y la fasciculación axonal *in vitro* (figura 2)

15 Explantes de ganglios de la raíz dorsal de ratón (E13,5) se cultivaron en presencia de los péptidos miméticos cílicos p65 y p66, en forma soluble o recubiertos sobre las microplacas como conjugados de BSA. Las células cultivadas en ausencia de los péptidos o en presencia de los péptidos inversos (recubiertos o en forma soluble) se usaron como controles.

20 El efecto de los péptidos sobre la extensión y la fasciculación de neurita se analizó cualitativamente y cuantitativamente (figura 2A a H).

25 p65 y p66, en una forma soluble, inducen una desfasciculación clara de los paquetes de axones (C frente A y F frente a D) y un aumento significativo en el crecimiento axonal (C frente A) en comparación con los controles. De forma curiosa, p65 y p66, en una forma recubierta, inducen un efecto opuesto sobre la fasciculación (B frente a A y E frente a D) y no tienen efecto sobre la extensión de neurita.

30 30 Estos resultados se confirmaron mediante análisis cuantitativos que mostraban que p65 y p66, en forma soluble, aumentaban la extensión de neurita en el 34 % y el 21 % respectivamente, en comparación con los controles, mientras que los mismos péptidos en la forma recubierta no inducen un aumento significativo de la extensión de neurita (figura 2G y 2H).

35 Estos resultados demuestran que los péptidos miméticos de PSA son capaces de modular el crecimiento y la fasciculación axonal *in vitro*.

2.2) Efecto de los péptidos miméticos de PSA sobre la fasciculación y guía axonal *in vivo* (figura 3)

40 35 Se inyectaron p65 y p66 en ojos de embriones de pollo (E3) y la retina se observó en E9. Los resultados presentados en la figura 3 muestran que la presencia de péptidos miméticos de PSA durante el desarrollo de la retina inducen defectos de guía y fasciculación de los axones; los axones dejan su fascículo y crecen perpendicularmente al mismo (punta de las flechas en D, G, E y H). En comparación, no se observan defectos en la guía y fasciculación de axones después de la inyección de los péptidos de control.

45 40 Estos resultados demuestran que los péptidos miméticos de PSA son capaces de modular el crecimiento y la guía axonal *in vivo*.

2.3) Efectos de péptidos miméticos de PSA sobre la migración celular *in vitro* (figuras 4 a 7)

50 45 El efecto de los péptidos miméticos de PSA sobre la migración celular *in vitro* se analizó en explantes sub-ventriculares de ratones de 1 día de edad normales (NCAM +/+, heterocigotos (NCAM +/-) o ratones knock out (NCAM -/-) cultivados en Matrigel, en presencia de los péptidos miméticos (p65, p21, p66), forma diferente de péptido p65 (cíclico, lineal, lineal y acetilado), los péptidos de control (p65 inverso y p66 inverso y p22 inverso) o endosialidasa N. Los resultados se ilustran en las figuras 4 a 7.

55 55 - Figura 4 (A a I) muestra que la adición de péptidos p65 y p66 al cultivo aumenta el índice de migración de los precursores neuronales y una modificación de su disposición similar a cadena (C y F). Estos efectos no se observaron con los péptidos inversos (A y B) y fueron dependientes de PSA ya que los mismos se suprimieron mediante tratamiento con endo N (B y E).

60 60 Estos resultados se confirmaron mediante el análisis cuantitativo (G y H) que demuestra que p65 y p66 inducen un aumento significativo en el índice de migración de los precursores neuronales (+ 40 % y + 26 % respectivamente a 0,4 μM, en comparación con el control sin péptido), mientras que la endo N lo reduce (- 21 %, en comparación con el control sin péptido).

La curva de dosis-respuesta de p65 (I) muestra que el efecto óptimo sobre la migración celular se observa empezando en y por encima de 0,4 μM de péptido.

- La Figura 5 muestra que la ciclación de p65 es un pre-requisito para el efecto promotor de p65 ya que las secuencias de aminoácidos correspondientes en una forma lineal, N-acetiladas o no, son incapaces de estimular la migración celular.
- 5 - La Figura 6 muestra que el efecto de p65 depende de la expresión de PSA ya que una reducción significativa de la migración del precursor se observó en los ratones NCAM -/- en comparación con los ratones NCAM +/-, en presencia del péptido inverso o péptido p65; el efecto fue comparable en ratones NCAM +/- tratados con endo N y ratones NCAM -/- y el p65 no invirtió la migración perjudicada en los ratones NCAM -/-.
- 10 - La Figura 7 muestra que p65 induce un aumento significativo en el índice de migración de los precursores neuronales, en comparación con el péptido de control correspondiente (p65 inverso). Por el contrario, p21 induce una reducción significativa en el índice de migración de los precursores neuronales, en comparación con el péptido de control correspondiente (péptido p22); la disminución es comparable a la que se observa en las células tratadas con endo N.
- 15 15 Estos resultados demuestran que los péptidos miméticos son capaces de estimular (p65) o inhibir (p21) la migración celular de una manera dependiente de PSA.
- 2.4) Efectos de péptidos miméticos de PSA sobre la migración celular *in vivo* (figura 8)**
- 20 20 El efecto de péptidos miméticos de PSA sobre la migración celular *in vivo* se analizó injertando tejido y evaluando la migración de células de SVZ. Trozos pequeños de SVZ (100 µm de diámetro) de ratones GFP de 1 día de edad GFP se injertaron en el área SVZ de ratones adultos, en presencia de p65, péptido inverso p65 o en ausencia de péptidos. Los resultados se ilustran en la figura 8.
- 25 25 La Figura 8 muestra que la presencia de péptido p65 aumenta significativamente el número de células positivas GFP que migran al bulbo olfatorio (a través de la Corriente de Migración Rostral o RMS), en comparación con el control. Este efecto se observó tan temprano como 3 días después del injerto (figura 8E). Estos resultados se confirmaron mediante el análisis cuantitativo que muestra que el número de células positivas GFP presentes en el bulbo olfatorio 3 días después del injerto aumenta 17 veces en presencia de p65, en comparación con el control (figura 8G).
- 30 30 Estos efectos fueron dependientes de PSA ya que los mismos estaban suprimidos en ratones knock-out NCAM.
- 35 35 Estos resultados demuestran que los péptidos miméticos son capaces de aumentar la migración de células positivas PSA.
- EJEMPLO 9: ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN FUNCIONAL DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL DESPUÉS DE UNA INYECCIÓN DE PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE PSA.**
- 40 40 **1) Materiales y métodos**
- 1.1) Cirugía de médula espinal y administración de péptidos**
- 45 45 Ratones macho Swiss-CD1 (8- 10 semanas de edad) se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilazina. La médula espinal se había expuesto realizando una incisión de la línea media de la piel y retrayendo los músculos paravertebrales. Se realizó una laminectomía a nivel de T7-T8 y se expuso la médula espinal. Usando tijeras de iridectomía, se realizó una hemi-sección dorsal bilateral, cortando transversalmente los cordones dorsales izquierdo y derecho, las astas dorsales, pero reservando la mayoría de las partes del cordón anterior, dando como resultado un corte transversal completo del Tracto Cortico Espinal principal dorsomedial (CST). Para la serie de ratones que recibían los péptidos se aplicó una almohadilla Surgicoll saturada con 10 µl de péptidos p65 o p65 inverso (10 µM) sobre el sitio del corte transversal y se cubrió con vaselina para evitar la difusión. Todas las capas de músculo interiores se suturaron usando hilo fino. La piel se suturó usando grapas quirúrgicas. A continuación de la cirugía, se administró 1 ml de solución salina por vía subcutánea para evitar la deshidratación y los ratones se colocaron bajo una lámpara de calor hasta que los mismos se recuperaron completamente de la narcosis. Despues los ratones se devolvieron a su jaula de residencia y recibieron una inyección subcutánea diariamente de antibiótico Baitryl™ para evitar la infección. Se realizó evacuación manual de la vejiga hasta la recuperación de la función autonómica completa de la vejiga.
- 50 50
- 1.2) Ensayo funcional (Figura 9)**
- 55 55 La evaluación funcional de los animales se realizó el día (D) D1, D4, D7, D14, D21, D28, D35, durante la primera semana a continuación de la lesión de la médula espinal y después de forma semanal hasta el D35, mediante dos observadores diferentes que no conocían la identidad del grupo. La recuperación locomotora se evaluó usando el ensayo de BBB (ensayo de Basso, Beattie y Bresnahan; Basso et al., Restor. Neurol. Neurosci, 2002, 5, 189-218). La

