

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 362**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07731062 .1**
96 Fecha de presentación: **28.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1993587**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **USO DE LA PROTEÍNA DE HOMEODOMINIO ENGRAILED COMO ANSIOLÍTICO.**

30 Prioridad:
28.02.2006 FR 0601749

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.03.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
3, RUE MICHEL ANGE
75016 PARIS, FR**

72 Inventor/es:
**PROCHIANTZ, Alain y
VOLOVITCH, Michel**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

ES 2 376 362 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 la proteína de homeodominio *Engrailed* como ansiolítico.

La presente invención se refiere a la utilización de factores de transcripción *Engrailed* para incrementar el metabolismo dopaminérgico, y en particular como ansiolíticos.

Las proteínas *Engrailed* son factores de transcripción de la clase de proteínas de homeodominio. Los mamíferos poseen dos genes *Engrailed*: *Engrailed-1* y *Engrailed-2*; las dos proteínas correspondientes que tienen una actividad biológica similar se designarán colectivamente en el resto del documento con el término general *Engrailed* (EN).

En los recién nacidos y en adultos, EN se expresa en las neuronas dopaminérgicas (DA) de la sustancia negra (que degeneran en la enfermedad de Parkinson), en las células granulares del cerebelo y en los núcleos dopaminérgicos del mesencéfalo que desempeñan un papel importante en la regulación del estado de ánimo y el desarrollo de conductas adictivas.

Se ha demostrado (Simon y col. J Neurosci. 21 (9): 3126-34, 2001) que la pérdida de EN durante el desarrollo viene seguida por una rápida degeneración de las neuronas dopaminérgicas, y que una de las dianas transcripcionales de EN es la alfa-sinucleína, de la cual se ha demostrado su vinculación genética con ciertas formas familiares de la enfermedad de Parkinson (POLYMERPOULOS y col. Science. 276, 2045-7, 1997), y que constituiría un regulador negativo de la transmisión dopaminérgica (ABELIOVICH y col., Neuron, 25, 239-52, 2000).

Todas estas observaciones sugieren fuertemente la participación de EN en las enfermedades neurodegenerativas, y especialmente en enfermedades que afectan a las neuronas dopaminérgicas, como la enfermedad de Parkinson. Se ha propuesto regular la actividad de EN para prevenir estas enfermedades o retrasar su evolución. Así, la Solicitud PCT WO 2004/104030 describe péptidos que modulan la actividad de *Engrailed*, y propone su uso para prevenir o tratar enfermedades neurodegenerativas.

Los inventores ahora han descubierto que, además de su actividad en la supervivencia neuronal, EN también tienen una acción directa sobre el metabolismo de la dopamina.

Se ha observado que la administración de *Engrailed* a ratones induce en ellos un efecto ansiolítico, que estaba acompañado por un aumento significativo en la relación DOPAC/DA, lo que refleja un incremento del metabolismo de la dopamina en el núcleo estriado, así como un aumento de la serotonina cortical.

La presente invención se refiere a la utilización de una proteína *Engrailed* para la obtención de un medicamento ansiolítico.

Como se ha mencionado anteriormente, en el presente documento se entiende por "proteínas *Engrailed*" cualquiera de las proteínas *Engrailed-1* o *Engrailed-2* de un vertebrado. Preferentemente, se seleccionará una proteína *Engrailed* de la especie a la que pertenece el sujeto a tratar.

De manera ventajosa, dicho medicamento es una preparación inyectable, preferentemente por vía intravenosa.

La presente invención se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos que ilustran las propiedades ansiolíticas de *Engrailed*, y su efecto sobre el metabolismo de la dopamina.

Ejemplo 1

Se evaluaron los efectos sobre el comportamiento de ratones de una inyección diaria de EN2 en dosis de 3 ó 300 µg/kg de la siguiente manera:

Sujetos:

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones Swiss macho, de 6 meses.

Preparación de *Engrailed-2* inyectada:

La proteína EN2 de pollo (número de acceso UniProtKB: Q05917) se produce en forma recombinante en bacterias *E. coli* BL21RP-CodonPlus® (Stratagene) transformadas con el plásmido pGEXSEn2, como resultado de la inserción de la secuencia codificante de EN2 completa en un plásmido pGEX-6P (Amersham-GE Healthcare), en fusión traduccional con la secuencia que codifica para la glutatión S-transferasa (GST).

