

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 518**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2009 E 09715010 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2240197**

54 Título: **Utilización de una homeoproteína, de la familia bicoide, para la prevención o tratamiento de la degeneración de las neuronas ganglionares de la retina**

30 Prioridad:

09.01.2008 FR 0800110

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

06.08.2015

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 y

MOYA, KENNETH, LEE

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 542 518 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

Utilización de una homeoproteína, de la familia bicoide, para la prevención o tratamiento de la degeneración de las neuronas ganglionares de la retina

5 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades que implican la degeneración de las neuronas ganglionares de la retina (RGC) y en especial para el tratamiento de glaucoma.

10 La retina es la lámina celular que recubre el fondo del ojo. Contiene diferentes tipos de neuronas cuya función consiste en captar la energía luminosa y transformarla en señales nerviosas, conteniendo también células gliales.

15 De manera esquemática, la retina comprende tres capas principales de neuronas: las neuronas fotorreceptoras (conos y bastoncillos), las neuronas bipolares y las neuronas ganglionares; otras neuronas, las neuronas amacrinas y las neuronas horizontales, desempeñan un papel regulador. Las neuronas fotorreceptoras reaccionan a la luz y la señal que generan es transmitida por intermedio de las 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 de la retina está implicada en diversas retinopatías. De este modo, la degeneración de las neuronas fotorreceptoras está implicada en ciertas patologías, tales como retinitis pigmentaria o degeneración macular. En otras patologías, son las neuronas ganglionares las atacadas. Se pueden observar ataques de las neuronas ganglionares de la retina en diversas neuropatías ópticas, genéticas o vasculares, y también de manera más amplia en el marco de enfermedades neurodegenerativas (tales como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis en placas o la enfermedad de Parkinson).

25 El glaucoma es una de las patologías en las que el papel preponderante del ataque de las neuronas ganglionares de la retina ha quedado demostrado. En esta patología, la degeneración de estas neuronas y de sus axones conduce al deterioro lento del nervio óptico, que puede conducir a la ceguera total. La causa más frecuente del glaucoma es una hiperpresión intraocular. Si bien los mecanismos que llevan a la destrucción de las neuronas ganglionares están todavía mal explicados, su implicación en la aparición de la patología ha sido demostrada (NICKELLS, 2007, *Can. J. Ophthalmol.*, 42, 278-87). Además, en los pacientes afectados de glaucoma, se han observado concentraciones excesivas de glutamato, un neurotransmisor normalmente presente en el humor vítreo (DREYER y otros, *Arch Ophthalmol*, 114, 299-305, 1996) (MORRISON y otros, *Prag Retin Eye Res*, 24, 217-240, 2005). A estas concentraciones, el glutamato tiene actividad neurotóxica sobre las neuronas ganglionares en cultivo o in vivo (HAHN y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6556-6560, 1988; LI y otros, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 1004-1008, 1999) (SHEN y SLAUGHTER, *J Neurophysiol*, 87, 1629-1634, 2002). El TNF-alfa está igualmente sobreexpresado en la retina y en el nervio óptico de los pacientes afectados por glaucoma (YUAN y NEUFELD, *Glia*, 32, 42-50, 2000; TEZEL y otros, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 1787-1794, 2001). La toxicidad de esta citoquina, asociada a la presencia de receptores sobre las neuronas ganglionares, ha sido demostrada in vitro (FUCHS y otros, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 2983-2991, 2005) e in vivo (FONTAINE y otros, *J Neurosci*, 22, RC216, 2002).

40 Los tratamiento actualmente disponibles para el glaucoma se basan en moléculas capaces de reducir la presión intraocular (WOODWARD y CHEN, *Expert Opin Emerg Drugs*, 12, 313-327, 2007).

45 Las homeoproteínas, o proteínas con homeodominio, son factores de transcripción que desempeñan un papel principal en los fenómenos de migración y de diferenciación celular implicados en la morfogénesis del organismo. Se caracterizan por la presencia de una secuencia de 60 aminoácidos, el homeodominio, que es un dominio de enlace con el ADN, que posee una estructura particular (hélice/bucle/hélice). Se ha demostrado que el homeodominio aislado de la proteína Antennapedia de *Drosophila* puede, por una parte, atravesar la membrana de neuronas en cultivo y, por otra, se puede acumular en el núcleo y generar el crecimiento de las neuritas (solicitud EP0485578 (JOLIOT y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 1864-1868, 1991). Las propiedades de penetración del homeodominio de Antennapedia son conferidas por su tercera hélice y aparecen muy conservadas entre las homeoproteínas; sus propiedades sobre el crecimiento de las neuritas aparecen co-relacionadas a sus propiedades de enlace al ADN, a nivel de lugares de enlace definidos por la secuencia consenso ANNNNCATTA (solicitud EP0485578 (JOLIOT y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 1864-1868, 1991).

55 La Otx2 (Orthodenticle homolog 2) es una homeoproteína que contiene un homeodominio del tipo bicoide (SIMEONE y otros, *Embo J*, 12, 2735-2747, 1993). Este pertenece a la familia de las homeoproteínas Otx, que desempeña un papel fundamental en el desarrollo del cerebro en el curso de la embriogénesis (ACAMPORA y otros, *Prog Neurobiol*, 64, 69-95, 2001; SIMEONE y otros, *Curr Opin Genet Dev*, 12, 409-415, 2002). Igualmente, se ha demostrado que la Otx2 interviene en la formación de la retina, favoreciendo la diferenciación de células cepa de la retina en neuronas fotorreceptoras. La solicitud de patente EP1591127 da a conocer que la transformación de células cepa de la retina con un vector recombinante que expresan Otx2, induce la diferenciación de estas células en neuronas fotorreceptoras, en detrimento de los otros tipos de neuronas de la retina y propone la utilización de la Otx2 para tratar diversas patologías de la retina que implican una degeneración de las neuronas fotorreceptoras.