5 escala varía de 0 (sin movimiento observable de las extremidades posteriores) a 21 (marcha normal) y se puede subdividir en tres intervalos. Los valores de 0 a 7 corresponden a una recuperación baja (movimientos de articulaciones, no hay soporte del peso, no hay colocación de la pata). Los valores de 8 a 13 se pueden referir a una recuperación intermedia (colocación de la pata, coordinación de extremidades anteriores-posteriores). Los valores de 14 a 21 se pueden referir a una recuperación muy buena. Finalmente el último día del ensayo (D35), los ratones se sometieron al ensayo del rodillo giratorio para evaluar la coordinación motora fina.

1.3) Histología (Figura 9)

10 El D5, los animales lesionados que recibieron p65 (n=3) o p65 invertido (n=3) se perfundieron por vía trans-cardíaca. Las médulas espinales se cortaron en plano sagital a intervalos de 20 μ m en bloques de 10 mm de longitud en el sitio de la lesión. Para examinar el alcance de la lesión, se realizó tinción de Nissl en series de 1-en- 6 cortes en todos los animales. Las series de cortes de 1-en-3 se tiñeron con anticuerpos anti-PSA (IgM de ratón) y/o anti-GFAP (IgG de ratón) MenB. Los anticuerpos unidos se revelaron mediante los anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente apropiados.

15 2) Resultados

20 Después de las lesiones cortadas, los axones cerebrales y espinales no avanzan a través del SNC adulto. En lugar de ello, estas fibras se quedan atrapadas en el sitio del daño y permanecen desconectadas de las dianas sinápticas, conduciendo a déficits profundos y persistentes en muchos casos clínicos. La lesión de médula espinal (LME) es el ejemplo más claro de una afección en la que la desconexión axonal conduce a incapacidad significativa a pesar de la muerte neuronal mínima.

25 Por tanto, se analizó el efecto de los péptidos miméticos de PSA p65 (y su equivalente inverso, tomado como control) sobre la recuperación funcional sobre la lesión de la médula espinal en ratones.

30 2.1) Recuperación locomotora mejorada después de lesión de médula espinal en ratones que recibieron péptido p65 en el sitio de la lesión.

35 Los resultados presentados en la figura 10 (A y B) demuestran que el tratamiento de péptidos miméticos de PSA está relacionado con la recuperación funcional después de la lesión de hemi-sección dorsal centro-torácica. Más precisamente, la recuperación se evaluó usando una medida estandarizada en campo abierto de la función locomotora después de lesión de la médula espinal, la puntuación BBB. En esta escala, 21 es función normal y 0 es parálisis total bilateral de las extremidades posteriores. Todos los ratones tenían valores de 0 el D1 después de la lesión. Los ratones tratados con p65 recuperaron gradualmente la función parcial a lo largo de un periodo de observación de 45 días (Figura 10A). Los valores de ratones tratados con p65 fueron significativamente mayores que los controles con p65 inverso comenzando el D14 después de la lesión y a través de los puntos de tiempo siguientes. Considerando el periodo de tiempo (14 días) en el que se observó esta mejora es compatible con algún crecimiento de larga distancia de las fibras de CST que se prolongan a partir del sitio de la lesión hasta el conjunto motor lumbar. El brote local en la médula lumbar así como rearreglos de otros tractos descendentes, tales como el sistema rubro espinal, o del circuito de la médula espinal intrínseco distal también pueden contribuir. Independientemente del mecanismo, la recuperación locomotora en los ratones tratados con p65 fue significativamente mayor que en los animales de control. El efecto beneficioso de p65 sobre la recuperación se ensayó adicionalmente mediante un ensayo de rodillo giratorio realizado el D35 (figura 10B).

45 2.2 Disminución de gliosis reactiva el D5

50 Para evaluar el efecto del péptido, se realizó la cuantificación de la expresión de la Proteína ácida Fibrilar Glial (GFAP) como un índice de gliosis reactiva, en un subgrupo de animales tomados el D5 a continuación de la cirugía. Estos animales se seleccionaron de una manera ciega para cuantificación. Se analizaron 3 animales de p65 (10 cortes por animal) y 3 de p65 inverso (10 cortes por animal). Se realizó un marcaje doble con anticuerpo anti-PSA MenB. La cuantificación también se realizó de una manera ciega.

55 Se observó una diferencia significativa entre los animales tratados con p65 y con p65 inverso (Figura 11 A y B), demostrando que el tratamiento con p65 redujo la gliosis reactiva en el 40 % en comparación con el tratamiento con p65 inverso, posiblemente evitando la migración dentro de la cicatriz o inhibiendo otros procesos implicados tales como la acción de citoquinas inflamatorias. En cualquier caso estos resultados apoyan el hecho de que la recuperación funcional fue mejor en ratones tratados con p65.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE AIX MARSEILLE II SCHAFER-N
 5 UNIVERSITAET HAMBURG
 ROUGON Geneviève
 TORREGROSSA Pascal
 SCHACHNER Melitta
 SCHAFER NIELSEN Claus

10 <120> Uso de péptidos miméticos del ácido Poli-alfa-2,8-siálico para modular funciones de NCAM
 <130> F644PCT83
 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 15 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 1

Asp Ser Pro Leu Val Pro Phe Ile Asp Phe His Pro
 1 5 10

25 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 2

Leu Trp Gln Pro Pro Leu Ile Pro Gly Ile Asp Phe
 1 5 10

35 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 3

Gln Ile Glu Pro Trp Phe Thr Pro Glu Asp Phe Pro
 1 5 10

45 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 4

Thr	Arg	Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Phe	Pro	Leu	Asp	Tyr
1					5						10

5

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10

<220>

<223> péptido sintético

<400> 5

Ser	Trp	Leu	Gln	Met	Pro	Trp	Ala	Leu	Val	Arg	Thr
1					5						10

15

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20

<220>

<223> péptido sintético

<400> 6

Glu	Ile	His	Leu	Arg	Met	Ile	Lys	Gln	Ile	Thr	Ile
1					5						10

25

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

30

<220>

<223> péptido sintético

<400> 7

Trp	His	Leu	Glu	Tyr	Met	Trp	Arg	Trp	Pro	Arg	Leu
1					5						10

35

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

40

<220>

<223> péptido sintético

<400> 8

Leu	Ile	Glu	Gln	Arg	Leu	Pro	Lys	His	Ile	Leu	Thr
1					5						10

45

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 5 <400> 9

Tyr	Glu	Thr	Ser	Ser	Ser	Arg	Leu	Leu	Ala	Tyr	Ala
1						5				10	

<210> 10
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido sintético
 15 <400> 10

Thr	Leu	Ala	Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Thr	Ser	Ala	Tyr
1						5				10	

<210> 11
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido sintético
 25 <400> 11

Ser	Asp	Gln	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Trp	Ser	Asn	Pro
1					5					10	

<210> 12
 <211> 13
 30 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido sintético
 35 <400> 12

