

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 458**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2010 E 10704386 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2387579**

54 Título: **Polipéptidos de direccionado específico a células diana de Otx2**

30 Prioridad:

19.01.2009 FR 0900217

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.06.2014

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR y
ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PROCHIANTZ, ALAIN;
DI NARDO, ARIEL;
BEURDELEY, MARINE y
HENSCH, TAKAO K.**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 471 458 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

Polipéptidos de direccionado específico a células diana de Otx2.

5 La presente invención se refiere a unos polipéptidos que permiten el direccionado específico de una molécula de interés a células diana de la homeoproteína Otx2 y, en particular, de las neuronas ganglionares y de las neuronas bipolares retinianas.

10 La retina es la capa celular que cubre el fondo del ojo. Contiene diferentes tipos de neuronas, cuya función es captar la energía luminosa y transformarla en señal nerviosa, y también contiene células gliales.

15 Esquemáticamente, la retina comprende tres capas principales de neuronas: las neuronas fotorreceptoras (conos y bastones), las neuronas bipolares y las neuronas ganglionares; otras neuronas, las neuronas amacrinas y las neuronas horizontales desempeñan un papel regulador. Las neuronas fotorreceptoras reaccionan con la luz, y la señal que generan es transmitida por medio de neuronas bipolares, a las neuronas ganglionares, cuyos axones constituyen las fibras nerviosas del nervio óptico, asegurando el envío de la información al cerebro.

20 La degeneración de las neuronas retinianas está implicada en diversas retinopatías. Así, la degeneración de las neuronas fotorreceptoras esta implicada en ciertas patologías, tales como la retinitis pigmentaria o la degeneración macular. En otras patologías, tales como el glaucoma, son principalmente las neuronas ganglionares las que están afectadas.

25 La Otx2 (Orthodenticle homolog 2) es una homeoproteína que contiene un homeodominio de tipo bicoide (SIMEONE y otros, Embo J, 12, 2735-47, 1993). Pertenece a la familia de las homeoproteínas Otx, que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del cerebro durante la embriogénesis (ACAMPORA y otros, Prog Neurobiol, 64, 69-95, 2001; SIMEONE y otros, Curr Opin Genet Dev, 12, 409-15, 2002).

30 Con ocasión de trabajos anteriores, el equipo de inventores ha puesto en evidencia el efecto positivo de una homeoproteína, Otx2 (Orthodenticle homolog 2) sobre la supervivencia de las neuronas ganglionares retinianas. Estos resultados se detallan en la solicitud PCT WO/2009/106767.

35 Se ha demostrado también que la Otx2 desempeñaba un papel en el desarrollo postnatal de la corteza cerebral, y en particular en su plasticidad. La Otx2, que es sintetizada a nivel de la retina, es transportada hasta la corteza cerebral visual, en la que es capturada por las neuronas parvalbúminas de la corteza cerebral visual, lo que induce su maduración, y conlleva, en primer lugar, la apertura y a continuación, poco tiempo después, el cierre del periodo crítico de plasticidad (SUGIYAMA y otros, Cell, 134, 508-20, 2008).

40 Un periodo crítico de plasticidad es una fase del desarrollo postnatal representada por un intervalo de tiempo de duración limitada (variable según la especie animal, y según la función sensorial en cuestión), durante el cual los estímulos sensoriales son capaces de modificar la organización funcional de las zonas corticales correspondientes.

45 Al llevar a cabo sus investigaciones, los inventores han descubierto que en la retina, la Otx2 se fijaba específicamente a las neuronas ganglionares y a las neuronas bipolares, y han identificado la región de la Otx2 responsable de esta fijación. Han demostrado además que esta misma región era también responsable del direccionado de la Otx2 hacia las neuronas parvalbúminas de la corteza cerebral visual, interactuando con la red perineuronal de proteoglicanos de sulfato de condroitina, que recubre estas neuronas, y que permitía, entrando en competición con la proteína Otx2 endógena capturada por las neuronas parvalbúminas, inhibir esta captura. Esta inhibición conlleva el retorno de estas neuronas a un estado inmaduro, permitiendo la reapertura de la fase crítica de plasticidad.

50 La región responsable del direccionado de la Otx2 de sus células diana está constituida por una secuencia peptídica de 15 aminoácidos. Los inventores han constatado además que este polipéptido, aislado, poseía la misma especificidad de fijación que la proteína Otx2 entera.

55 La presente invención tiene por objeto un polipéptido de direccionado celular aislado definido por la secuencia B₁B₂X₁B₃B₄X₂B₅X₃X₄X₅B₆X₇X₈X₉ (SEC ID n° 1), en la que:

B₁, B₂, B₃, B₄, B₅ y B₆ representan, independientemente, arginina o lisina;

X₁ y X₈ representan, independientemente, asparginina o glutamina;

60 X₂ representa ácido aspártico o ácido glutámico;

X₃, X₄ y X₆ representan, independientemente, treonina o serina;

X₅ representa fenilalanina, tirosina o triptófano;

X₇ representa alanina o glicina;

X₉ representa leucina, isoleucina o valina.

65 Este polipéptido, en presencia de células retinianas, se une específicamente a las neuronas ganglionares y a las

neuronas bipolares.

Unos modos de realización preferidos de la presente invención son polipéptidos en los que:

- 5 - al menos uno de los aminoácidos B₁, B₃, B₄, B₅ y B₆ es una arginina; y/o
 - B₂ es una lisina; y/o
 - al menos uno de los aminoácidos X₁ y X₈ es una glutamina; y/o
 - X₂ es un ácido glutámico; y/o
 10 - al menos uno de los aminoácidos X₃, X₄ y X₆ es una treonina; y/o
 - X₅ es una fenilalanina; y/o
 - X₇ es una alanina; y/o
 - X₉ es una leucina.

15 Según un modo de realización particularmente preferido de un polipéptido de direccionado celular conforme a la invención, éste está definido por la secuencia siguiente: RKQRRERTTFTRAQL (SEC ID nº 2).

Los aminoácidos que constituyen un polipéptido conforme a la invención, pueden ser aminoácidos naturales, de la serie L. Se puede sustituir también todo o parte de estos aminoácidos por sus isómeros de la serie D, a fin de aumentar la estabilidad del polipéptido *in vivo*. Los aminoácidos, de la serie L o de la serie D, pueden también, 20 llegado el caso, estar encadenados según una secuencia inversa de la secuencia SEC ID nº 1 o de la secuencia SEC ID nº 3, indicadas anteriormente.

La presente invención tiene también por objeto la utilización de un polipéptido de direccionado celular conforme a la invención, para permitir el direccionado específico de una carga de interés de células diana de la Otx2.

25 Como ejemplos de células diana de la Otx2 se citarán, además de las neuronas ganglionares y de las neuronas bipolares retinianas ya mencionadas anteriormente, las neuronas recubiertas de una red perineuronal de proteoglicanos de sulfato de condroitina, que incluyen, en particular, neuronas que expresan la parvalbúmina (neuronas PV) localizadas en particular en la corteza cerebral visual. Otras células diana de la Otx2 son unas neuronas del cerebro medio, en particular las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y del área tegmental ventral, y sus dianas sinápticas.

Otras células dianas de la Otx2 pueden fácilmente ser identificadas con la ayuda de un polipéptido de direccionado conforme a la invención, por ejemplo asociando dicho polipéptido a un marcador, poniendo en contacto dicho polipéptido marcado con una muestra de un tejido o de un órgano a ensayar, y detectando, en dicha muestra, la presencia o la ausencia de células que fijan dicho polipéptido y, en caso de presencia de células que fijan dicho polipéptido, su localización.

35 Se designa bajo el término general de: "carga" cualquier molécula o complejo molecular que se desea dirigir a una célula diana.

Las cargas que pueden ser transportadas por polipéptidos de direccionado celular conformes a la invención, pueden ser de naturaleza muy variada: puede tratarse de moléculas químicas, de macromoléculas, tales como, por ejemplo, 45 unas proteínas o ácidos nucleicos, o partículas tales como los liposomas, nanopartículas o partículas virales o pseudovirales. Puede tratarse de marcadores destinados a permitir la detección y/o la localización de células diana de la Otx2 en un tejido o un órgano, o de principios activos que se desea dirigir específicamente a las células diana de la Otx2.

Si se desea obtener no solamente el direccionado de la carga de interés de la célula diana, sino también su entrada en esta, se puede asociar ventajosamente un polipéptido de direccionado celular conforme a la invención, con un polipéptido transductor.