La proteína expresada es una proteína de fusión que contiene la secuencia de la glutatión S-transferasa, seguida de un sitio de escisión para la proteasa PreScission™ (proteasa recombinante resultante de la fusión entre la GST y la proteasa 3C del rinovirus humano, Amersham-GE Healthcare), y la secuencia completa de EN2.

Esta proteína de fusión se purificó a partir de un lisado de bacterias transformadas por cromatografía de afinidad en columna de glutatión (GSTrap, Amersham-GE Healthcare), y la proteína EN2 se eluyó de la columna tras de la escisión con la proteasa PreScission™.

15

Pruebas realizadas:

Laberinto en Y: en esta prueba, el animal se sitúa en un laberinto en forma de Y. Se anota cada visita a uno de los brazos del laberinto, y el número total de visitas a uno u otro brazo, y se registra su paso de un brazo a otro. El porcentaje de alternancia entre los brazos se utiliza para evaluar la memoria de trabajo, el número total de visitas a los brazos sirve para evaluar la actividad y la evolución de esta actividad se utiliza para evaluar la habituación a corto y a largo plazo.

Rotarod: se mide el tiempo durante el cual el animal es capaz de permanecer en un cilindro en rotación, lo que permite evaluar la coordinación motora y el equilibrio.

Tail-pinch (pinzamiento de la cola): Esta prueba mide el umbral del dolor.

Campo abierto: El animal se coloca en una cámara iluminada en una sesión de 30 minutos. La distancia recorrida y el número de erguimientos permite evaluar la actividad locomotora y exploratoria; la evolución de esta actividad entre la primera y la segunda mitad de la prueba permite evaluar la memoria de tipo habituación. Por último, la determinación del tiempo empleado y de la distancia recorrida, en el centro del recinto (que constituye un entorno estresante) sirve para evaluar el nivel de ansiedad.

El centro del campo abierto se define como un cuadrado en el centro del recinto que representa el 25% de la superficie total. Las variables índice del comportamiento de tipo ansioso son el porcentaje de tiempo empleado y el porcentaje de la distancia recorrida en el centro. El carácter estresante del centro está indicado por una conducta de evitación de confrontación con el centro, y por tanto por valores inferiores al 25% para estas dos variables. Un efecto de tipo ansiolítico de un tratamiento se manifiesta por un aumento del porcentaje de tiempo empleado y la distancia recorrida en el centro.

Laberinto en cruz elevado: se trata de un dispositivo en forma de cruz con 2 brazos abiertos y 2 brazos cerrados en los laterales. El animal se coloca en el laberinto en una sesión de 5 minutos. Se mide el número total de entradas en los 2 tipos de brazos (actividad exploratoria en un entorno estresante), así como el porcentaje de entradas en los brazos abiertos (los más estresantes), y el tiempo empleado en estos brazos. En la mayoría de los casos, el ratón pasa menos del 50% del tiempo y realiza menos del 50% de entradas en los brazos abiertos, lo que refleja el carácter estresante de éstos. Se considera un comportamiento de tipo ansioso aún más pronunciado cuando los porcentajes de tiempo y de entradas en los brazos abiertos son bajos. El efecto de tipo ansiolítico de un tratamiento se manifiesta por el aumento de los **porcentajes de tiempo y de entradas en los brazos abiertos**.

50

Procedimiento:

Las inyecciones se realizaron según el siguiente protocolo:

Veintiún animales se repartieron al azar en cuatro grupos que recibieron inyecciones de:

NaCl al 0,9%: grupo control (Sal); (n = 10);
 EN2 3 µg/kg: grupo EN3 (n = 10);
 EN2 300 µg/kg: grupo EN300 (n = 10).

Las inyecciones se realizan por vía intravenosa en la cola.