Trp	His	Asn	Trp	Asn	Leu	Trp	Ala	Pro	Ala	Ser	Pro	Thr
1					5					10		

<210> 13
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> péptido sintético
 45 <400> 13

·	Trp	His	Trp	Gln	Trp	Thr	Pro	Trp	Ser	Ile	Gln	Pro
1					5					10		

<210> 14
 <211> 12

<212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 14

Ile Lys Ser Pro Leu Thr Trp Leu Val Pro Pro Asp
 1 5 10

10 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 15

Ser His Leu Asp Leu Ser Thr Gly His Arg Thr Ser
 1 5 10

20 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 16

Cys Tyr Pro Leu Asn Pro Glu Val Tyr His Cys Gly
 1 5 10

30 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 17

Cys Trp Pro Leu Ser His Ser Val Ile Val Cys Gly
 1 5 10

40 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 18

Cys Ser Ser Val Thr Ala Trp Thr Thr Gly Cys Gly
 1 5 10

<210> 19

<211> 11
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 19

Cys	Tyr	Met	Ala	Ser	Gly	Val	Phe	Leu	Cys	Gly
1					5				10	

10 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 20

Cys	Trp	Pro	Leu	Gly	Pro	Ser	Thr	Tyr	Ile	Cys	Gly
1					5				10		

20 <210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 21

Cys	Ser	Leu	Ile	Ala	Ser	Met	Glu	Thr	Gly	Cys	Gly
1					5				10		

30 <210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 22

Cys	Ser	Lys	Ile	Ala	Ser	Met	Glu	Thr	Gly	Cys	Gly
1					5				10		

40 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 23

Cys	Tyr	Ile	Gly	Asp	Pro	Pro	Phe	Asn	Pro	Cys	Gly
1					5				10		

50 <210> 24

<211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 24

Cys	Trp	Pro	Leu	Gly	Asp	Ser	Thr	Val	Ile	Cys	Gly
1				5						10	

10 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 25

Cys	Pro	Leu	Arg	Leu	Ala	Phe	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly
1				5						10	

20 <210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 26

Cys	Thr	Arg	Met	Ser	His	Gly	Tyr	Trp	Ile	Cys	Gly
1				5						10	

30 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>

35 <223> cebador
 <400> 27
 ccctcatagt tagcgttaacg 20

40 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 28

Pro	Asp	His	Ile	Phe	Val	Phe	Ser	Pro	Asp	Leu	Pro
1				5						10	

50 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT

5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 10 <400> 29
 Asp Ser Pro Leu Val Pro Phe Ile Asp Phe His Pro Cys
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 13
 15 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 15 <400> 30
 Pro Asp His Ile Phe Val Phe Ser Pro Asp Leu Pro Cys
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido mimético de PSA
 25 <400> 31
 Asp His Gln Arg Phe Phe Val
 1 5
 <210> 32
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido mimético de PSA
 35 <400> 32
 Ala His Gln Ala Ser Phe Val
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido para uso como un medicamento para modular crecimiento, regeneración y plasticidad de células de vertebrados que expresan NCAM, en el que dicho péptido es un mimótopo del ácido poli-(2,8 siálico unido a NCAM que se selecciona entre el grupo que consiste en: los péptidos lineales de hasta 30 aminoácidos que comprenden al menos una de las secuencias SEC ID Nº: 1 a 12, 14 y 15 y los péptidos cílicos de hasta 30 aminoácidos que comprenden al menos una de las secuencias SEC ID Nº: 16 a 26.
- 5
2. El péptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 1 para uso como un medicamento, en la que la cadena lateral del resto de cisteína en la posición 1 de una de las secuencias SEC ID Nº: 16 a 26 está unido covalentemente al resto de la cadena lateral de la cisteína en la posición 10 u 11 de dicha secuencia.
- 10
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso como un medicamento, que está incluido en un complejo que comprende varios péptidos idénticos o diferentes como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, unidos por enlaces covalentes o no covalentes.
- 15
4. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso como un medicamento, que está asociado con una molécula que posibilita que dicho péptido atraviese la barrera hematoencefálica.
- 20
5. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es para uso como un medicamento para activar el crecimiento, regeneración y plasticidad de células de vertebrado que expresan NCAM, para la prevención o el tratamiento de una afección patológica seleccionada entre el grupo que consiste en: enfermedades neurodegenerativas, lesiones cerebrales y de médula espinal, problemas de aprendizaje o memoria relacionados con la edad.
- 25
6. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es para uso como un medicamento para inhibir el crecimiento, regeneración y plasticidad de células de vertebrado que expresan NCAM, para la prevención o el tratamiento de cáncer.
- 30
7. El péptido de acuerdo con la reivindicación 5 para uso como un medicamento, que es un péptido cíclico que comprende SEC ID Nº: 18 o SEC ID Nº: 22.
8. El péptido de acuerdo con la reivindicación 6 para uso como un medicamento, que es un péptido lineal que comprende SEC ID Nº: 1.