Los polipéptidos transductores son polipéptidos que comprenden una secuencia denominada "dominio de transducción", que les confiere la capacidad de penetrar en el interior de una célula viva, independientemente de la presencia de transportadores o de receptores específicos.

Un gran número de polipéptidos transductores son conocidos por sí mismos. Como ejemplos no limitativos, se citarán: las penetratinas, que son polipéptidos derivados de la tercera hélice de un homeodominio; los polipéptidos derivados de la proteína Tat de HIV1, y en particular del fragmento 48-60 de dicha proteína; las poliargininas; los polipéptidos derivados de la proteína VP22 de HSV; polipéptidos derivados de una secuencia señal conjugada con una secuencia de localización nuclear; los transportadores que se derivan de una fusión entre una porción de un neuropéptido, la galanina y un polipéptido de veneno de avispa.

La presente invención tiene también por objeto un polipéptido aislado que contiene un polipéptido de direccionado celular conforme a la invención y un polipéptido transductor.

Este polipéptido puede ser un fragmento aislado de la Otx2, que comprende la totalidad del homeodominio, y los 2 aminoácidos que preceden inmediatamente a éste. Este fragmento puede también ser suprimido de una parte de la secuencia del homeodominio provisto de la secuencia de direccionado conforme a la invención, y se conserva al menos la tercera hélice del homeodominio.

5 Puede también tratarse de un polipéptido quimérico que asocia un polipéptido de direccionado celular conforme a la invención con un polipéptido transductor heterólogo. En este ámbito, los polipéptidos transductores preferidos son los de la familia de las penetratinas. Así, se puede asociar un polipéptido de direccionado celular conforme a la invención, con un fragmento de homeodominio de una homoproteína distinta de la Otx2, que comprende al menos la
10 tercera hélice de dicho homeodominio, o bien con derivados de penetratina tales como los descritos, por ejemplo, en las solicitudes PCT WO 00/01417 o WO 00/29427.

La presente invención tiene asimismo por objeto unas composiciones que comprenden un polipéptido de
15 direccionado celular conforme a la invención, eventualmente asociado con un polipéptido transductor, unido a una carga.

La unión entre el polipéptido de direccionado celular conforme a la invención y la carga puede efectuarse de diferentes maneras, conocidas en sí mismas, según particularmente la naturaleza de la carga en cuestión, y las modalidades de utilización consideradas. Generalmente, el polipéptido de direccionado celular (eventualmente
20 fusionado con un polipéptido transductor) y la carga se asociarán de manera covalente, llegado el caso por medio de un brazo espaciador, por ejemplo un enlazador peptídico. Pueden también estar asociados de manera no covalente, por medio de interacciones iónicas o hidrófobas; en este caso, el polipéptido de direccionado puede estar unido a una molécula, capaz de unirse de manera no covalente a la carga. Esta molécula puede ser, en particular, un polipéptido transductor, tal como una penetratina, capaz de unirse por interacciones hidrófobas a una carga que
25 posee uno o varios dominios hidrófobos, tal como se describe en la solicitud PCT WO 04/069279.

Según un modo de realización particular de una composición conforme a la invención, dicha composición se presenta en forma de un polipéptido quimérico, que comprende un polipéptido de direccionado celular conforme a la invención, unido con una o varias secuencias polipeptídicas que constituyen la carga, y eventualmente con un polipéptido transductor. El orden en el que están dispuestos el polipéptido de direccionado celular, el polipéptido
30 transductor y las secuencias polipeptídicas que constituyen la carga no es crítico.

A título de ejemplos no limitativos de polipéptidos quiméricos conforme a la invención, se citarán unos polipéptidos quiméricos que comprenden un polipéptido de direccionado celular conforme a la invención, un polipéptido transductor, una o varias secuencias de regulación de la transcripción y/o una o varias secuencias de regulación de la traducción. El término polipéptido quimérico se utiliza aquí en un sentido habitual, para designar polipéptidos que
35 asocian secuencias de origen diferentes, lo que excluye por lo tanto las proteínas Otx2 nativas.

Numerosas secuencias de regulación de la transcripción o de regulación de la traducción son conocidas en sí mismas.
40

Como ejemplos, se citarán:

45 - secuencias de activación de la transcripción tales como, por ejemplo, el trans-activador VP16 del virus HSP (virus del herpes simple);

- secuencias de represión de la transcripción, tales como la de Engrailed (que corresponde, por ejemplo, a los aminoácidos 1-298 de la proteína Engrailed de *Drosophila melanogaster* (GenBank AAA65478);

50 - secuencias de regulación (en particular de activación) de la traducción, tales como sitios de unión de eIF4E que se detectaron, por ejemplo, en numerosas homeoproteínas (véase, por ejemplo, TOPISIROVIC & BORDEN, *Histol. Histopathol.*, 20, 1275-1284, 2005), entre ellas la Otx2.

Los polipéptidos quiméricos conformes a la invención se pueden obtener mediante diferentes métodos bien conocidos en sí mismos, en particular por síntesis peptídica o mediante las técnicas clásicas de ingeniería genética.
55

Polipéptidos quiméricos conformes a la invención, que comprenden un polipéptido de direccionado celular, un polipéptido transductor, una o varias secuencias de regulación de la transcripción y/o una o varias secuencias de regulación de la traducción, pueden ser utilizados en las mismas aplicaciones que la proteína Otx2 nativa, y en particular para aumentar la supervivencia de las células diana de la Otx2. Así, se pueden utilizar en particular para prevenir o tratar la degeneración de las neuronas ganglionares y/o de las neuronas bipolares retinianas, que intervienen en particular en el glaucoma, así como en diversas neuropatías ópticas, genéticas o vasculares, por ejemplo la retinitis pigmentaria o las lesiones del nervio óptico. Son también utilizables en el ámbito del tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas (tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple o la enfermedad del Parkinson). Generalmente, estos polipéptidos quiméricos se pueden utilizar en dichas aplicaciones según las mismas modalidades que las descritas para la Otx2 en la solicitud PCT WO/2009/106767.
60
65

5 Para la aplicación de la presente invención, basta con poner dicho polipéptido quimérico en contacto con las células diana; en efecto, éste penetra en ellas gracias a la secuencia de internalización proporcionada por el polipéptido transductor. De manera preferida, dicha puesta en contacto se efectúa a una concentración de dicho polipéptido quimérico de 0,5 a 10 nM, ventajosamente de 1 a 5 nM, y de manera particularmente ventajosa de 1,5 a 3 nM.

10 *In vitro*, basta con añadir dicho polipéptido quimérico al medio de cultivo de las neuronas. *In vivo*, se puede administrar por diferentes vías, localmente, en particular por inyección o infusión en el humor vítreo, o en el espacio suborbital, o en forma de colirio, o de pomada oftálmica. Se puede administrar también con la ayuda de un dispositivo de liberación controlada, por ejemplo en forma de implante intraocular. Llegado el caso, se puede administrar de manera sistémica, por ejemplo por inyección intravenosa.

15 Las dosis de polipéptido quimérico a administrar *in vivo* para obtener la concentración deseada en contacto con las células diana, pueden ser fácilmente determinadas y adaptadas por el experto en la técnica en función, en particular, de las modalidades de administración consideradas.

20 Se puede efectuar también esta puesta en contacto poniendo las células diana en presencia de células transformadas para expresar o sobreexpresar, y segregar dicho polipéptido quimérico. *In vitro*, esto puede efectuarse por co-cultivo de estas células transformadas con las células. *In vivo*, se puede, por ejemplo, inyectar en la retina células transformadas para expresar o sobreexpresar, y segregar dicho polipéptido quimérico.

Se puede también, llegado el caso, asociar dicho polipéptido quimérico con uno o varios principios activos terapéuticos, en administración conjunta o separada.

25 Polipéptidos de direccionado celular conformes a la invención pueden también ser utilizados para inhibir la fijación de la Otx2 a sus células diana, y en particular a las neuronas parvalbúminas recubiertas de una red perineuronal de proteoglicanos de sulfato de condroitina, para permitir restaurar su plasticidad. Se pueden utilizar así para el tratamiento de enfermedades que resultan del desarrollo defectuoso durante el periodo crítico de plasticidad, de una región del cerebro que contiene las células diana en cuestión. A título de ejemplo, pueden ser utilizados en el ámbito del tratamiento de la ambliopía, o en el ámbito del tratamiento de enfermedades neurológicas y psiquiátricas, tales como los trastornos ansiosos, el síndrome de estrés post-traumático, así como la psicosis maniaco-depresiva o la esquizofrenia. Se pueden utilizar también en el ámbito de la restauración de la plasticidad fisiológica y morfológica en patologías o accidentes vasculares que llevan a la pérdida de neuronas.