El calendario de las inyecciones y las pruebas es el siguiente:

5	Día 1:	t = 0:	Inyección 1
		t = 1h:	Laberinto en Y - Sesión 1
	Día 2:	t = 0:	Inyección 2
		t = 1h:	Laberinto en Y - Sesión 2
10		t = 1h40:	Rotarod - Sesión 1
	Día 3:	t = 0:	Inyección 3
		t = 1h:	Laberinto en Y - Sesión 3
		t = 1h40:	Rotarod - Sesión 2
	Día 4:	t = 0:	Inyección 4
15		t = 1h:	Laberinto en Y - Sesión 4
		t = 1h40:	Rotarod - Sesión 3
		t = 1h55:	<i>Tail-pinch</i> - Sesión 1
	Día 7:	t = 0:	Inyección 5
		t = 1 h:	Campo abierto
20		t = 1h40:	Rotarod - Sesión 4
		t = 1h55:	<i>Tail-pinch</i> - Sesión 2
	Día 8:	t = 0:	Inyección 6
		t = 1h:	Laberinto en cruz elevado

25 **Resultados:**

Actividad locomotora:

30 No ha habido ningún efecto significativo de EN2 a 3 y 300 µg/kg ni para el laberinto, ni para el rotarod, ni para la prueba de *tail-pinch*, no en campo abierto. Por tanto no podemos concluir la existencia de un efecto de EN2 sobre la actividad locomotora y exploratoria en las condiciones experimentales utilizadas.

Memoria de tipo habituación:

35 La habituación a un entorno se caracteriza por una actividad exploratoria que disminuye a medida que se va conociendo este entorno. Las variables índice de habituación son las actividades horizontales y verticales, medidas en la 2ª mitad de una sesión en campo abierto, y expresadas como porcentaje de la actividad de toda la sesión. La habituación está indicada por valores de estas dos variables por debajo del 50%.

40 El porcentaje de distancia al centro y los erguimientos en la 2ª mitad de la sesión es significativamente inferior al 50% en los tres grupos. EN2 no altera significativamente estas dos variables. No podemos concluir la existencia de un efecto de EN2 sobre la memoria de tipo habituación en las condiciones experimentales utilizadas.

Actividad ansiolítica

45

Campo abierto

50 Los resultados se muestran en la Figura 1, que representa el porcentaje de tiempo de permanencia en el centro (A), y el porcentaje de distancia recorrida en el centro (B) para los ratones control (Sal; □), los ratones que recibieron una inyección de 3 µg/kg (†), y los ratones que recibieron una inyección de 300 µg/kg (□) de EN2. Diferencia frente al 25%: ## p <0,01, ### p <0,001.

Diferencia frente al grupo control (Sal): * p <0,05; ** p <0,01.

55 Constatamos que para los 3 grupos de animales, los porcentajes de tiempo empleado y la distancia recorrida en el centro son inferiores al 25%, lo que muestra una evitación del centro, y que indica su carácter estresante.

A una dosis de 3 µg/kg, EN2 no tiene efectos significativos sobre el comportamiento de los animales, sin embargo, a una dosis de 300 µg/kg, EN2 aumenta de manera muy significativa (p <0,01) el porcentaje de tiempo empleado y el

porcentaje de distancia recorrida en el centro, lo que indica un efecto de tipo ansiolítico.

Laberinto en cruz elevado

- 5 Los resultados se muestran en la Figura 2, que representa el número total de entradas en los brazos abiertos o cerrados (A), el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (B) y el porcentaje de entradas en estos brazos (C) para los ratones control (Sal), los ratones que recibieron una inyección de 3 µg/kg (□) de EN2, y los ratones que recibieron una inyección de 300 µg/kg (◻) de EN2. Diferencia frente al 50%: ## p <0,01, ### p <0,001. Diferencia frente al grupo control (Sal): * p <0,05.
- 10 Los tres grupos de animales presentan porcentajes de tiempo y de entradas en los brazos abiertos por debajo del 50%, lo que refleja el carácter estresante de los brazos abiertos.
- A una dosis de 3 µg/kg, EN2 no tiene ningún efecto significativo sobre el comportamiento de los animales.
- 15 A una dosis de 300 µg/kg, EN2 aumenta el número de entradas en los brazos, abiertos o cerrados, lo que sugiere un aumento del comportamiento exploratorio y/o una disminución de la ansiedad, y también aumenta significativamente el porcentaje de tiempo empleado en los brazos abiertos.
- 20 Los resultados de estos experimentos indican que el tratamiento con la proteína EN2 induce un efecto de tipo ansiolítico.

Ejemplo 2: Efecto de *Engrailed-2* sobre aminas del cerebro.