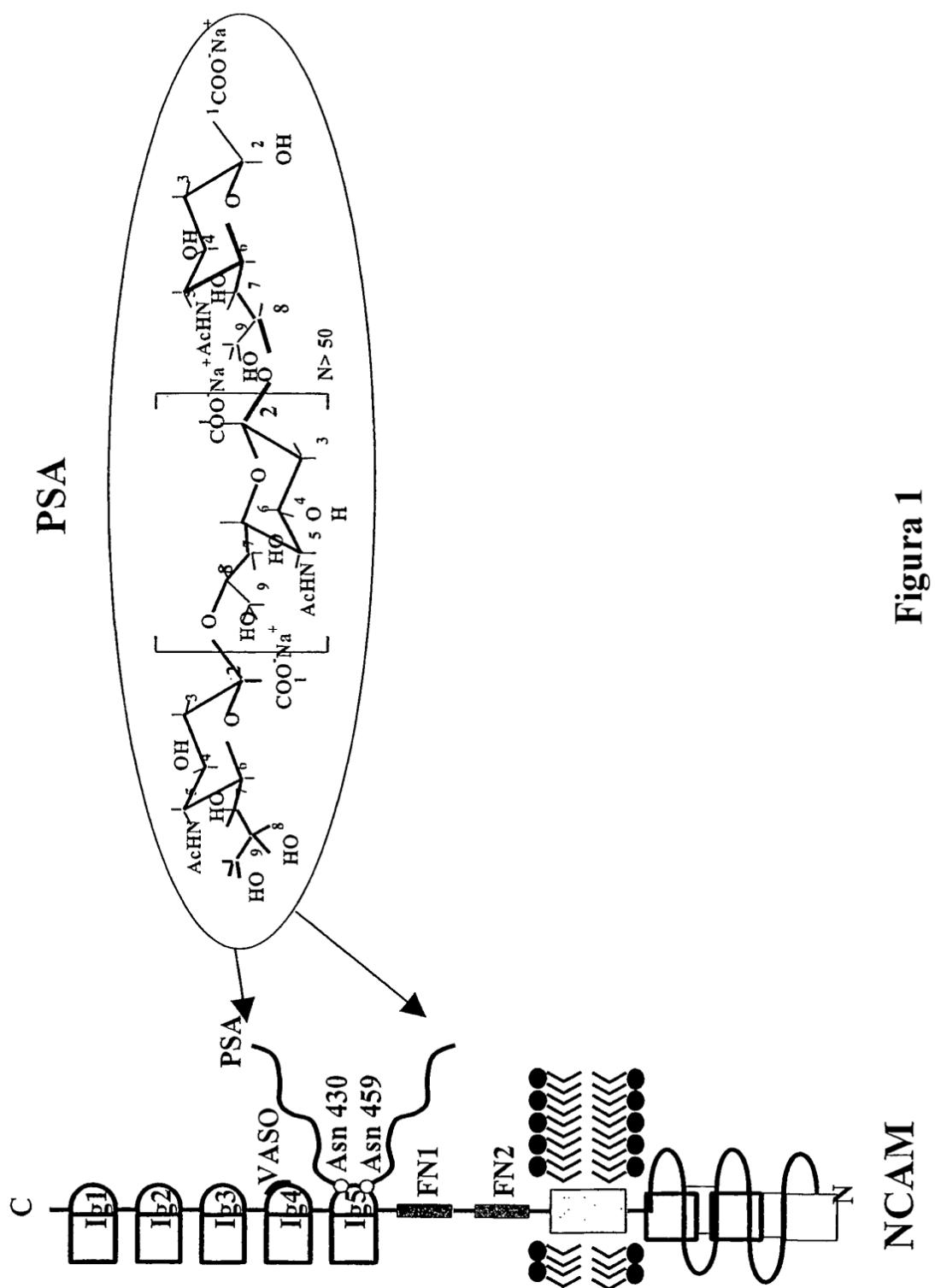


Figura 1

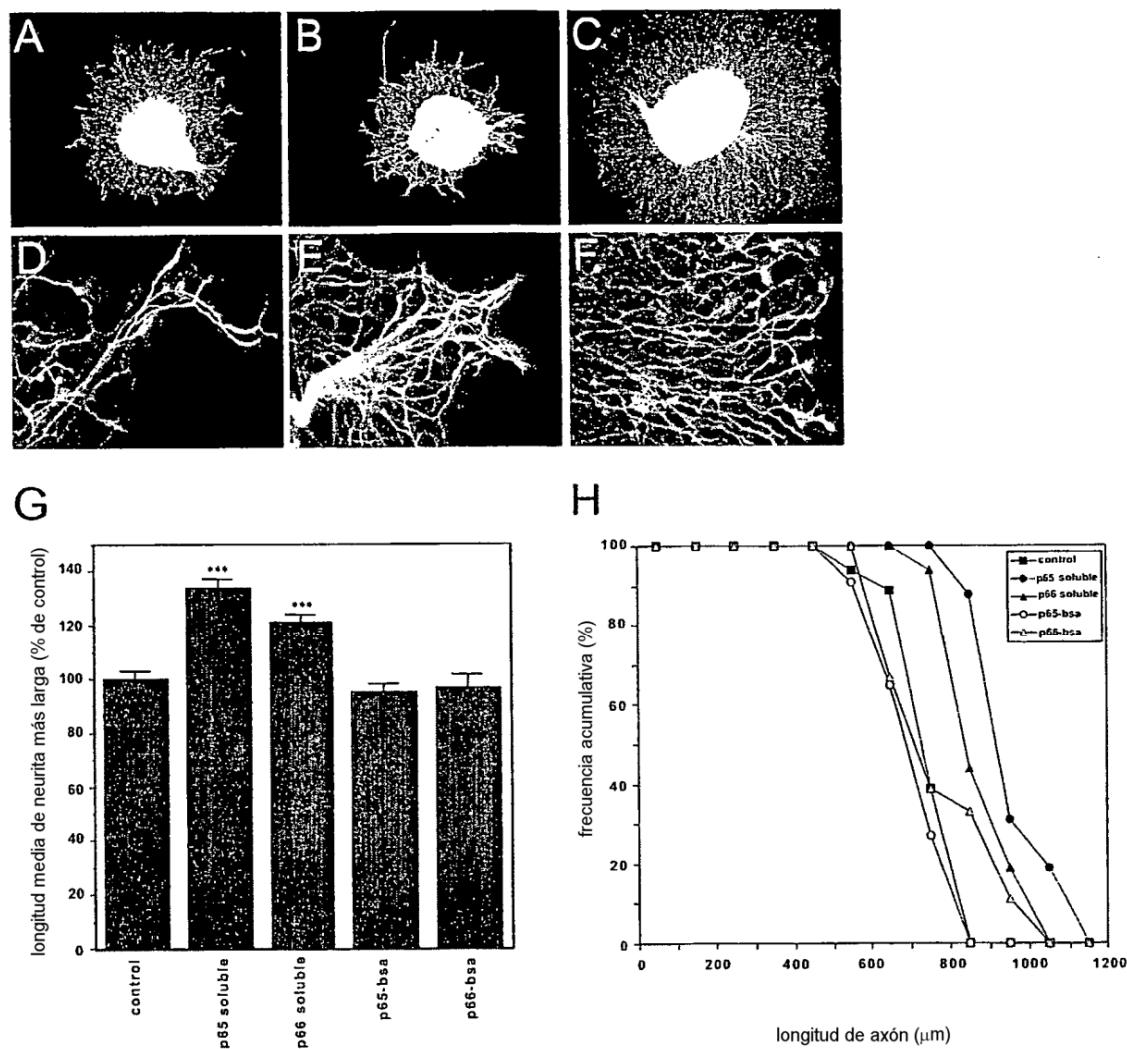


Figura 2