35 Para inhibir la fijación de la Otx2 a sus células diana, el polipéptido de direccionado celular conforme a la invención se utilizará para obtener, al contacto con dichas células diana, una concentración de dicho polipéptido al menos 10 veces superior, preferentemente de 100 a 1000 veces superior a la concentración de la Otx2. Típicamente, dicho polipéptido podrá utilizarse a una concentración de 1 a 10 μM , ventajosamente de 10 a 100 μM , y de manera particularmente ventajosa, de 100 a 1000 μM .

40 Para la utilización *in vivo* con el fin de inhibir la fijación de la Otx2 a sus células diana, dicho polipéptido de direccionado se administrará preferentemente de forma local, por ejemplo mediante mini-bomba osmótica implantada en el cerebro.

45 Las dosis de polipéptidos quiméricos a administrar *in vivo* para obtener la concentración deseada en contacto con las células diana, pueden fácilmente ser determinadas y adaptadas por el experto en la técnica en función, particularmente, de las modalidades de administración consideradas.

50 Polipéptidos de direccionado celular conformes a la invención pueden también ser utilizados para cribar otras moléculas capaces de fijarse específicamente a las células diana de la Otx2.

En este ámbito, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de cribado de moléculas capaces de fijarse específicamente a células dianas de la Otx2, en los mismos sitios de fijación que la Otx2, caracterizado porque comprende:

55 - la puesta en presencia de un polipéptido de direccionado celular conforme a la invención, de células diana de la Otx2 y de células que no fijan la Otx2, y de cada molécula a ensayar;

60 - la selección de las moléculas capaces de inhibir la fijación de dicho polipéptido de direccionado celular a las células diana de la Otx2, y que no se fijan a las células que no fijan la Otx2.

De manera ventajosa, dicho procedimiento se realiza en presencia, al mismo tiempo, de células diana de la Otx2 y de células que no fijan la Otx2, por ejemplo sobre una sección de retina.

65 La presente invención se entenderá mejor con la ayuda del complemento de descripción siguiente, que se refiere a ejemplos no limitativos que ilustran la identificación de un polipéptido de direccionado conforme a la invención y la

puesta en evidencia de su especificidad de direccionado.

EJEMPLO 1. IDENTIFICACIÓN DE UNA SECUENCIA DE DIRECCIONADO DE LA OTX2 A LAS NEURONAS GANGLIONARES Y BIPOLARES RETINIANAS.

Durante experimentos anteriores (véase la solicitud PCT/FR 2009/000031, del 9 de enero de 2009) se ha observado que la Otx2 inyectada en el ojo se concentraba esencialmente en las neuronas ganglionares retinianas (RCG).

A fin de investigar si un dominio de direccionado celular estaba presente en la secuencia de la Otx2, se han construido proteínas quiméricas que comprenden un dominio fosfatasa alcalina acoplado a la proteína Otx2 entera o a diferentes fragmentos de esta proteína.

Se han construido las proteínas de fusión siguientes:

- Fosfatasa alcalina-Otx2 entera (AP-Otx2)
- Fosfatasa alcalina-región terminal C + homeodominio de Otx2 (AP-Ct-Otx2)
- Fosfatasa alcalina-región terminal N + homeodominio de Otx2 (AP-Nt-Otx2)
- Fosfatasa alcalina-homeodominio de Otx2 (AP-Hd-Otx2)

Las secuencias que codifican para la proteína Otx2 humana o los fragmentos ensayados se clonaron en el vector pAPtag 5 (GenHunter), en fase con la secuencia que codifica para la fosfatasa alcalina. Las diferentes construcciones realizadas están esquematizadas en la figura 1.

Leyendas de la figura 1: sec. señal: péptido señal de la fosfatasa alcalina; Fosfatasa alcalina: fosfatasa alcalina, Nt: región N-terminal de la Otx2 (aminoácidos 1-37); Hd: homeodominio de la Otx2 (aminoácidos 38-97); Ct: región C-terminal de la OTx2 (aminoácidos 98-289); 6xHis: etiqueta polihistidina.

Se transfectaron células HEK 293 cultivadas en cajas de cultivo de 10 cm de diámetro con 10 µg de cada uno de los vectores construidos, previamente purificado con la ayuda de Lipofectamine 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se incubaron durante 48 horas en DMEM/F12, completado con el 10% de suero de bovino fetal (SVF). Se recogió el sobrenadante, se centrifugó a 100 x g durante 5 minutos y se conservó a -80°C. Este sobrenadante se utiliza sin purificación para ensayar la fijación de las proteínas quiméricas sobre secciones de retina.

Para efectuar el ensayo de fijación, se fijan unas secciones en criostato (20 µm) de retinas frescas congeladas durante 8 minutos en 100% de metanol enfriado, y después se lavan 3 veces en un tampón fosfato (PBS) con 4 mM de MgCl₂.

Las secciones son incubadas en un tampón PBS, 4 mM MgCl₂, más el 10% de SVF durante 1 hora a temperatura ambiente (TA).

Para la fijación, los sobrenadantes que contienen las proteínas de fusión ensayadas son diluidos a un veinteavo en PBS, e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las secciones son entonces lavadas 5 veces en PBS, 4 mM de MgCl₂, y se fijan entonces los ligandos unidos durante 2 minutos (60% de acetona, 4% de PFA, 20 mM de Hepes pH7).

Después de 3 lavados en PBS, las secciones se calientan a 65°C durante 2 horas en PBS para inactivar las fosfatasas endógenas. Las secciones son entonces lavadas 2 veces en PBS antes de la revelación de la actividad fosfatasa alcalina (preincubación de 5 minutos de las secciones en 100 mM de Tris, pH 9,5, 100 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, seguida por la adición de NBT/BCIP (Promega)).

Los resultados obtenidos con las proteínas de fusión AP-Nt-Otx2 y AP-Hd-Otx2 se ilustran en la figura 2.

Leyenda de la figura 2:

A: Marcado obtenido con la proteína de fusión AP-Nt-Otx2.

B: Marcado obtenido con la proteína de fusión AP-Hd-Otx2.

CP: células del epitelio pigmentario retiniano; Cb: células bipolares; RCG: células ganglionares.

Estos resultados muestran que la proteína de fusión que comprende el dominio N-terminal de la Otx2 y su

homeodominio se fija específicamente sobre las RGCs y las células bipolares, mientras que la proteína de fusión que contiene sólo el homeodominio no se fija a ninguna de las células retinianas.

Se sintetizaron polipéptidos biotilados que corresponden a diferentes fragmentos de la porción de dominio N-terminal + homeodominio de Otx2 y se ensayó su fijación sobre unas secciones de retinas, preparadas como se ha descrito anteriormente. La incubación de los péptidos con las secciones de retina se efectuó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, después se incubaron las secciones que llevan los péptidos fijados con estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina, y se detectó la actividad fosfatasa alcalina, tal como se ha descrito anteriormente.

Uno de los péptidos ensayados (RK-Otx2), que corresponde a la secuencia RKQRRERTTFTRAQL (SEC ID nº 2) posee la misma especificidad de fijación que las proteínas de fusión AP-Otx2 y AP-Nt-Otx2.

Se efectuaron entonces mutaciones en este polipéptido. Uno de los mutantes (AA-Otx2), en el que dos aminoácidos básicos (RK) son cambiados por dos aminoácidos neutros (AA), y que responde por lo tanto a la secuencia AAQRRERTTFTRAQL (SEC ID nº 3), no presenta ninguna fijación a las células retinianas.

Estos resultados son ilustrados en la figura 3.

Leyenda de la figura 3:

A: marcado obtenido con el péptido RK-Otx2.

B: marcado obtenido con el péptido AA-Otx2.

CP: células del epitelio pigmentario retiniano; Cb: células bipolares; RCG: células ganglionares.

Estos resultados muestran que el péptido RK-Otx2 se fija, tal como AP-Nt-Otx2, sobre las células ganglionares y bipolares. Sin embargo, no se observa ninguna fijación con el péptido AA-Otx2. Otro péptido (RA-Otx2), en el que el dipéptido RK está sustituido por RA, se fija sólo muy débilmente sobre las células ganglionares y bipolares (resultados no mostrados).