65

Los inventores han comprobado ahora un nuevo efecto de la Otx2, que no se manifiesta a nivel de la diferenciación de las neuronas de la retina, sino de la supervivencia de las neuronas adultas ya diferenciadas, y que se refiere a las neuronas ganglionares. En efecto, han observado que la adición de la Otx2 a cultivos de neuronas ganglionares adultas axotomizadas (que habitualmente mueren muy rápidamente) permite su supervivencia.

5 Esta nueva propiedad de la Otx2 permite proponer su utilización para mejorar la supervivencia de las neuronas ganglionares adultas en cultivos in vitro, así como para prevenir o tratar in vivo la degeneración de las neuronas ganglionares.

10 Se define por "homeoproteína Otx2" cualquier homeoproteína cuyo homeodominio posea, como mínimo, 98% de identidad de secuencia con el de la proteína Otx2 humana (residuos 38-97 de la secuencia SEQ ID NO: 1), y que contiene un residuo de lisina en posición 50 de dicho homeodominio, y cuya secuencia polipeptídica global posee, como mínimo 90%, preferentemente un mínimo de 95% de identidad con la proteína SEQ ID NO: 1 (correspondiente a la isoforma 1 de la proteína Otx2 humana, referencia sobre SwissProt con el número P32243), o con la proteína
15 SEQ ID NO: 2 (correspondiente a la isoforma 2 de la proteína Otx2 humana, referencia SwissProt con el número P32243-2).

Dicha homeoproteína Otx2 puede ser obtenida fácilmente por los procedimientos bien conocidos en sí mismos. Puede ser producida, por ejemplo, en forma recombinante por los procedimientos clásicos de ingeniería genética.

20 De manera más específica, la presente invención tiene como objeto la utilización de una homeoproteína Otx2, o de una composición que comprende dicha homeoproteína Otx2 como medicamento para la prevención o tratamiento de la degeneración de las neuronas ganglionares, y más particularmente de una degeneración tal que interviene en el curso de glaucoma.

25 La presente invención puede ser puesta en práctica en particular en pacientes que no presentan degeneración de las neuronas fotorreceptoras.

30 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de un homeoproteína Otx2, o de una composición que comprende dicha homeoproteína para aumentar la supervivencia de neuronas ganglionares de la retina en cultivo.

35 Para la puesta en práctica de la presente invención es suficiente poner dicha homeoproteína en contacto con las neuronas ganglionares; la homeoproteína penetra efectivamente en aquellas gracias a la secuencia de internalización presente en su tercera hélice. De manera preferente, dicha puesta en contacto se efectúa en una concentración de dicha homeoproteína de 0,5 a 10 nM, ventajosamente de 1 a 5 nM, y de manera especialmente ventajosa de 1,5 a 3 nM.

40 In vitro es suficiente añadir dicha homeoproteína al medio de cultivo de las neuronas. In vivo puede ser administrada por diferentes vías, localmente, especialmente por inyección o infusión en el humor vítreo, o en el espacio suborbital, o en forma de colirio o de crema oftálmica. Igualmente puede ser administrada con ayuda de un dispositivo de liberación controlada, por ejemplo, en forma de un implante intraocular. En caso preciso, se puede administrar de manera sistémica, por ejemplo, por inyección intravenosa.

45 Las dosis de homeoproteína a administrar in vivo para obtener la concentración deseada en contacto de las neuronas ganglionares se puede determinar fácilmente y se puede adaptar por el técnico en la materia en función en especial de las modalidades de administración prevista.

50 Igualmente se puede efectuar esta puesta en contacto poniendo las neuronas ganglionares en presencia de células transformadas para expresar o sobreexpresar y secretar dicha homeoproteína. In vitro, ello se puede efectuar por co-cultivo de estas células transformadas con neuronas ganglionares. In vivo, se puede por ejemplo insertar en la retina de células transformadas para expresar o sobreexpresar y secretar dicha homeoproteína.

55 Igualmente, en caso deseado, se puede asociar dicha homeoproteína con uno o varios otros principios activos terapéuticos, en administración conjunta o separada. Por ejemplo, en el marco de tratamiento de glaucoma, se puede asociar a una molécula o una combinación de moléculas utilizadas en este tratamiento, tales como por ejemplo, las descritas por WOODWARD & CHEN (2007, antes citada), en especial una molécula o una combinación de moléculas capaces de disminuir la presión intraocular.

60 La presente invención se comprenderá mejor con ayuda del complemento de descripción siguiente que se refiere a ejemplos que demuestran la actividad de una homeoproteína Otx2 sobre la supervivencia de las neuronas ganglionares.