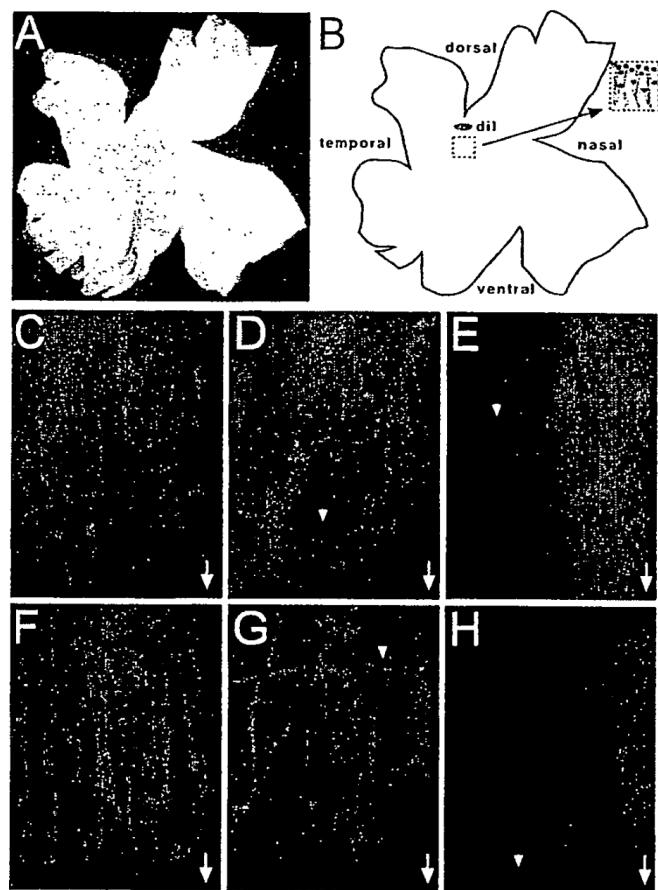
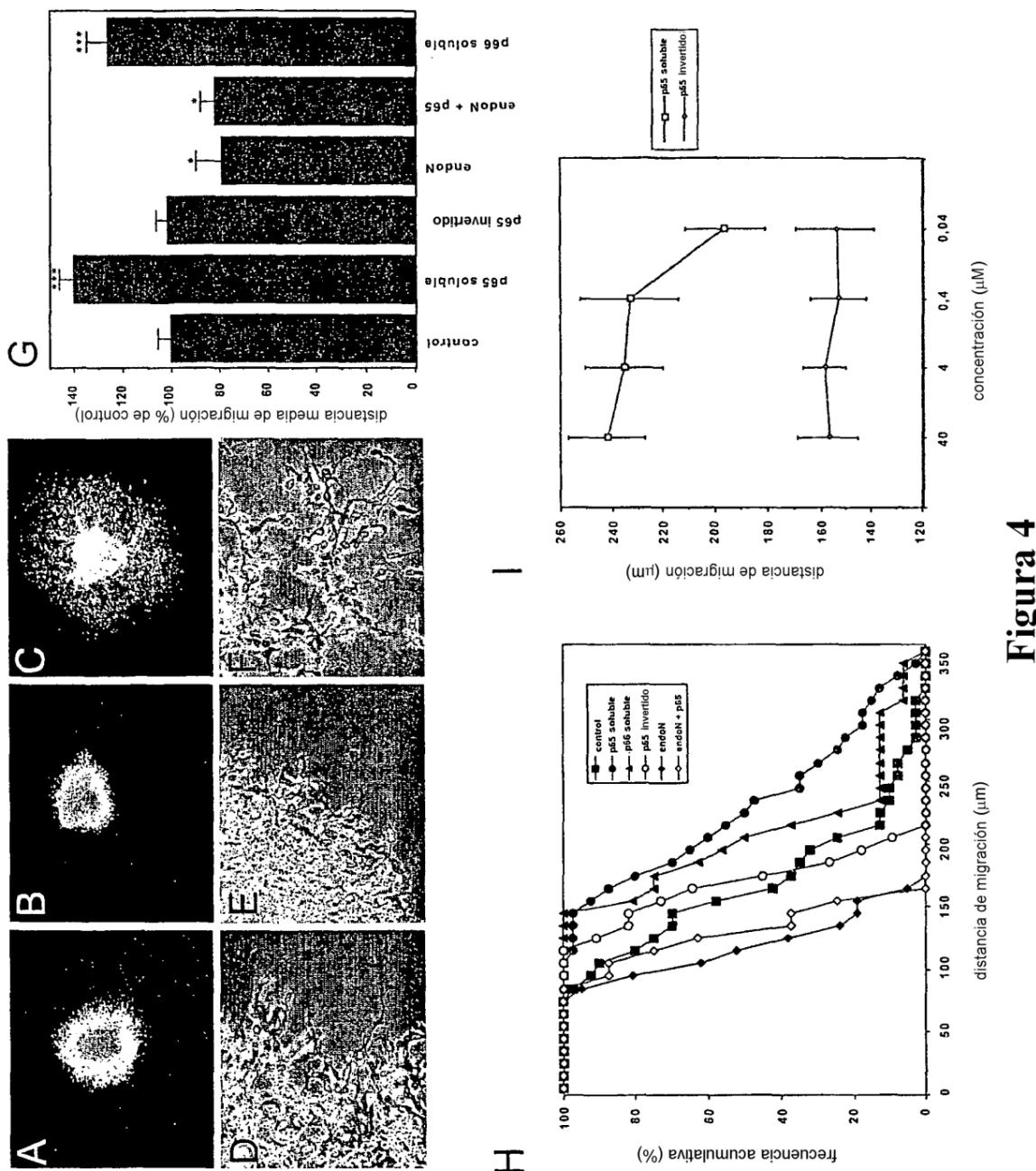
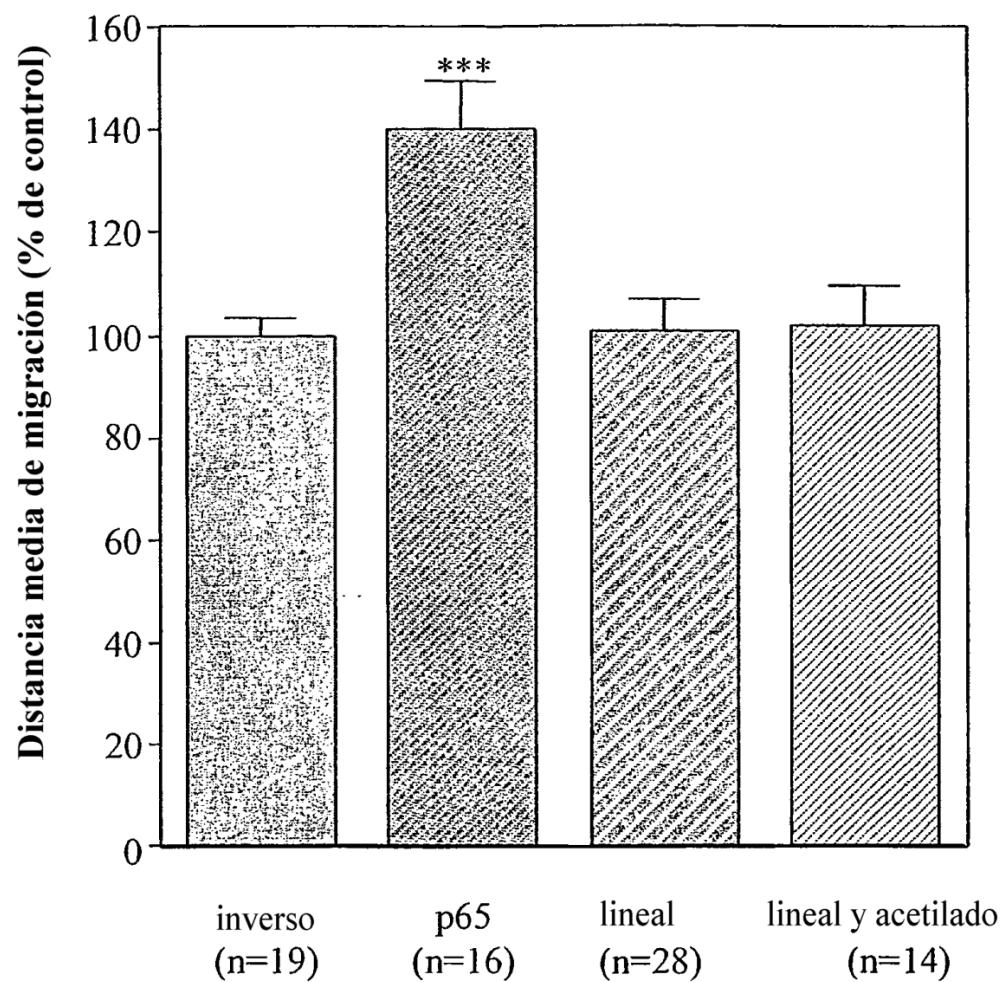