- 25 Al día siguiente de los ensayos descritos en el Ejemplo 1, los ratones del grupo control y del grupo EN300 recibieron una 7ª inyección, de NaCl al 0,9% y de EN2 a una dosis de 300 µg/kg, respectivamente.
- Una hora después de la inyección, los animales fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se colocaron en una pletina refrigerada (0-4°C). Las estructuras del cerebro (corteza, núcleo estriado e hipocampo) fueron disecadas, pesadas y se colocaron en un tubo Eppendorf a -30°C antes de la preparación de las muestras para cromatografía.
- 30 Los tejidos se homogeneizaron con un mortero de teflón en 500 µl de una disolución de ácido perclórico 0,1 N que contiene el 0,05% de metabisulfito de sodio. Las muestras se centrifugaron (25.000xg, 30 min, 4°C). Se recogieron los sobrenadantes y se congelaron antes de su paso por cromatografía.
- 35 La dopamina (DA) y uno de sus metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y la serotonina, se analizaron en los sobrenadantes por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).
- 40 Los compuestos se separaron por cromatografía de reparto en fase inversa, en una columna de sílice injertada C18; la elución se llevó a cabo con una mezcla de metanol/agua: 15/85.
- La detección se realiza mediante un espectrómetro de masas LCQ (ThermoFinnigan). Se trata de una trampa de iones equipada con una fuente de ionización de tipo electropulverización que funciona en modo de ionización
- 45 positivo.
- Los resultados se muestran en las siguientes Tablas I, II y III.

50

TABLA I

NÚCLEO ESTRIADO	DA (ng/mg de tejido)	5HT (ng/mg)	DOPAC (ng/mg)	DOPAC/DA
Control (10)	Media 15,42	Media 1,42	Media 6,36	Media 0,41
	DEM 1,45	DEM 0,29	DEM 0,54	DEM 0,03
Tratados (10)	Media 14,08	Media 1,14	Media 8,33	Media 0,62
	DEM 1,70	DEM 0,19	DEM 1,15	DEM 0,08
	ne	ne	p < 0,1	p < 0,05

TABLA II

CORTEZA	DA (ng/mg de tejido)	5HT (ng/mg)	DOPAC (ng/mg)	DOPAC/DA
Control (10)	Media 1,11	Media 2,42	Media 5,89	Media 5,57
	DEM 0,05	DEM 0,21	DEM 0,22	DEM 0,35
Tratados (10)	Media 1,25	Media 3,10	Media 6,17	Media 4,97
	DEM 0,08	DEM 0,26	DEM 0,26	DEM 0,49
	ne	p < 0,1	ne	ne

5

TABLA III

HIPOCAMPO	DA (ng/mg de tejido)	5HT (ng/mg)	DOPAC (ng/mg)	DOPAC/DA
Control (10)	Media 0,12	Media 0,28	Media 0,51	Media 3,74
	DEM 0,01	DEM 0,06	DEM 0,06	DEM 0,30
Tratados (10)	Media 0,12	Media 0,28	Media 0,43	Media 3,93
	DEM 0,02	DEM 0,06	DEM 0,09	DEM 0,24
	ne	ne	ne	ne

Se observa un ligero aumento del DOPAC y un gran aumento (50% p < 0,05) de la relación DOPAC/DA en el núcleo 10 estriado, así como un ligero aumento de la 5HT en la corteza.

REIVINDICACIONES

1. Proteína *Engrailed* para su uso como medicamento ansiolítico.
- 5 2. Proteína *Engrailed* para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho medicamento se presenta en forma de preparación inyectable.