A fin de verificar que el péptido RK-Otx2 poseía la misma especificidad de fijación que AP-Nt-Otx2, se ensayó la capacidad de los polipéptidos RK-Otx2 y AA-Otx2 para antagonizar la fijación de AP-Nt-Otx2. El ensayo de fijación de AP-Nt-Otx2 sobre secciones de retinas, se efectuó tal como se ha descrito anteriormente, excepto que la incubación del sobrenadante que contiene AP-Nt-Otx2 se efectuó en presencia de 2 µg/ml de péptido RK-Otx2 o del péptido AA-Otx2).

Los resultados se ilustran en la figura 4.

Leyenda de la figura 4:

A: fijación de AP-Nt-Otx2 en presencia del péptido RK-Otx2.

B: fijación de AP-Nt-Otx2 en presencia del péptido AA-Otx2.

CP: células del epitelio pigmentario retiniano; Cb: células bipolares; RCG: células ganglionares.

Estos resultados muestran que el péptido RK-Otx2 bloquea la fijación de AP-Nt-Otx2 a las células bipolares y a las células ganglionares, mientras que el péptido AA-Otx2 no tiene ningún efecto sobre esta fijación.

EJEMPLO 2: EFECTO DE UN POLIPÉPTIDO QUIMÉRICO QUE ASOCIA UN FRAGMENTO DE LA OTX2 QUE CONTIENE LA SECUENCIA DE DIRECCIONADO CELULAR CON UN DOMINIO HETERÓLOGO DE ACTIVACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN, SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LAS NEURONAS GANGLIONARES RETINIANAS.

Se ha demostrado anteriormente (véase la solicitud PCT/FR 2009/000031, de 9 de enero de 2009) que la Otx2 protegía las neuronas ganglionares retinianas contra los efectos tóxicos de N-metil-D-aspartato (NMDA).

Se ha construido genéticamente y producido por síntesis bacteriana un polipéptido quimérico, fusionando el dominio N-terminal de la Otx2 y su homeodominio (aminoácidos 1-97 de la Otx2), con el dominio trans-activador VP16 del virus del herpes (MLGDGDSPPGPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMFTDALGIDEYGG, SEC ID nº 4).

Unos ratones C57 B16 han recibido en el ojo derecho 1 µl de tampón de inyección (PBS o NaCl 9%) que contiene bien 1 mM de NMDA, o bien 1 mM de NMDA adicionado de 30 ng del polipéptido quimérico, y en el ojo izquierdo el mismo volumen de tampón de inyección, sin aditivo.

La supervivencia de las neuronas ganglionares se determinó midiendo el nivel de expresión de Brain 3A (Brn3A), un factor de transcripción que, en la retina, está específicamente expresado en las neuronas ganglionares (XIANG y otros, J. Neurosci., 15, 4762-4785, 1995).

Al final de 4 días, se sacrifican los animales, se extraen las retinas, y se extrae el ARNm.

El nivel de expresión del ARNm de Brn3A se determinó mediante RT-PCR cuantitativa, utilizando el gen de la hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT) como gen de referencia, y se calculó la relación entre la expresión del ARNm de Brn3A en el ojo derecho y en el ojo izquierdo.

Los resultados se ilustran en la figura 5. En la abscisa, se indican los aditivos utilizados; en la ordenada, se indica la relación entre las cantidades de ARNm Brn3A (normalizadas con respecto a ARNm HPRT) en el ojo derecho y en el ojo izquierdo.

Estos resultados muestran que NMDA, administrado solo, disminuye significativamente (en aproximadamente el 60%) la cantidad de neuronas ganglionares, y que la adición de 30 ng de polipéptido quimérico protege eficazmente las neuronas ganglionares contra los efectos tóxicos de NMDA.

EJEMPLO 3: UNIÓN DE OTX2 A CÉLULAS DIANA DE LA CORTEZA CEREBRAL

La interacción con las células de la corteza cerebral de las proteínas de fusión AP-Otx2, AP-Nt-Otx2, AP-Hd-Otx2, y AP-HdAA-Otx2 (variante de AP-Nt-Otx2, en el que el doblete de aminoácidos RK se sustituyó por el doblete AA), solas (sobrenadante de cultivo diluido a 1/20), o en presencia de la Otx2 entera (1 µg/ml), o de péptidos RK-Otx2 o AA-Otx2 (2 µg/ml), se ensayó sobre unas secciones en criostato de cerebros de ratones adultos, utilizando el protocolo descrito en el ejemplo 1 anterior.

Los resultados se ilustran en la figura 6.

Leyenda de la figura 6: A-D, barra de escala 500 µm; (A) AP-Nt-Otx2; (B) AP (fosfatasa alcalina sola); (C) AP-Nt-Otx2 en presencia de la Otx2 entera; (D) AP-Hd-Otx2; E-H, barra de escala 100 µm; (E) AP-Nt-Otx2; (F) AP-HdAA-Otx2; (G) AP-Nt-Otx2 en presencia de RK-Otx2 (H) AP-Nt-Otx2 en presencia de AA-Otx2.

Estos resultados muestran que AP-Nt-Otx2 se une a unas células corticales, que comprenden las de la corteza cerebral visual; sin embargo, no se observa ninguna unión con AP, AP-Hd-Otx2, o AP-HdAA-Otx2. Además, la Otx2 entera así como RK-Otx2, pero no AA-Otx2, bloquean la unión de AP-Nt-Otx2 a sus células diana.

Los glicosaminoglicanos (GAG) y, en particular, los proteoglicanos de sulfato de condroitina, son un constituyente esencial de la matriz extracelular (red perineuronal) que rodean las neuronas parvalbúminas de la corteza cerebral visual. La colocación de esta red perineuronal coincide con el final del periodo crítico de plasticidad; constituye un factor principal de la pérdida de plasticidad cortical que aparece al final de este periodo crítico, y se ha demostrado que la destrucción de esta red perineuronal por tratamiento con condroitinasa-ABC permitía restaurar esta plasticidad (PIZZORUSSO y otros, Science, 298, 1248-51, 2002).

Para determinar que la red perineuronal asociada a las neuronas parvalbúminas estaba implicada en la unión entre AP-Nt-Otx2 y sus células diana, se ensayó la fijación de AP-Otx2 sobre unas secciones en criostato de cerebros de ratones adultos fijados en metanol, y después incubados durante 24 horas en presencia de condroitinasa ABC (2 U/ml) en un tampón que contiene 50 mM de Tris [pH 8,0], 40 mM de acetato de sodio, 0,1% de BSA y unos inhibidores de proteasas. Paralelamente, las secciones, tratadas o no con condroitinasa ABC, se incubaron con 0,01 mg/ml de lectina *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA; Sigma-Aldrich) que se fija a los GAGs de la red perineuronal, marcada con FITC.

Los resultados se ilustran en la figura 7.

Leyenda de la figura 7: (A) y (B) marcado con WFA; (C) y (D) incubación en presencia de AP-Otx2; (A) y (C) secciones no tratadas; (B) y (D) secciones tratadas con condroitinasa ABC.

Estos resultados muestran que el tratamiento con condroitinasa ABC, que destruye los GAGs de la red perineuronal abole también la fijación de AP-Nt-Otx2.

Parece, por lo tanto, que son los GAGs de la red perineuronal asociada a las neuronas parvalbúminas los que llevan el sitio de fijación de AP-Nt-Otx2.

EJEMPLO 4: BLOQUEO *IN VIVO* DE LA TRANSFERENCIA ENDÓGENA DE OTX2 POR EL PÉPTIDO RK-OTX2

Como se mostró anteriormente, el péptido RK-Otx2 puede bloquear *in vitro* la unión de Otx2 a sus células diana. Se

ensayó si este efecto se producía también *in vivo*.

Con este objetivo, el péptido RK-Otx2 (0,25 mg/ml), el péptido AA-Otx2 (0,25 mg/ml), o un tampón PBS, asociados al ácido polisialílico (0,25 mg/ml, para permitir la difusión de los péptidos y evitar su fijación no específica sobre neuronas que expresan en su superficie el ácido polisialílico) se infundieron lentamente (1 μ l/h) durante 7 días en la corteza cerebral visual derecha de ratones adultos, con la ayuda de minibombas osmóticas (Alzet 1003D, Alza) conectadas a unas cánulas implantadas estereotáxicamente (HENSCH y otros, *Science*, 282, 1504-8, 1998; FAGIOLINI & HENSCH, *Nature*, 404, 183-6, 2000). Al final de la infusión, los ratones son perfundidos con el 4% de PFA, y se efectúan unos cortes de cerebro (25 μ m) para estudiar la localización de la Otx2 y la del péptido RK-Otx2. La Otx2 se visualiza con la ayuda de un anticuerpo monoclonal de rata anti-Otx2 diluido al 1/200 (SUGIYAMA y otros, *Cell*, 134, 508-20, 2008), seguido de un anticuerpo de asno anti-rata marcado con Alexa 488 (Molecular Probes) diluido al 1/2000. El péptido RK-Otx2 se visualiza con la ayuda de estreptavidina marcada con Cy5.