Figura 3

**Figura 4**

**Figura 5**

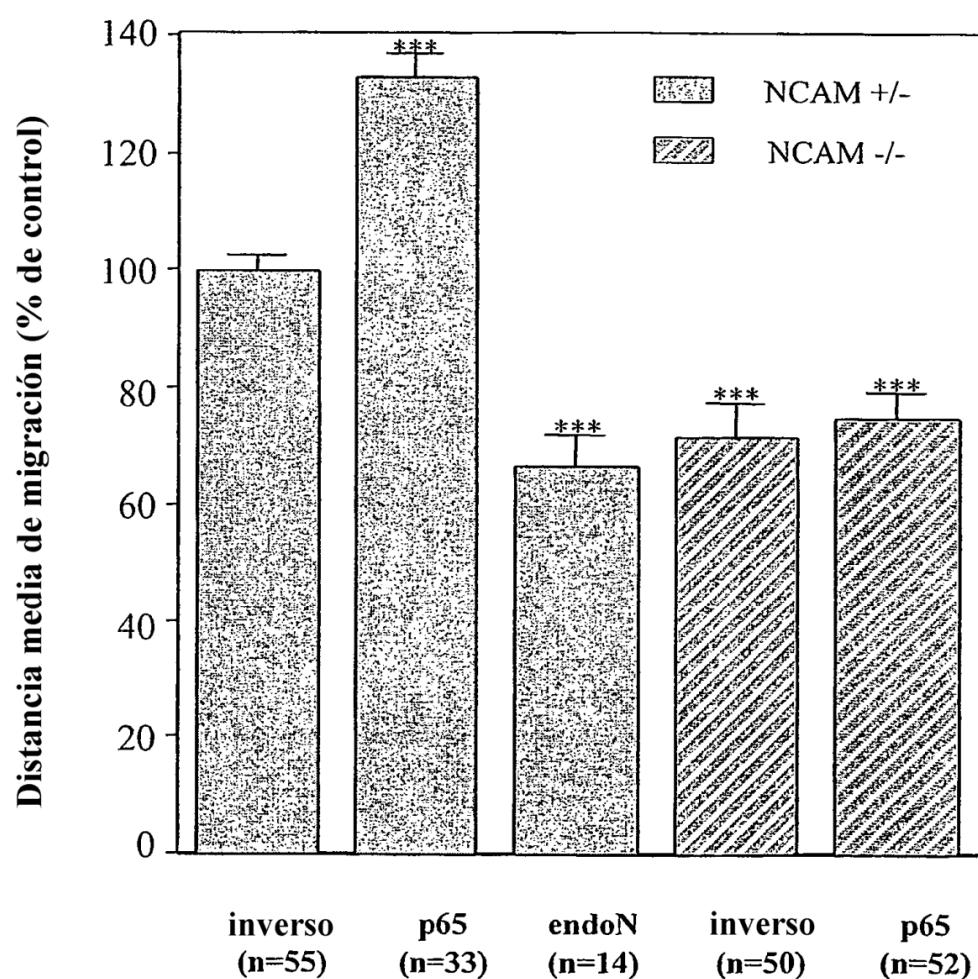


Figura 6

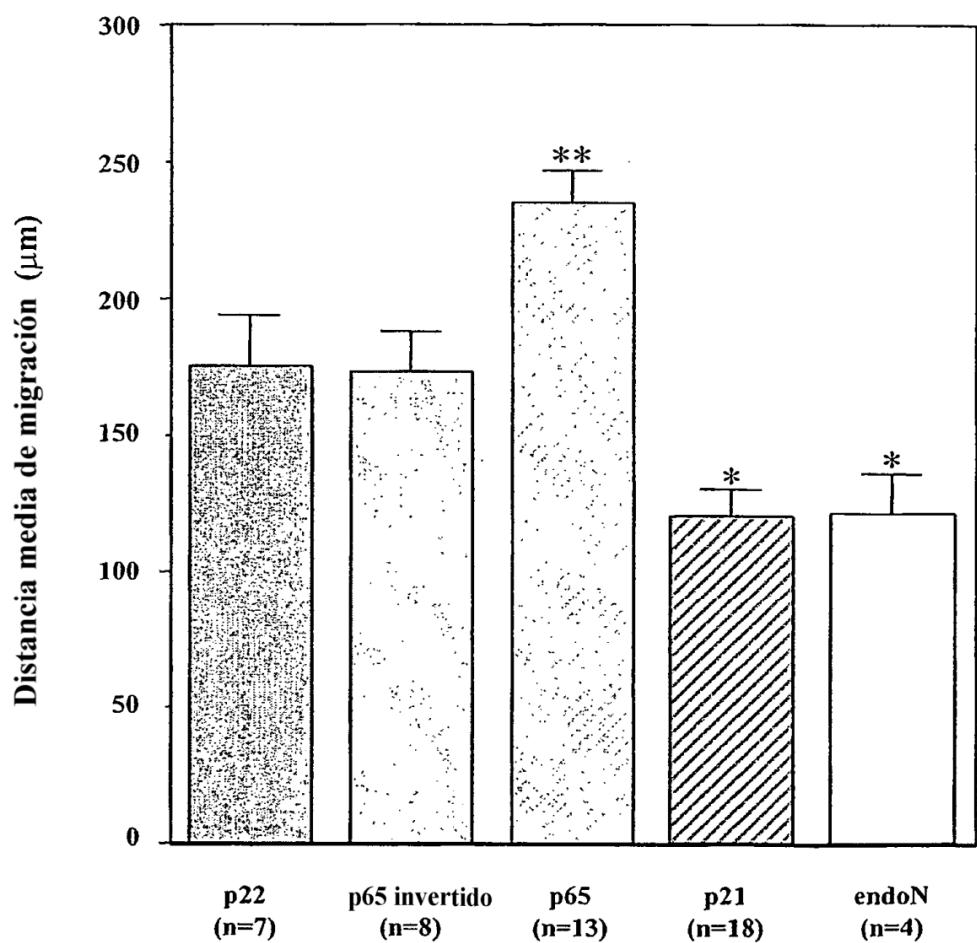
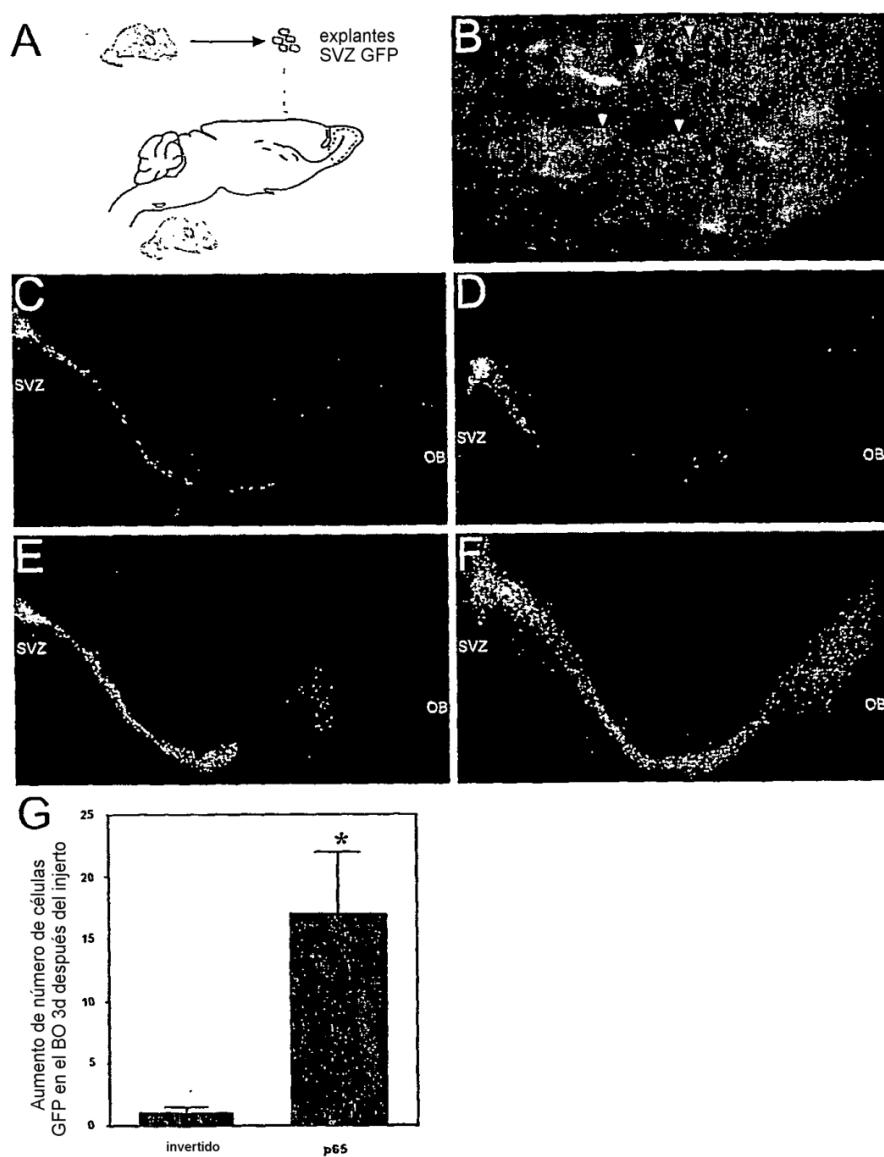