EJEMPLO 1: PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OTX2 RECOMBINANTE

La secuencia que codifica para la isoforma 1 (SwissProt P32243) de la homeoproteína Otx2 humana ha sido clonada bajo control del promotor trc inducible por isopropil β -D-tiogalactosido (IPTG), en el plásmido pTchTEV2 (derivado de un plásmido pTrcHis2 (Invitrogen), por sustitución del segmento NcoI-HindIII por un enlazador, permitiendo la inserción de un producto de PCR conteniendo la secuencia codificante de Otx2 más arriba y en fase con el lugar de cribado para la proteasa rTEV, seguido de la etiqueta myc-his6 en posición C terminal para producir el plásmido pTrOtx2hTev). La proteína recombinante expresada por pTrOtx2hTev contiene la secuencia de Otx2 fusionada en terminal C a una etiqueta Myc y una etiqueta 6xHis. Esta ha sido producida en la cepa de E. Coli BL21 Codon Plus-RP (Novagen) más RP transformada por choque térmico. Después de la selección por las bacterias transformadas en platillos Petri agar-LB-ampicilina a 37°C durante la noche, se ha inducido la expresión de la proteína recombinante por incubación durante una noche a 37°C en el medio de cultivo auto-inductor (IPTGlike) OverNight Express Instant TB Medium (Novagen). Después de centrifugación, las bacterias se han tomado sobre hielo en un tampón de lisis (Tp: NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,5 mM, con inhibidores de proteasa y sin EDTA), con una proporción de 3 ml de Tp por gramo de resto bacteriano) y se efectúa lisado por tres pasos por la French Press a 1000 psi. El lisado bacteriano es centrifugado y el sobrenadante es recuperado y filtrado a 0,45 μ m. Las proteínas son purificadas sobre columna Hitrap Chelating HP (Amersham) 1 ml es cargado con NiSO₄ 0,1 M, y el sobrenadante es pasado a 0,5 ml/min. Se efectúan dos lavados, conteniendo el Tp imidazol a 10 mM, y después a 50 mM. La elución se realiza por 10 fracciones de 1 ml de Tp con imidazol a 250 mM. Se hace una elución final con el Tp e imidazol a 1 M. La pureza de las fracciones de elución ha sido controlada por electroforesis SDS-Page, y posterior coloración con azul de Coomassie.

Su especificidad ha sido analizada por transferencia Western: dos mL de cada fracción de elución han sido mezclados con tampón de Laemmli y se han hervido durante 5 min. La separación proteica ha sido efectuada por electroforesis SDS-PAGE sobre geles de acrilamida 12%. Las proteínas son electrotransferidas sobre membrana de nitro-celulosa. Después de saturación en un tampón que contiene 5% de leche y 0,1% de Tween-20 en PBS 1X, la membrana es incubada con el anticuerpo primario (anti-Otx2 policlonal de rata a 1/200 o anti-Myc monoclonal de ratón a 1/1000) durante la noche a 4°C. Después de aclarado, el filtro es incubado con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa (HRP) durante 1h. La actividad enzimática en la peroxidasa se ha demostrado por quimioluminiscencia.

El análisis Western-Blot con el anticuerpo primario anti-HPX, o antiMyc permite revelar una única y fuerte banda de migración al peso molecular esperado (aproximadamente 40kDa) para la proteína HPX con las etiquetas Myc y 6XHis.

Las 3 fracciones más ricas en Otx2 han sido reunidas: su concentración en Otx2 es aproximadamente de 200 mg/ml. La preparación obtenida de este modo es realizada contra un tampón Tris 50 mM/EDTA 0,5 mM/NaCl 200 mM, y mantenidas a -20°C en este mismo tampón conteniendo 45% de glicerol. El glicerol se elimina con cada experiencia por diálisis contra el medio de cultivo.

EJEMPLO 2: EFECTO DE OTX2 SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LAS NEURONAS GANGLIONARES DE LA RETINA AXOTOMIZADAS.

Cultivos de células de la retina

El efecto de la proteína ha sido comprobado sobre neuronas de la retina después de disociación y puesta en cultivo. Se han utilizado dos protocolos: por una parte, cultivos mixtos que comprenden todos los tipos de células de la retina y, por otra, cultivos de neuronas ganglionares purificados.

Todas las experiencias de cultivos mixtos han sido realizadas sobre ratones C57B16 adultos (de 6 a 10 semanas), y todas las experiencias de cultivos purificados de células ganglionares de la retina sobre ratas adultas Long Evans de 8 semanas. Los ratones y las ratas han sido eutanasiados por dislocación cervical. Los ojos han sido extraídos con un retardo de menos de 15 minutos después de desinfección periorbital con Mucocit (Biobloc), por disección intraorbital del globo ocular. Los procedimientos utilizados están de acuerdo con las recomendaciones de la CEE (86/609/EEC) y el Comité Nacional Francés para la utilización de animales en laboratorio.

Cultivos mixtos de células de la retina adultas disociadas

El protocolo utilizado es el descrito por GAUDIN y otros (Invest Ophthalmol Vis Sci, 37, 2258-2268, 1996).

Láminas de vidrio estériles son pre-tratadas con Poli-D-Lisina (Sigma P-6407) a 2 mg/cm² durante una noche a 37°C después de la laminina (Sigma L-2020) a 1 mg/cm², 3 horas a 37°C. La disección de las retinas se realiza en medio independiente de CO₂ y sin L-Glutamina (Gibco 18045-054). Las retinas son troceadas con tijeras, lavadas con PBS sin Ca²⁺, Mg²⁺ (Invitrogen 14190-185) con glucosa 0,6%, y EDTA a 0,5 mM, e incubadas en presencia de 0,2% de papaína (Worthington Biochemicals, 1 unidad para un tubo que contiene 10 retinas), durante 15 minutos, a 37°C. La papaína ha sido activada (30 minutos a 37°C) añadiendo una unidad de papaína a 24 mL de solución activadora de