Las células que expresan la Otx2 se contaron sobre una superficie de 700x350 μ m, que engloba las capas II/III y IV de la zona binocular de la corteza cerebral visual.

Los resultados se ilustran en la figura 8.

Leyendas de la figura 8:

A-E: infusión de RK-Otx2 (barra de escala =100 μ m)

A, B: detección del péptido RK-Otx2; A: hemisferio control; B: hemisferio infundido.

C, D: Detección de Otx2; C: hemisferio control; D: hemisferio infundido.

E: Cuantificación de las células que expresan la Otx2; barras negras: hemisferio control; barras grises: hemisferio infundido.

F-J: infusión de AA-Otx2 (barra de escala = 100 μ m)

F, G: detección del péptido AA-Otx2; A: hemisferio control; B: hemisferio infundido.

H, I: Detección de la Otx2; H: hemisferio control; I: hemisferio infundido.

J: Cuantificación de las células que expresan la Otx2; barras negras: hemisferio control; barras grises: hemisferio infundido; * $p < 0,005$, Ensayo t de Student por series emparejadas; las barras de error representan el error tipo de la media.

Estos resultados muestran que la infusión del péptido RK-Otx2 en la corteza cerebral visual durante 7 días reduce significativamente el número de células que expresan la Otx2, sin embargo, en el caso del péptido AA-Otx2 se observa solamente una reducción débil, no significativa, del número de células que expresan la Otx2.

Se ha verificado, mediante marcado con Sytox green, que la infusión no tenía efecto en sí misma sobre el número de células. Para asegurar que la disminución del número de células que expresan la Otx2 no se debe a la muerte de las células, se efectuó una infusión de este péptido según el protocolo descrito anteriormente, y se midió el número de células que expresan la Otx2 8 días después del final de la infusión. En estas condiciones, se detecta sólo, 8 días después del final de la infusión, cantidades muy débiles de péptido RK-Otx2, y el número de células que expresan la Otx2 en el hemisferio tratado es restaurado a nivel del hemisferio de control.

EJEMPLO 5: RESTAURACIÓN DE LA PLASTICIDAD CORTICAL POR EL PÉPTIDO RK-OTX2

Los ejemplos del péptido RK-Otx2 sobre la plasticidad de la corteza ocular se compararon con los de la condroitinasa-ABC, conocida por permitir la restauración de esta plasticidad (PIZZORUSSO y otros, *Science*, 298, 1248-51, 2002).

El péptido RK-Otx2 o el péptido AA-Otx2 se infundieron en ratones adultos (por lo tanto después del cierre del periodo crítico de plasticidad), tal como se ha descrito en el ejemplo 4 anterior. Se inyectó la condroitinasa-ABC, o el tampón de inyección (agua desionizada + 0,1% de SAB) (0,4 μ l para cada inyección) en 3 sitios que rodean la corteza cerebral visual (AP lambda, LM 1,5 mm; AP lambda, 4,0 mm; AP + 1,5 mm; LM 2,5 mm) a dos profundidades diferentes (300 y 500 μ m).

Después de la infusión de péptidos o la inyección de condroitinasa-ABC, los ratones son sometidos a una privación monocular durante 4 días, y las respuestas a los estímulos visuales se miden después por electrofisiología unitaria extracelular. Los registros electrofisiológicos se efectúan bajo anestesia nembutal/anestesia clorprotixeno usando técnicas estándares (GORDON & STRYKER, *J Neurosci*, 16, 3274-86, 1996; MATAGA y otros, *Neuron*, 44, 1031-41, 2004). Se efectuaron de 5 a 7 registros unitarios por cada ratón, de los dos lados del eje mediolateral de la corteza cerebral visual primaria, para cubrir la zona monocular y la zona binocular, y evitar unos sesgos de muestreo. Se atribuyeron unos resultados de dominancia celular a las respuestas celulares, utilizando un sistema de clasificación en 7 puntos (WIESEL & HUBEL, *J Neurophysiol*, 26, 978-93, 1963) (GORDON & STRYKER, *J Neurosci*, 16, 3274-86, 1996). La dominancia ocular en la zona binocular se calculó para cada ratón según un índice de sesgo controlateral (CBI), determinado de la siguiente manera:

$$(CBI): [(n_1-n_7+2/3(n_2-n_6) + 1/3(n_3-n_5)+N]/2N,$$

en la que N = número total de células y nx = número de células que corresponden a un resultado de dominancia ocular de x.

5 Esta media ponderada del sesgo en favor de uno u otro ojo puede variar entre 0, para una dominancia ipsilateral completa, y 1 para una dominancia controlateral completa.

10 Además, se efectuaron unos cortes frontales de los cerebros de los ratones tratados, como se ha descrito en el ejemplo 4 anterior, a fin de determinar la influencia del péptido RK-Otx2 sobre las neuronas parvalbúminas. Los cortes se marcaron bien con WFA, como se ha descrito en el ejemplo 3, o bien con la ayuda de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-parvalbúmina (1/500, Sigma-Aldrich), que fue revelado con la ayuda de un anticuerpo de asno anti-ratón, marcado con Cy3. Las células marcadas se cuantificaron tal como se ha descrito en el ejemplo 4.

15 Los resultados se ilustran en la figura 9.

Leyendas de la figura 9:

20 A: índice de sesgo controlateral después de la infusión del péptido RK-Otx2 (RK) o del péptido AA-Otx2 (AA), o después de la inyección de condroitinasa-ABC (chABC) o de tampón de inyección solo (Veh).

B-E: marcado con WFA (B y C) y expresión de la parvalbúmina (D y E) en la región supragranular de la corteza cerebral visual del hemisferio infundado con el péptido RK (C y E), y del hemisferio no infundado (barra de escala = 100 μm).

25 F: cuantificación de las células marcadas con WFA y de las células que expresan la parvalbúmina después de la infusión del péptido RK-Otx2 (RK) o del péptido AA-Otx2 (AA); barras negras: hemisferio control; barras grises; hemisferio infundado; *p<0,05, Ensayo t de Student por series emparejadas; las barras de error representan el error tipo de la media.

30 Estos resultados muestran que la privación monocular induce una dominancia ocular (disminución del índice de sesgo contralateral de 0,7 a 0,57) en los ratones adultos tratados por el péptido RK-Otx2, como en los tratados por la condroitinasa-ABC (chABC), con la diferencia de los ratones tratados con el tampón de inyección o el péptido AA-Otx2.

35 Paralelamente, la infusión del péptido RK-Otx2 (pero no la del péptido AA-Otx2) disminuye la expresión de los sitios de unión de la WFA, así como de la parvalbúmina. El número de células positivas para la parvalbúmina disminuye un 56,2%, y el de las células rodeadas por unos sitios de unión del WFA disminuye un 51,3%.