Figura 7

**Figura 8**

Hemisección de Médula Espinal

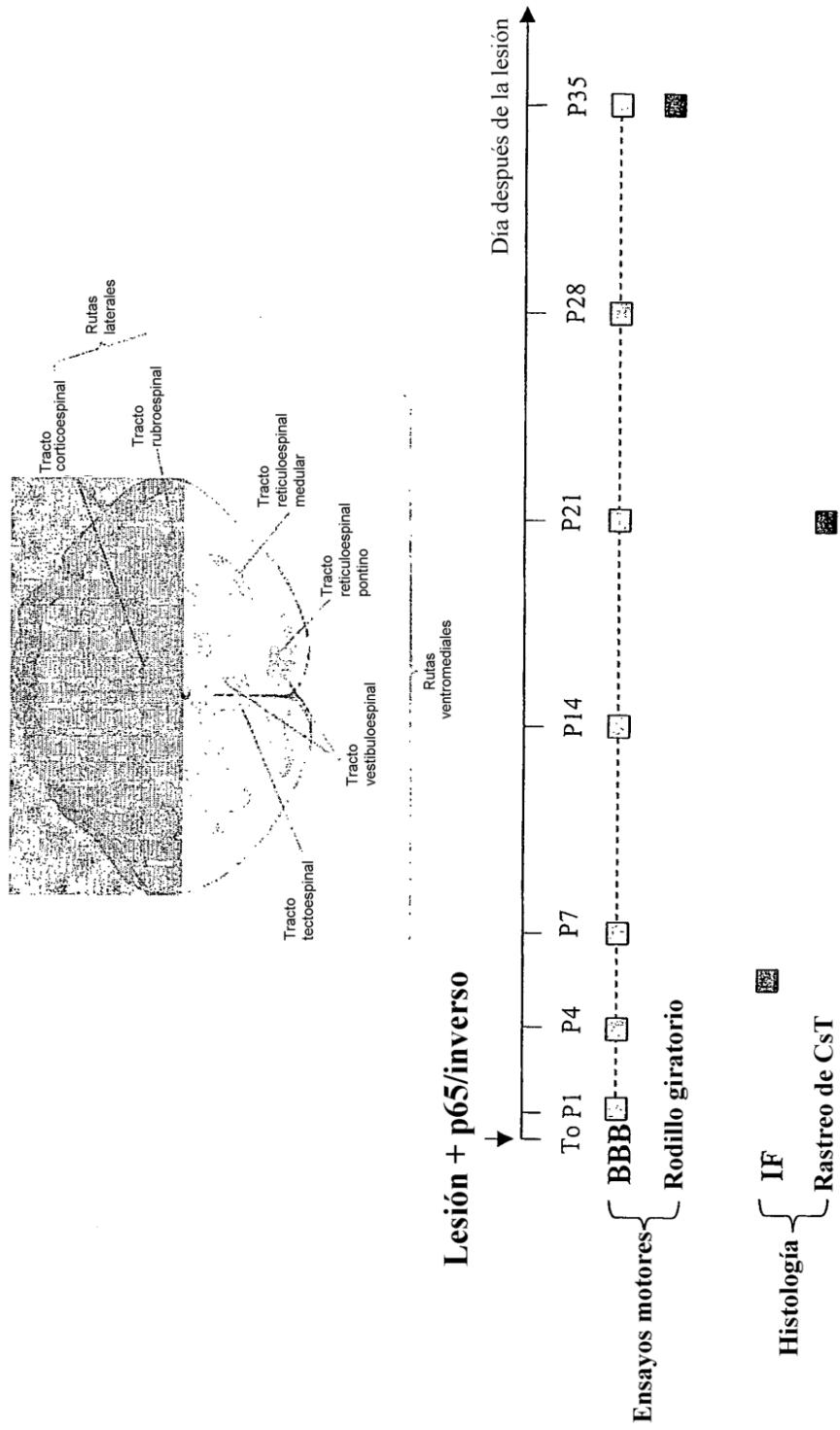
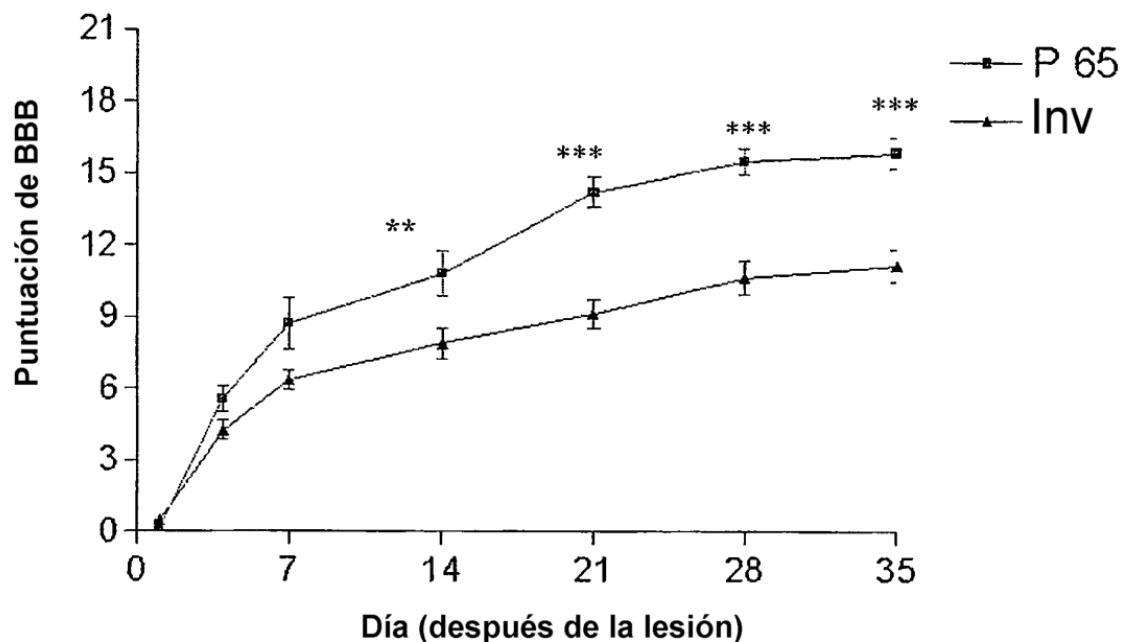
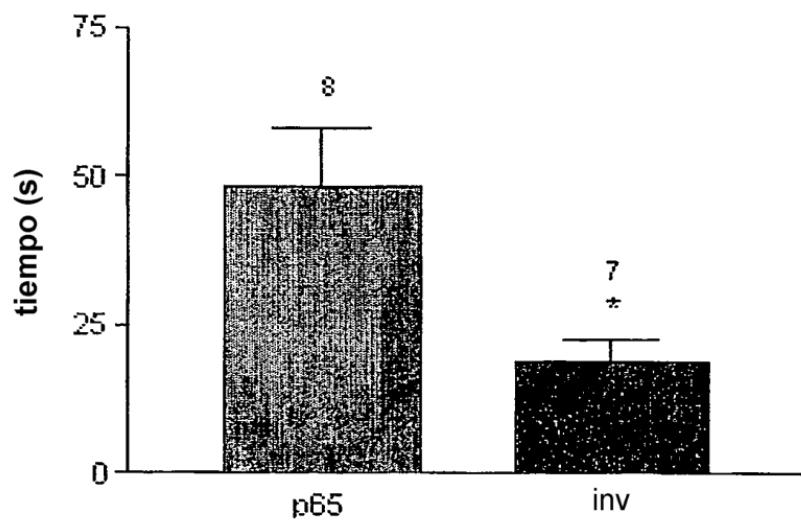