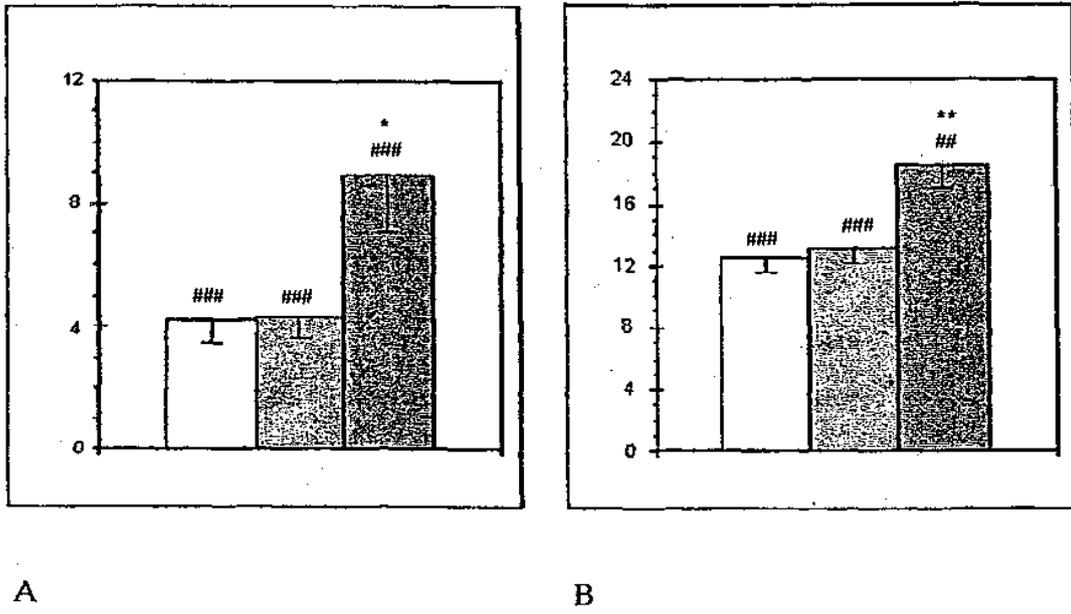
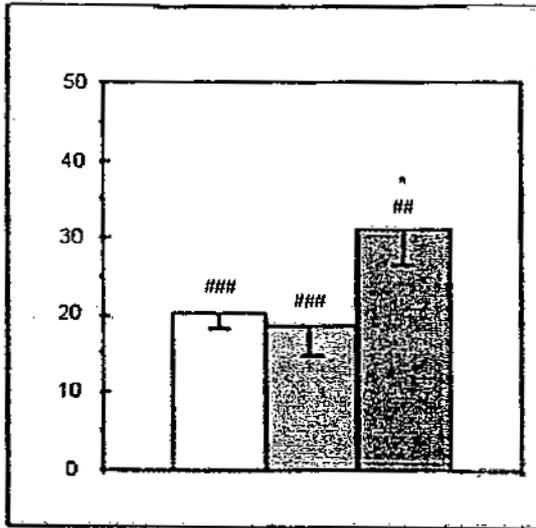
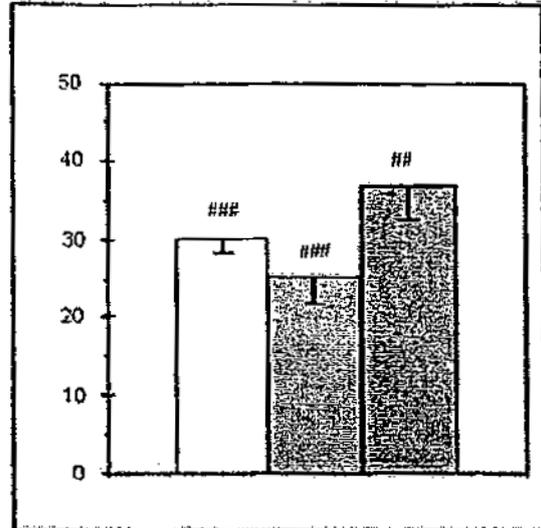


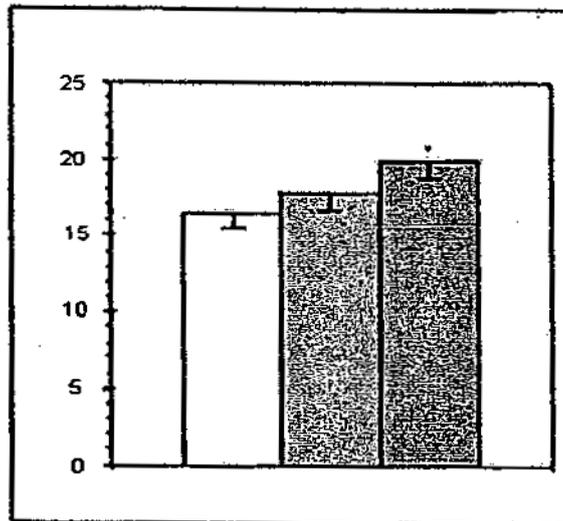
FIGURA 1



A



B



C

FIGURA 2