5 papáina que contiene 1,1 mM de EDTA, 0,067 mM de β -mercaptoetanol y 5,5 mM de L-Cisteína. La hidrólisis se ha interrumpido por adición de 1 ml de medio stop (medio Neurobasal A [Invitrogen 10888-022] y suero fetal de vaca (SVF) 10% [Invitrogen 10270-098]), después de adición de Dnasa I (Sigma, 5 mg/ml). Las células son disociadas con pipeta "pasteur" esmerilada en el medio stop contadas con el azul de Trypan para excluir las células muertas, sembradas con diferentes densidades celulares (de 75,000 a 400,000 células por pocillo) y mantenidas en cultivo durante 6 días. La proteína Otx2 es dializada, pre-diluida en el medio de cultivo y repartida en los pocillos con diferentes concentraciones justamente antes de la siembra celular. El medio de cultivo, sin suero, está compuesto por medio Neurobasal A (NBA) (Gibco 10888) suplementado con: L-glutamina 5 mM (Sigma G-6392), complemento B27 2,5 mM (Gibco 17504-044), Glutamato-Aspartato 2,5 mM (Gibco), AntibioticAntimycotic (Gibco 15240-096). Los cultivos son efectuados a 37°C en estufas a 95% de aire y 5% de CO₂. Al sexto día de cultivo, las células son formadas en paraformaldehído (PAF) 4% durante 15 minutos y después son lavadas 3 veces con PBS conservadas a 4°C hasta la realización de la inmunocitoquímica.

15 Las RGC supervivientes después de 6 días de cultivo mixto son identificadas para su inmunoreactividad para los marcadores complementarios: los anticuerpos anti-filamento 200 (NF-200; Sigma N-0142) y el anti-neurofilamento 68 (NF- 68; Sigma N-5 139). Tienen una especificidad respectiva de 91 y 88% (KONG y CHO, Life Sci, 64, 1773-1778, 1999). Su sensibilidad respectiva sobre grandes RGC (talla >21 μ m) es de 94 y 100%. Tienen una sensibilidad de 64 y 84% sobre las pequeñas RGC (talla <14 μ m) (RUIZ-EDERRA y otros, Mal Vis, 10, 83-92, 2004). Se han utilizado también criterios morfológicos: las RGC tienen una talla variable y una forma redonda con núcleo descentrado.

25 Los procesos son realizados a temperatura ambiente. Las células (fijadas con J6) son permeabilizadas 5 minutos en PBS con Triton X-100 0,2%, enjuagadas con PBS 3 veces, saturadas 30 minutos en PBS con SVF al 10% (tampón PBS-SVF), incubadas después con el (o los) anticuerpo(s) primario(s) diluidos en el mismo tampón durante 2 horas. Las células son lavadas a continuación 3 veces en PBS e incubadas 1 hora con el (o los) anticuerpo(s) secundario(s).

30 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1. Se observa una supervivencia máxima (x3) a 50 ng/ml, es decir 1,65 nM. Es visible el efecto desde 0,7 nM.

Cultivos de células ganglionares de la retina adultas purificadas por "inmunopanning" sobre el anticuerpo Thy-1

El protocolo utilizado es el descrito por BARRES y otros (Neuron, 1, 791-803, 1988).

35 El pre-tratamiento de las láminas y el medio de cultivo sin suero son iguales que para los cultivos mixtos. Si no se indica de otro modo, las diferentes incubaciones son realizadas a temperatura ambiente.

Preparación de la suspensión celular

40 La disección de las retinas se hace en D-PBS (Invitrogen 14287-080). Las retinas son lavadas con D-PBS, después son incubadas en presencia de papaína (Worthington Biochemicals, 165 unidades para un tubo conteniendo 12 retinas), durante 30 minutos a 37°C. La papaína es activada 5 minutos a 37°C añadiendo 165 unidades de papaína a 5 ml de D-PBS y 1000 unidades de DNasa (Sigma D4527). La hidrólisis se detiene por adición de 4 ml de ovomucoide a 0,15%. Las células son disociadas en pipeta pasteur, esmerilada en una solución de ovomucoide a 0,15%, en presencia de DNasa y anticuerpo primario de conejo anti-macrófago de rata (France Biochem AIA5 1240). La suspensión celular disociada de esta manera es pre-incubada y centrifugada, tomada en 15 ml de D-PBS con 0,02% BSA (Sigma A8806), filtrada a continuación sobre filtro Nitex 48tm (Dutscher 074011).

50 Preparación de las cajas de "panning" y anticuerpos utilizados

Durante la noche precedente a la disección de las retinas se incuban dos cajas Petri designadas "A" (150 mm, Dutscher 35-1058) con 20 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 9,5 y 60 mL del anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (Interchim 111-005-003), y una caja Petri designada "B" (100 mm, Dutscher 35-1029) con 10 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 9,5 y 30 mL del anticuerpo secundario de cabra anti-IgM de ratón (Interchim 1 15-005-020). Cada caja de panning es lavada a continuación 3 veces con PBS. A continuación las cajas son saturadas con D-PBS a 0,2% BSA. La caja "B" es incubada 3 horas con IgM de ratón anti-Thy1 (T1 107, hibridoma ECACC), y después es lavada 4 veces con D-PBS.

60 1ª etapa de panning: sustracción de los macrófagos

La suspensión celular pre-incubada con el anticuerpo primario IgG de conejo antimacrófago de rata es incubada con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo en la primera caja A durante 36 minutos. Las células no adheridas son transferidas a la segunda caja A para una segunda incubación de 33 minutos.

2ª etapa de panning: selección de las CGR

5 Las células no adheridas son filtradas sobre filtros Nitex 48 μm e incubadas durante 45 minutos en la caja B que contiene el anticuerpo primario IgM de ratón anti-Thy1. La caja B es lavada a continuación varias veces (10 veces como mínimo) con D-PBS para desalojar progresivamente las células no adheridas. Esta progresión es controlada bajo microscopía.