Figura 9

A**B**

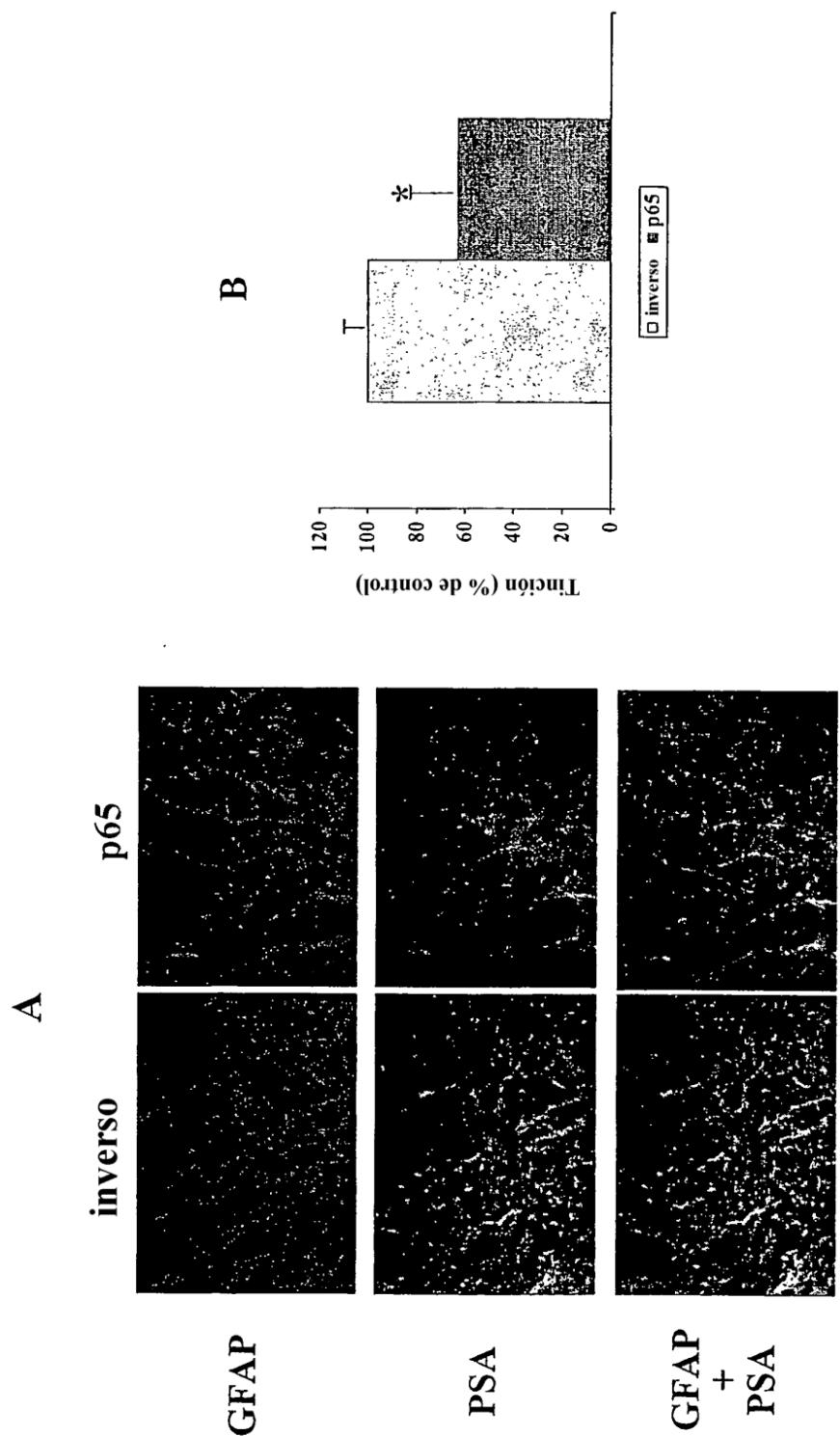


Figura 11

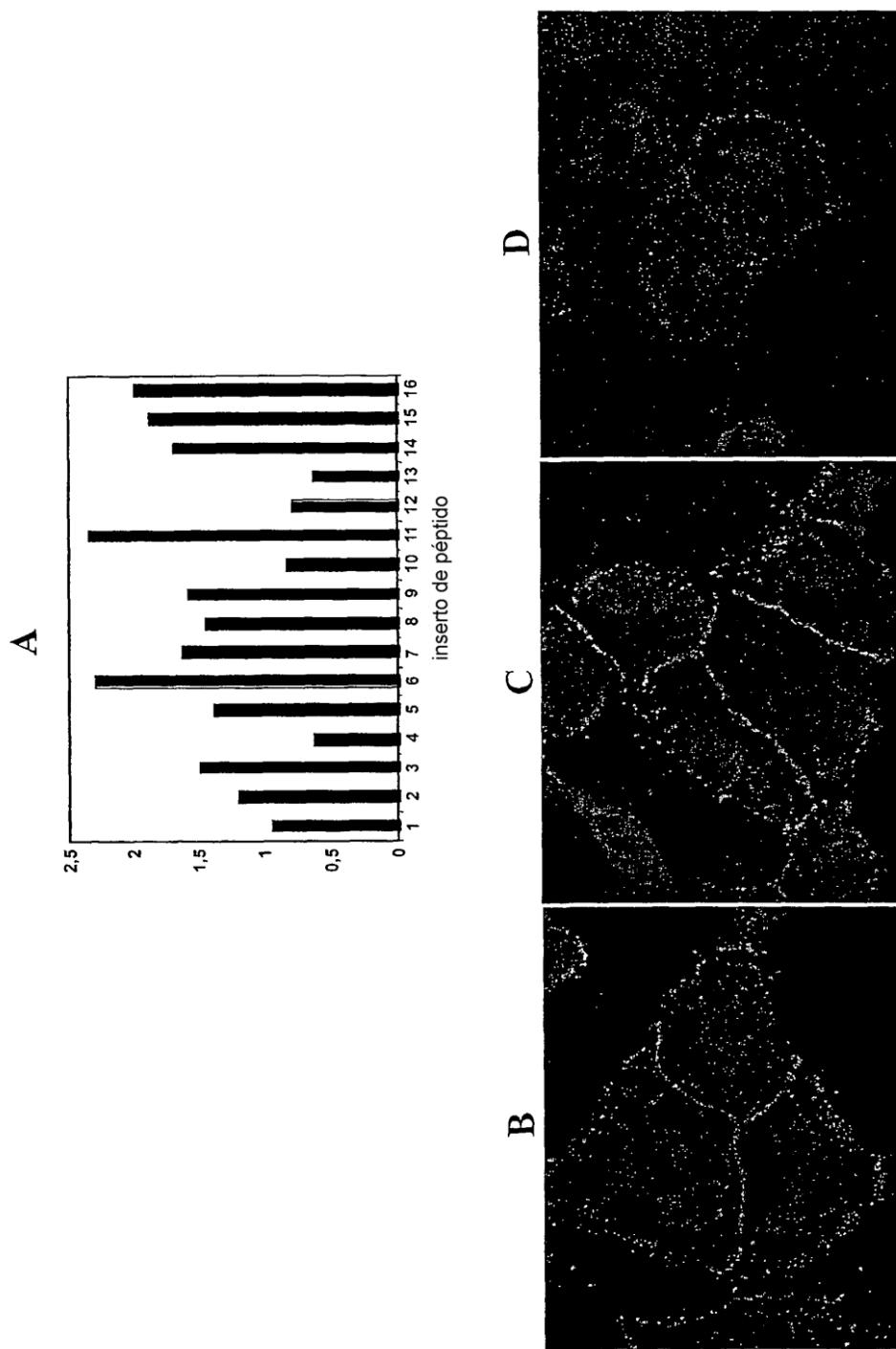


Figura 12