40 Se resalta de estos resultados que el bloqueo de la transferencia de Otx2 por el péptido RK-otx provoca la inhibición de la expresión de la parvalbúmina, así como una destrucción de la red perineuronal similar a la provocada por la condroitinasa-ABC. Resulta de ello un retorno de las neuronas parvalbúminas a un estado inmaduro, similar al observado habitualmente durante el periodo crítico, y este estado inmaduro permite la reapertura del periodo crítico, y la restauración de la plasticidad que está asociada a ello.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 ECOLE NORMALE SUPERIEURE
 PROCHIANTZ, Alain
 DI NARDO, Ariel
 50 BEURDELEY, Marine

<120> POLIPÉPTIDOS DE DIRECCIONADO ESPECÍFICO A CÉLULAS DIANAS DE OTX2

<130> MJP/11-F644/235WO

<160> 4

55 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

60 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido de direccionado

<220>

<221> VARIANTE

65 <222> (1)..(1)

<223> Lys

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Arg
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> Asn
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> Lys
 <220>
 15 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Lys
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 20 <223> Asp
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> Lys
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> Ser
 <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> Ser
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 35 <223> Tyr
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 40 <223> Trp
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> Ser
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> Lys
 <220>
 50 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 <223> Gly
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 55 <223> Asn
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 60 <223> Ile
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> Val
 65 <400> 1

ES 2 471 458 T3

Arg Lys Gln Arg Arg Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala Gln Leu
 1 5 10 15

5 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido de direccionado
 <400> 2

Arg Lys Gln Arg Arg Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala Gln Leu
 1 5 10 15

10 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido de direccionado: mutante inactivo
 <400> 3

Ala Ala Gln Arg Arg Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala Gln Leu
 1 5 10 15

20 <210> 4
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Dominio transactivador VP16
 <400> 4

Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp
 1 5 10 15

Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln
 20 25 30

Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly
 35 40 45

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido de direccionado celular, **caracterizado porque** se define mediante la secuencia B₁B₂X₁B₃B₄X₂B₅X₃X₄X₅B₆X₇X₈X₉ (SEC ID nº 1), en la que:
- 10 B₁, B₂, B₃, B₄, B₅ y B₆ representan, independientemente, arginina o lisina;
X₁ y X₈ representan, independientemente, asparginina o glutamina;
X₂ representa ácido aspártico o ácido glutámico;
X₃, X₄ y X₆ representan, independientemente, treonina o serina;
15 X₅ representa fenilalanina, tirosina o triptófano;
X₇ representa alanina o glicina;
X₉ representa leucina, isoleucina o valina.
- 15 y **porque** cuando se pone en presencia de células retinianas, se une específicamente a las neuronas ganglionares y a las neuronas bipolares.
2. Polipéptido de direccionado celular, según la reivindicación 1, **caracterizado porque**:
- 20 - al menos uno de los aminoácidos B₁, B₃, B₄, B₅ y B₆ es una arginina; y/o
- B₂ es una lisina; y/o
- al menos uno de los aminoácidos X₁ y X₈ es una glutamina; y/o
- X₂ es un ácido glutámico; y/o
- al menos uno de los aminoácidos X₃ X₄ y X₆ es una treonina; y/o
25 - X₅ es una fenilalanina; y/o
- X₇ es una alanina; y/o
- X₉ es una leucina.
3. Polipéptido de direccionado celular, según la reivindicación 2, **caracterizado porque** está definido por la secuencia siguiente: RKQRRERTTFTRAQL (SEC ID nº 2).
- 30 4. Polipéptido que contiene un polipéptido de direccionado celular, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un polipéptido transductor.
- 35 5. Composición que comprende un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, unido a una carga de interés.
- 40 6. Composición, según la reivindicación 5, **caracterizada porque** está constituida por un polipéptido quimérico que contiene un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y uno o varios polipéptidos que constituyen la carga.
- 45 7. Composición, según la reivindicación 6, **caracterizada porque** dicho polipéptido quimérico contiene:
- un polipéptido según la reivindicación 4, y
- una carga que comprende una o varias secuencias de regulación de la transcripción y/o una o varias secuencias de regulación de la traducción.
- 50 8. Utilización de un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el direccionado específico *in vitro* de una carga de interés de unas células dianas de Otx2.
- 55 9. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización de diagnóstico o terapéutica que permite el direccionado específico de una carga de interés de unas células dianas de Otx2.
10. Utilización de un polipéptido, según la reivindicación 4, para el direccionado específico *in vitro* de una carga de interés de unas células diana de Otx2 y la internalización de dicha carga en dichas células.
- 60 11. Polipéptido, según la reivindicación 4, para una utilización de diagnóstico o terapéutica que permite el direccionado específico de una carga de interés de unas células dianas de Otx2, y la internacionalización de dicha carga en dichas células.
- 65 12. Utilización de una composición, según la reivindicación 7, para aumentar *in vitro* la supervivencia de las células diana de Otx2.
13. Composición, según la reivindicación 7, para la utilización como medicamento para prevenir o tratar la degeneración de células diana de Otx2.

14. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 8, 10 ó 12, **caracterizada porque** dichas células diana de Otx2 son neuronas ganglionares o neuronas bipolares retinianas.

5 15. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la utilización como medicamento que inhibe la fijación de Otx2 a las neuronas parvalbúminas, para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre la ambliopía, los trastornos ansiosos, el síndrome del estrés post-traumático, la psicosis maniaco-depresiva y la esquizofrenia.