Etapa de desacoplamiento con tripsina de las células adheridas purificadas

10 La caja B es enjuagada 2 veces con solución salina equilibrada de Earle ("Earle's Balanced Salt Solution") (EBSS) (Sigma E6267) precalentada a 37°C. Las células adheridas en la caja B son incubadas con una solución de tripsina que contiene 4 ml de EBSS y 200 μL de tripsina 2,5% (Sigma T9201), 10 minutos a 37°C. La tripsina es inactivada por una solución de 4 ml de D-PBS-Suero fetal bovino ("Fetal Bovine Serum") (FBS) a 30%. Las células son despegadas pipeteando suavemente con la solución de bloqueo de la tripsina, centrifugadas a continuación y contadas (exclusión de las células muertas con azul de Trypan).

20 Se dializa Otx2 pre-diluida en el medio de cultivo y se deposita después en los pocillos antes de sembradura de las células con una densidad de 20,000 células por pocillo. En algunas experiencias, se ha pre-incubado Otx2 con un anticuerpo policlonal anti-OTx2 (Neuromics) a 1/1000, 30 minutos a 37°C.

25 Se ha realizado una prueba de supervivencia de células en J1 para evaluar el número medio de las RGC vivas sembradas inicialmente por pocillo (en 4 laminillas) y después en J6 para evaluar la proporción de las que habían sobrevivido en cultivo en las diferentes condiciones (3 a 6 laminillas por condición). Las RGC purificadas son incubadas durante 2 horas a 37°C con una mezcla de los dos reactivos: AM calceína y etidio (Live Dead Viability Cytotoxicity Kit, Invitrogen, L3224). El AM calceína no tiene efecto fluorescente (de color verde) más que si penetra en una célula viva, donde es hidrolizada en calceína fluorescente. El etidio no penetra más que en las células muertas con membranas dañadas y no tiene efecto fluorescente en rojo más que interactuando con su ADN. Los dos marcadores no tienen efecto fluorescente excepto que penetren en las células, no existe, por lo tanto, ruido de fondo. El análisis se hace directamente a microscopio transponiendo las laminillas (8 mm) sobre los porta-láminas especiales a estos efectos en 75 μL del medio de cultivo incubado a 37°C con los reactivos de la prueba Live-Dead (vivo-muerto).

35 La figura 2 muestra los resultados obtenidos. Estos resultados muestran que la misma concentración de 1,65 nM es óptima para la supervivencia (x3) y que el efecto de Otx2 es anulado después de la pre-incubación de la proteína con el anticuerpo neutralizante anti-Otx2, que no tiene efecto por sí mismo. El efecto de supervivencia es debido, por lo tanto, a Otx2 y no a un posible contaminante.

40 EJEMPLO 3: COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA OTX2, DEL MEDIO CONDICIONADO DE CULTIVOS MIXTOS DE RETINAS, Y DE BDNF SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LAS NEURONAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

45 Los efectos de la Otx2 sobre la supervivencia de las neuronas ganglionares se han comparado con los de factores de supervivencia de las neuronas ganglionares adultas anteriormente descritos en la literatura: el medio condicionado de cultivos mixtos de retinas (FUCHS y otros, Invest Ophthalmol Vis Sci, 46, 2983-2991, 2005) y el BDNF ("Brain Derived Neurotrophic Factor") (JOHNSON y otros, J Neurosci, 6, 3031-3038, 1986).

Los experimentos han sido efectuados sobre cultivos de células ganglionares adultas purificadas por inmunopanning, tal como se ha descrito en el anterior ejemplo 2.

50 Se han utilizado Otx2 y el BDNF con una concentración de 50 ng/ml en el medio de cultivo.

55 El medio acondicionado de cultivos mixtos de retinas es preparado a partir de cultivos mixtos realizados según el protocolo descrito en el anterior ejemplo 2. El medio de cultivo inicial contiene 10% de SVF para permitir la proliferación de células gliales de Müller. Las células son cultivadas en estas condiciones hasta confluencia (aproximadamente 10 días) después de 4 lavados con NBA, el medio de cultivo es cambiado por un medio de cultivo químicamente definido sin suero (NBA+ B27 2%) para dos días suplementarios. Este medio acondicionado (MC) es recuperado, centrifugado, dividido en partes alícuotas y congelado en nitrógeno líquido.

60 Los resultados se muestran en la figura 3. Estos resultados muestran que Otx2 a 50 ng/ml (1,65 nM) es tan eficaz o incluso más que el medio acondicionado. La pre-incubación del medio acondicionado con el anticuerpo anti-Otx2 no modifica su efecto, lo que muestra que este efecto no es debido a su contenido en Otx2. El BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) a 50 ng/ml facilita una actividad similar a la del medio acondicionado (no se han mostrado los resultados).

65 Resulta de las experiencias descritas anteriormente que Otx2 es un nuevo factor de supervivencia para las neuronas ganglionares adultas y que su actividad es igual o superior a la del BDNF o del medio acondicionado.

EJEMPLO 4: EFECTOS DE OTX2 SOBRE LA SUPERVIVENCIA IN VIVO DE LAS NEURONAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

5 El efecto de Otx2 sobre la supervivencia de las neuronas ganglionares de la retina ha sido confirmado in vivo en un modelo de ratón.

10 El modelo escogido es la intoxicación con N-metil-D-aspartato (NMDA). La supervivencia de las neuronas ganglionares ha sido determinada midiendo el nivel de expresión de Brain 3A (Brn3A), un factor de transcripción que en la retina está expresado específicamente en las neuronas ganglionares RGC (XIANG y otros, J. Neurosci., 15, 4762-4785, 1995).

15 Ratones C57 B16 han recibido en la oreja derecha 1 ml de tampón de inyección (PBS o NaCl 9%) conteniendo o bien 30 ng de Otx2, o bien 1 mM de NMDA, o bien 1 mM de NMDA con la adición de 3 ng o de 30 ng de Otx2, en el ojo derecho, el mismo volumen de tampón de inyección sin aditivo.

Al cabo de 4 días, los animales son sacrificados, se extraen las retinas y se extrae de ellas el ADNm.

20 El nivel de expresión del ADNm de Brn3A ha sido determinado por RT-PCR cuantitativa, utilizando el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT) como gen de referencia y se ha calculado la relación entre la expresión del ARNm de Brn3A en el ojo derecho y el ojo izquierdo.

25 Los resultados se han mostrado en la figura 4. En abscisas, se ha indicado los aditivos utilizados, en ordenadas, se ha indicado la relación entre las cantidades de ARNm Brn3A (normalizadas con relación al ARNm HPRT) en el ojo derecho y en el ojo izquierdo.

30 Estos resultados muestran que Otx2 sola no tiene efectos significativos sobre el nivel de expresión de Brn3A (y, por lo tanto, sobre la cantidad de neuronas ganglionares) en la retina. El NMDA, administrado solo, disminuye significativamente (aproximadamente 60%) la cantidad de neuronas ganglionares y la adición de 3 ng de Otx2 no disminuye significativamente los efectos tóxicos debidos al NMDA. Por el contrario, la adición de 30 ng de Otx2 protege totalmente las neuronas ganglionares contra los efectos tóxicos del NMDA.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> - CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- ECOLE NORMALE SUPERIEURE
- PROCH JANTZ, Alain
- MOYA, Kenneth Lee

40 <120> UTILIZACIÓN DE UNA HOMEOPROTEÍNA, DE LA FAMILIA BICOIDE, PARA LA PREVENCIÓN O TRATAMIENTO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS NEURONAS GANGLIONARES DE LA RETINA

<130> MJP/mad-F644-174/PCT

45 <150> FR08/00110
<151 > 2008-01-09

<160> 2

50 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 289

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

<220>

<221 > DOMAIN

<222> (38) .. (97)

60 <223> Homeodominio

<400> 1

ES 2 542 518 T3

Met Met Ser Tyr Leu Lys Gln Pro Pro Tyr Ala Val Asn Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Thr Thr Ser Gly Met Asp Leu Leu His Pro Ser Val Gly Tyr Pro
 20 25 30

Ala Thr Pro Arg Lys Gln Arg Arg Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala
 35 40 45

Gln Leu Asp Val Leu Glu Ala Leu Phe Ala Lys Thr Arg Tyr Pro Asp
 50 55 60

Ile Phe Met Arg Glu Glu Val Ala Leu Lys Ile Asn Leu Pro Glu Ser
 65 70 75 80

Arg Val Gln Val Trp Phe Lys Asn Arg Arg Ala Lys Cys Arg Gln Gln
 85 90 95

Gln Gln Gln Gln Gln Asn Gly Gly Gln Asn Lys Val Arg Pro Ala Lys
 100 105 110

Lys Lys Thr Ser Pro Ala Arg Glu Val Ser Ser Glu Ser Gly Thr Ser
 115 120 125

Gly Gln Phe Thr Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Pro Thr Ile Ala Ser
 130 135 140

Ser Ser Ala Pro Val Ser Ile Trp Ser Pro Ala Ser Ile Ser Pro Leu
 145 150 155 160

Ser Asp Pro Leu Ser Thr Ser Ser Ser Cys Met Gln Arg Ser Tyr Pro
 165 170 175

Met Thr Tyr Thr Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Tyr Ala Gly Ser
 180 185 190

ES 2 542 518 T3

Thr Ser Tyr Phe Gly Gly Met Asp Cys Gly Ser Tyr Leu Thr Pro Met
 195 200 205

His His Gln Leu Pro Gly Pro Gly Ala Thr Leu Ser Pro Met Gly Thr
 210 215 220

Asn Ala Val Thr Ser His Leu Asn Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr
 225 230 235 240

Gln Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gly Phe Asn Ser Thr Thr Asp Cys
 245 250 255

Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ala Ser Trp Lys Leu Asn Phe Asn Ala
 260 265 270

Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ser Ser Trp Lys Phe Gln Val
 275 280 285

Leu

<210> 2
 <211>297
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221 > DOMAIN
 10 <222> (32) .. (97)
 <223> Homeodominio

<220>
 <221 > DOMAIN
 15 <222> (46) .. (105)
 <223> Homeodominio

<400> 2

ES 2 542 518 T3

Met Met Ser Tyr Leu Lys Gln Pro Pro Tyr Ala Val Asn Gly Leu Ser
1 5 10 15

Leu Thr Thr Ser Gly Met Asp Leu Leu His Pro Ser Val Gly Tyr Pro
20 25 30

Gly Pro Trp Ala Ser Cys Pro Ala Ala Thr Pro Arg Lys Gln Arg Arg
35 40 45

Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala Gln Leu Asp Val Leu Glu Ala Leu
50 55 60

Phe Ala Lys Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Phe Met Arg Glu Glu Val Ala
65 70 75 80

Leu Lys Ile Asn Leu Pro Glu Ser Arg Val Gln Val Trp Phe Lys Asn
85 90 95

Arg Arg Ala Lys Cys Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Asn Gly Gly
100 105 110