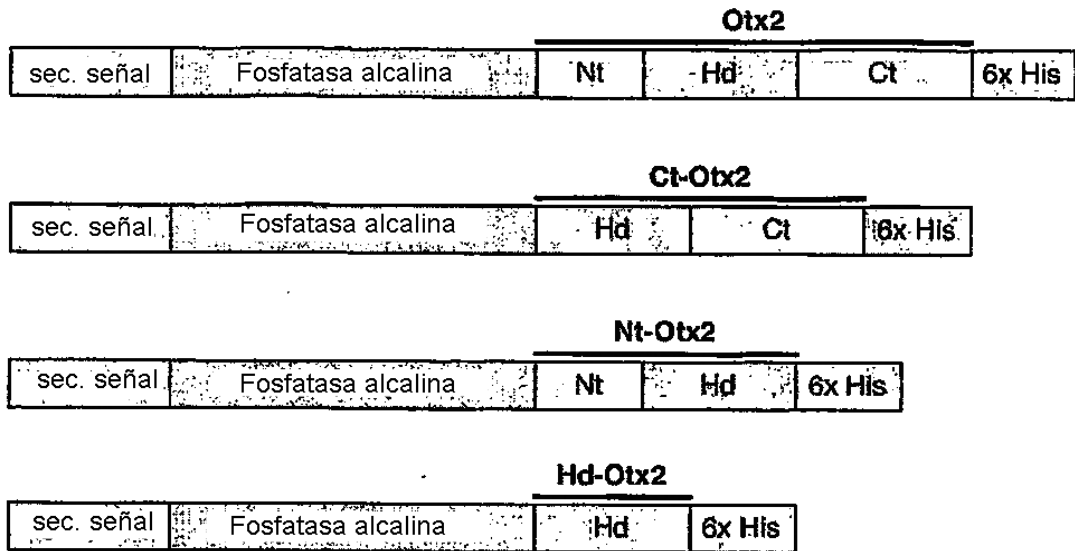


Figura 1

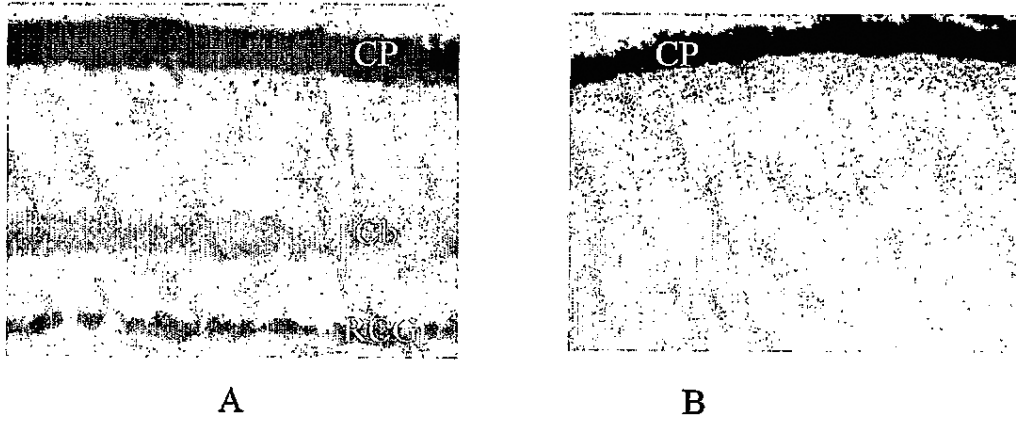


Figura 2

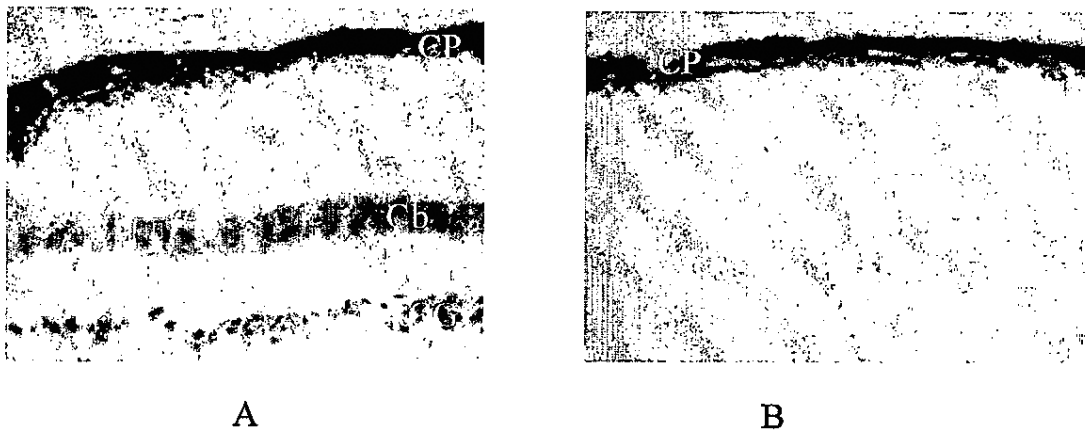
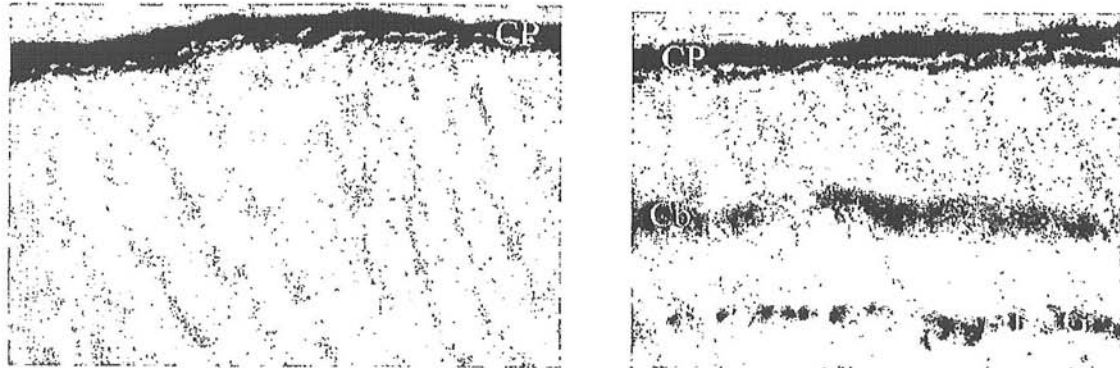