Gln Asn Lys Val Arg Pro Ala Lys Lys Lys Thr Ser Pro Ala Arg Glu
115 120 125

Val Ser Ser Glu Ser Gly Thr Ser Gly Gln Phe Thr Pro Pro Ser Ser
130 135 140

Thr Ser Val Pro Thr Ile Ala Ser Ser Ser Ala Pro Val Ser Ile Trp
145 150 155 160

Ser Pro Ala Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Pro Leu Ser Thr Ser Ser
165 170 175

Ser Cys Met Gln Arg Ser Tyr Pro Met Thr Tyr Thr Gln Ala Ser Gly
180 185 190

Tyr Ser Gln Gly Tyr Ala Gly Ser Thr Ser Tyr Phe Gly Gly Met Asp
195 200 205

Cys Gly Ser Tyr Leu Thr Pro Met His His Gln Leu Pro Gly Pro Gly
210 215 220

ES 2 542 518 T3

Ala Thr Leu Ser Pro Met Gly Thr Asn Ala Val Thr Ser His Leu Asn
225 230 235 240

Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr Gln Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Leu
245 250 255

Gly Phe Asn Ser Thr Thr Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ala
260 265 270

Ser Trp Lys Leu Asn Phe Asn Ala Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln
275 280 285

Thr Ser Ser Trp Lys Phe Gln Val Leu
290 295

REIVINDICACIONES

- 5 1. Homeoproteína, cuyo homeodominio posee, como mínimo, 98% de identidad de secuencia con los residuos 38-97 de la secuencia SEQ ID NO: 1 y contiene un residuo de lisina en posición 50, y cuya secuencia polipeptídica global posee, como mínimo, 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 o con la secuencia SEQ ID NO: 2, para la utilización como medicamento para la prevención o tratamiento de la degeneración de las neuronas ganglionares de la retina.
- 10 2. Homeoproteína para la utilización, según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha degeneración de las neuronas ganglionares de la retina tiene lugar en el curso del glaucoma.
- 15 3. Utilización de una homeoproteína cuyo homeodominio posee, como mínimo, 98% de identidad de secuencia con los residuos 38-97 de la secuencia SEQ ID NO: 1 y contiene un residuo de lisina en posición 50, y cuya secuencia polipeptídica global posee, como mínimo, 90% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 1 o con la secuencia SEQ ID NO: 2, o de una composición que comprende dicha homeoproteína para aumentar la supervivencia de neuronas ganglionares de la retina en cultivo.

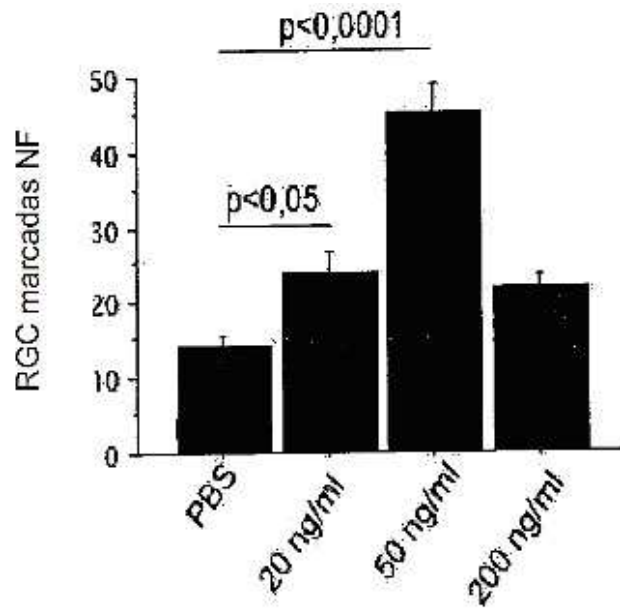


FIGURA 1

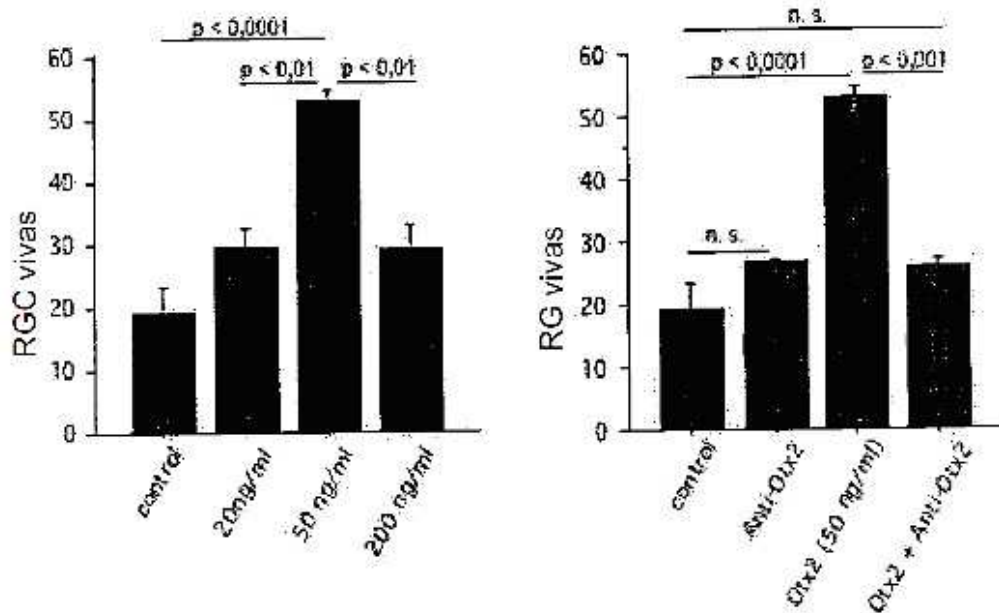


FIGURA 2

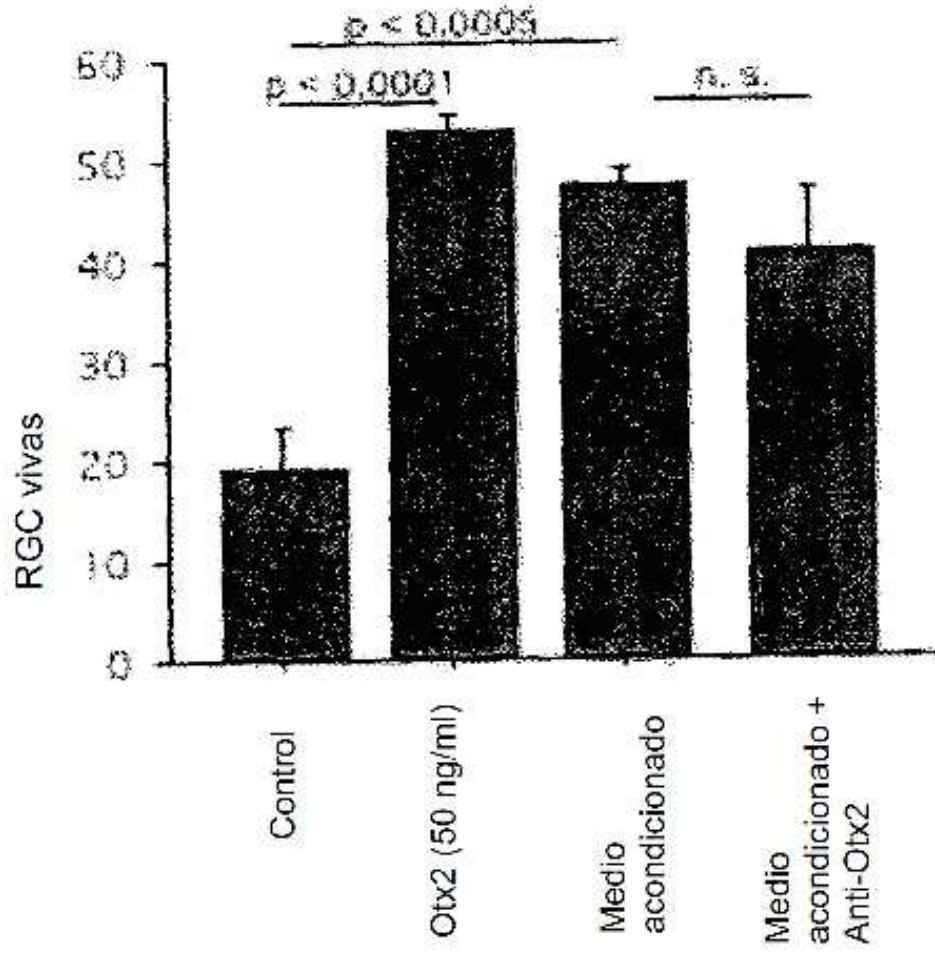


FIGURA 3

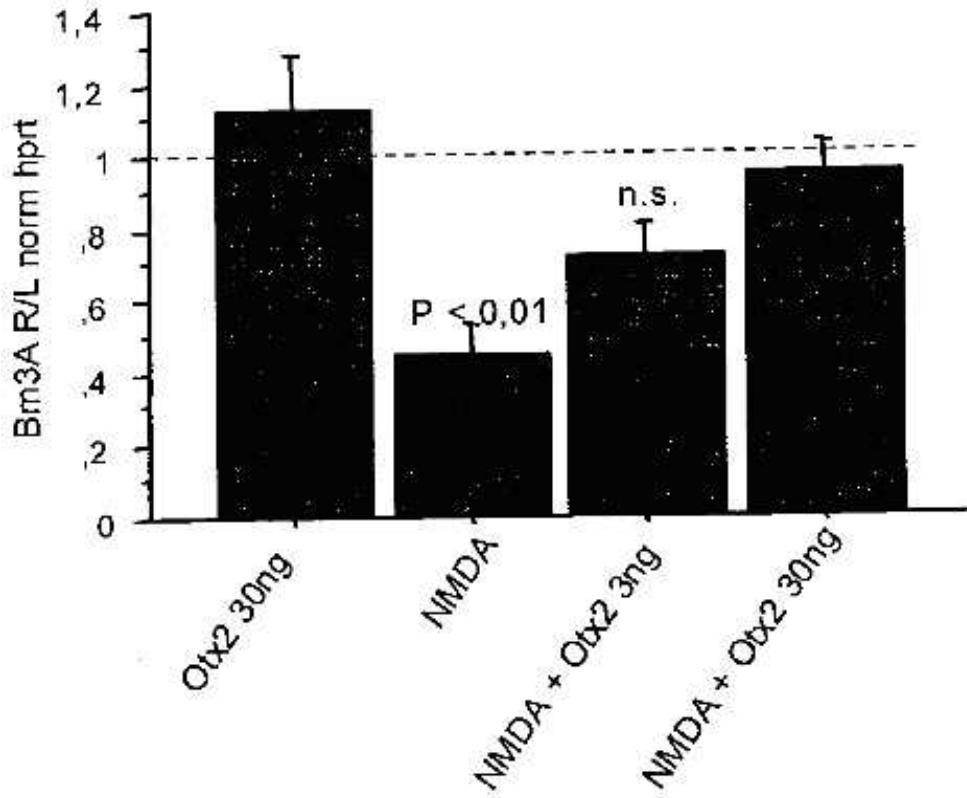


FIGURA 4