Figura 3



A

B

Figura 4

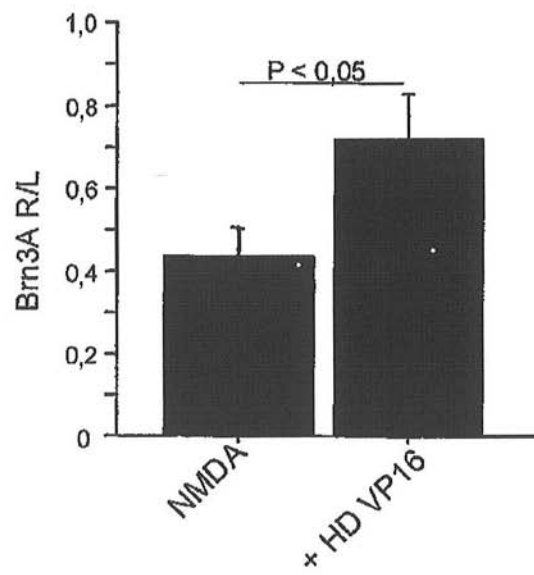


Figura 5

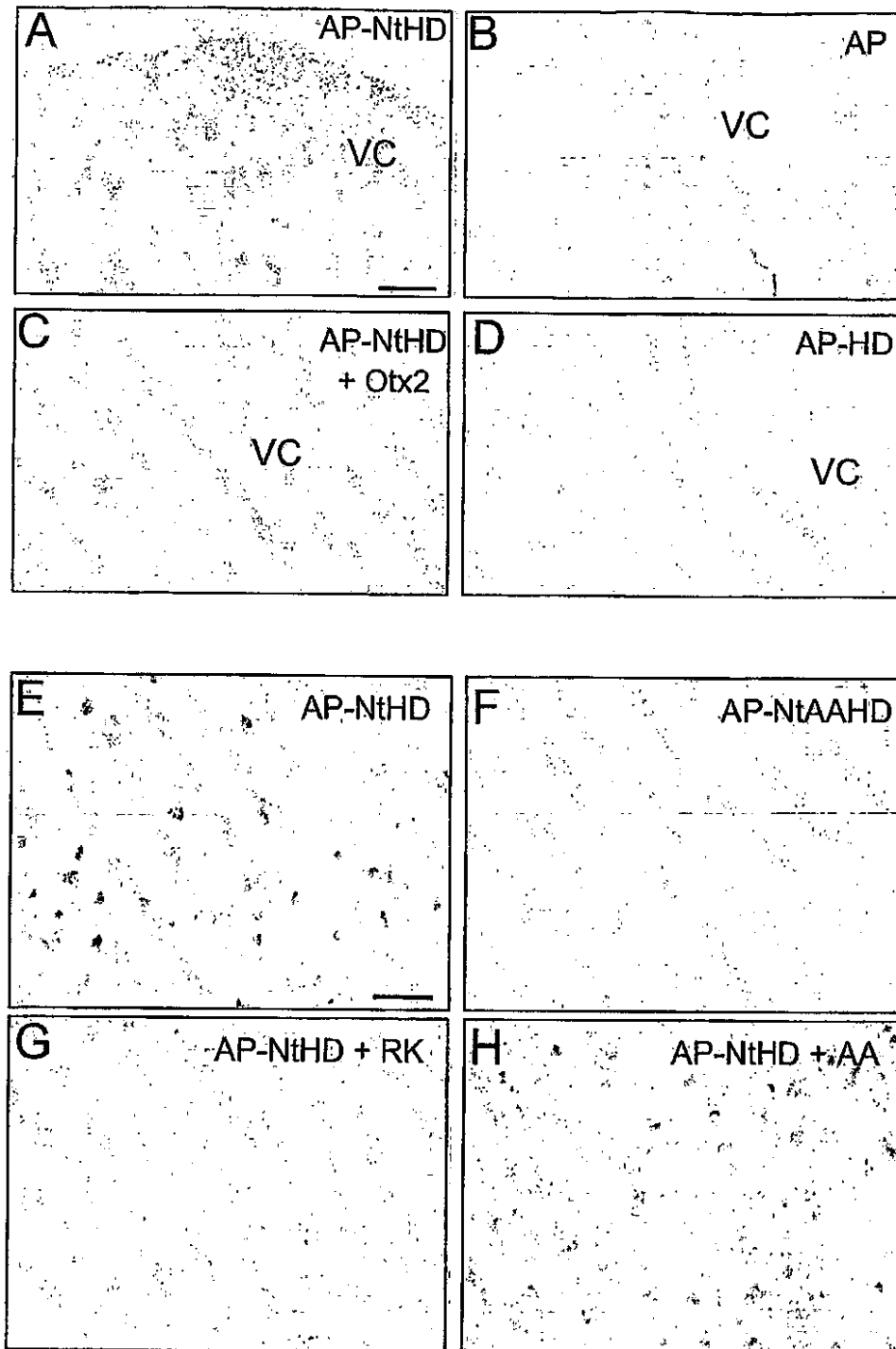


Figura 6

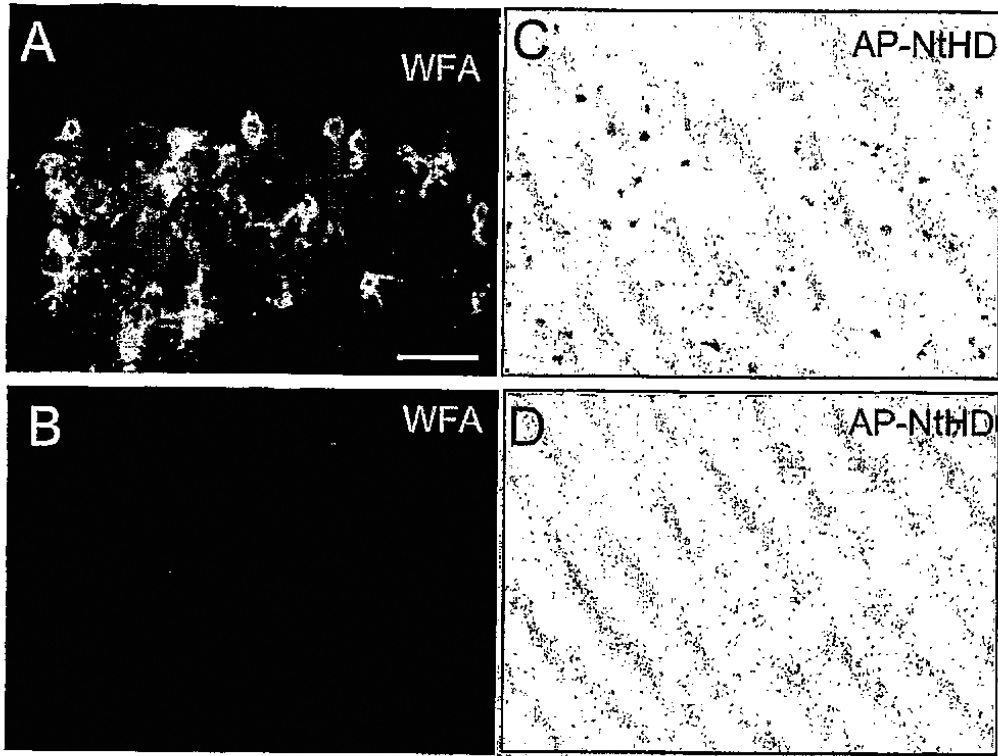


Figura 7

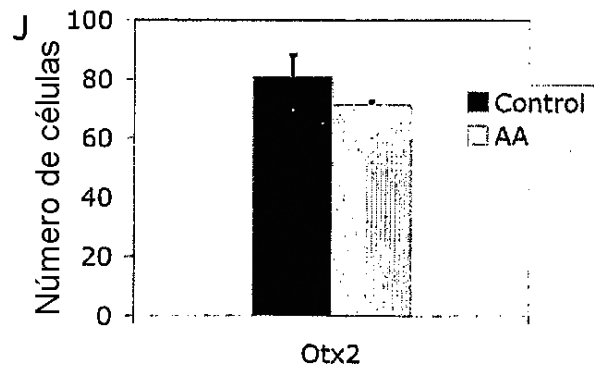
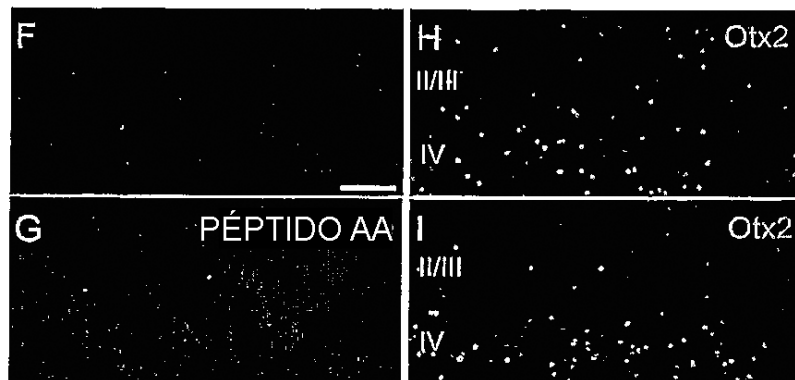
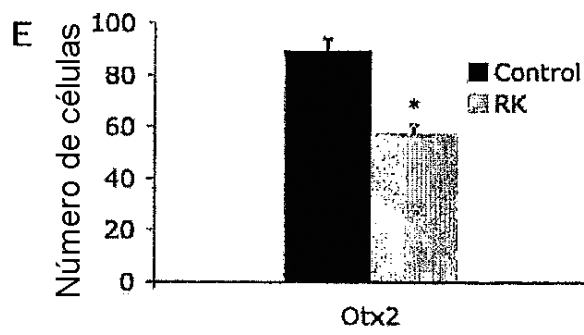
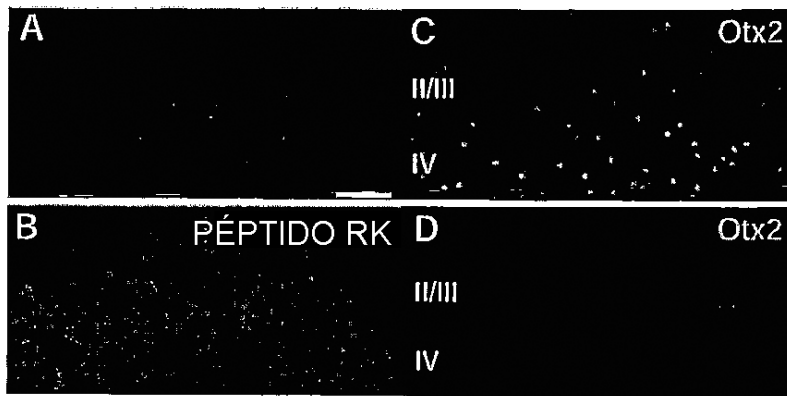


Figura 8

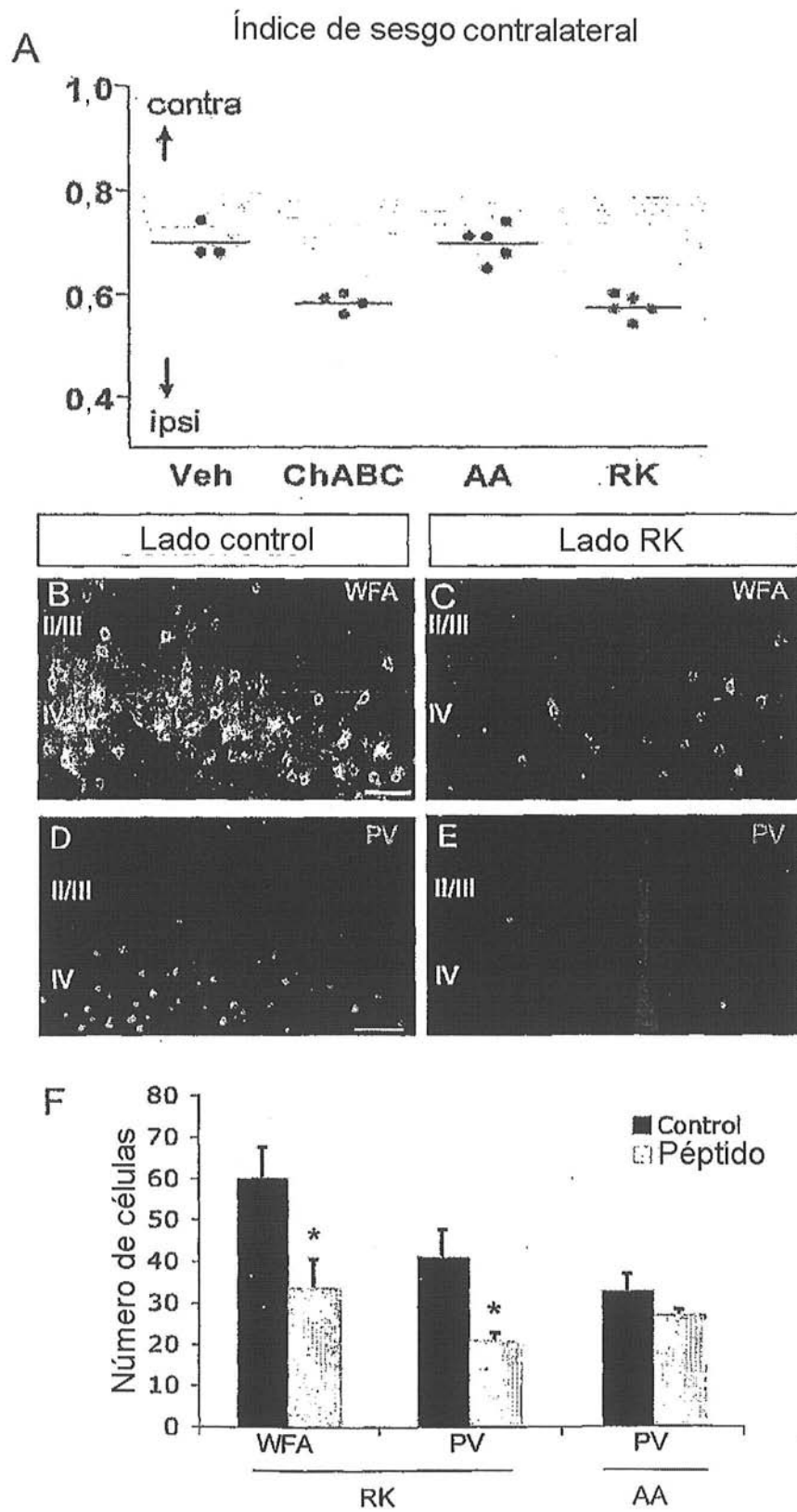


Figura 9