

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 643**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2012 PCT/FR2012/050809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12140376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2012 E 12722415 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2697253**

54 Título: **Péptidos terapéuticos y su uso contra la corea de Huntington**

30 Prioridad:

12.04.2011 FR 1153193

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

**3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;**

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MASCHAT, FLORENCE;
PARMENTIER, MARIE-LAURE;
BONNEAUD, NATHALIE y
ARRIBAT, YOAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 652 643 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

Péptidos terapéuticos y su uso contra la corea de Huntington

La presente invención se refiere a compuestos terapéuticos novedosos contra la corea de Huntington. Estos compuestos terapéuticos comprenden, o codifican para, una secuencia peptídica particular.

5 La corea de Huntington (HD) es una enfermedad rara neurodegenerativa genética, que afecta a las funciones tanto motrices como cognitivas, lo que conduce a la persona afectada a un estado de demencia. Además, aunque la enfermedad no es por sí misma mortal, induce complicaciones de salud (neumonías, enfermedades cardíacas) que reducen la esperanza de vida de la persona afectada a veinte años tras la aparición de los síntomas.

10 Se demostró que esta enfermedad está provocada por una única mutación genética del gen que codifica para la proteína huntingtina humana (hHtt). Ello conlleva una síntesis de una proteína anómala, lo que tiene como efecto la inducción de trastornos neuronales en el cerebro de la persona afectada por la enfermedad.

15 La figura 3 es un esquema del gen de la forma humana de la huntingtina (hHtt). Este gen comprende 3144 aminoácidos. La parte N-terminal (N-term) de este gen se detalla más particularmente. Esta parte N-term comprende 548 aminoácidos (incluido un dominio rico en aminoácidos de prolina) más un dominio poliglutámico denominado poliQ, de tamaño variable, que va de 0Q a 35Q para una proteína normal. Este dominio poliQ corresponde a una secuencia compuesta exclusivamente por aminoácidos de glutamina (cuya abreviatura de una letra correspondiente es "Q").

Más particularmente, en la corea de Huntington, la proteína anómala se caracteriza por una expansión anómala del dominio poliQ contenido en la parte N-terminal de la proteína hHtt.

20 Cuando este dominio supera 35Q, la proteína poliQ-hHtt forma agregados y se observa una degeneración de las neuronas del cuerpo estriado (estructura nerviosa implicada en la motricidad). Varios estudios también identificaron una influencia de la función normal de la proteína huntingtina en la enfermedad.

Sin embargo, no existe en la actualidad un tratamiento eficaz contra esta enfermedad.

25 Uno de los enfoques de tratamiento previstos actualmente consiste en luchar contra la agregación de los dominios poliQ de la proteína, que es el origen de la enfermedad.

30 Un estudio anterior (Mugat *et al.*, Human Molecular Genetics, 2008) permitió demostrar un efecto protector de las proteínas de tipo natural hHtt y de su homólogo de *Drosophila* dHtt con respecto a la agregación de las proteínas poliQ-hHtt. En efecto, fue posible recuperar los fenotipos inducidos por la proteína mutante poliQ-hHtt gracias a la presencia de 548 aminoácidos (aa) de la parte N-terminal (N-ter) de la proteína hHtt o de 620 aa de N-ter del homólogo de *Drosophila* de la Htt (dHtt). Estas secuencias se presentan en las figuras 1B y 1A, respectivamente. En la figura 1B, se observa en la primera línea la presencia de la serie de aminoácidos de glutamina (21Q en total) de esta proteína normal hHtt.

35 No obstante, el uso de una proteína de 548 y/o 620 aminoácidos no sería razonablemente factible en el marco de una terapia génica. En efecto, en vista de las múltiples funciones ejercidas por la proteína huntingtina y, en particular, por su extremo N-terminal, estas proteínas también serían susceptibles de ejercer otras funciones cuya naturaleza no está controlada. Por tanto, será necesaria la búsqueda de péptidos más pequeños. Una publicación puso de manifiesto un péptido de unión a poliQ (QBP1) procedente de una investigación de combinación de péptidos que puede inhibir la agregación de poliQ (Popiel *et al.* Molecular Therapy: The Journal Of American Society of Gene Therapy, vol. 15, n.º 2, 2007, páginas 303-309).

40 Por tanto, la invención se refiere a compuestos novedosos, particularmente dirigidos, que pueden usarse como medicamento para tratar la corea de Huntington.

La presente divulgación se refiere a un péptido aislado que presenta un tamaño inferior o igual a 200 aminoácidos, preferiblemente 100 y que comprende:

- una primera secuencia que presenta al menos el 80% de identidad con la secuencia AASSG (SEQ ID NO: 1), y/o
- 45 - una segunda secuencia que presenta al menos el 80% de identidad con la secuencia XAGDXXTXPXS (SEQ ID NO: 2), en la que X designa un aminoácido cualquiera.

Por "porcentaje de identidad" quiere decirse el porcentaje de residuos idénticos entre dos secuencias.

Preferiblemente, las secuencias primera y segunda del péptido según la invención presentan al menos el 90% de identidad, más preferiblemente al menos el 95%.

50 Estas secuencias se aislaron entre las partes N-ter de 548 y 620 aa de las proteínas hHtt y dHtt, que tienen un efecto protector sobre la agregación de las proteínas poliQ-hHtt.

Ventajosamente, el péptido aislado comprenderá tanto la primera secuencia como la segunda secuencia.

200 aminoácidos es un tamaño aceptable en terapia con péptidos. No obstante, se preferirá un tamaño inferior con el fin de optimizar la selectividad del péptido. Ventajosamente, el péptido presentará un tamaño inferior o igual a 100 aminoácidos, preferiblemente inferior o igual a 80, aún más preferiblemente inferior o igual a 50, y de un modo más preferido igual o inferior a 40, 39, 38, 37 ó 36.

Los péptidos son particularmente ventajosos para un uso en el marco de una terapia con péptidos ya que pueden ser tanto muy eficaces como selectivos, si son muy específicos. Además, tienen baja toxicidad.

Según un primer modo de realización, la segunda secuencia presenta la siguiente secuencia: SAGHDIITEQPRS (SEQ ID NO: 3). Más particularmente, el péptido comprende una secuencia que presenta al menos el 80% de identidad con la secuencia AASSGVSTPGSAGHDIITEQPRS (SEQ ID NO: 4) o la secuencia QQLFRTPPPELLQTLTAVGGIGQLTAAKEESGGRSRSGSIVELIAGGGSSCSPVLSRKQKQKGVLLGEEEALEDDSESR SDVSSSALTASVKDEISGELAASSGVSTPGSAGHDIITEQPRSQHTLQADSVDLASCDLTSSATDGDEEDILSHSSSQV SAVPSDPAM (SEQ ID NO: 5). Estas secuencias se denominaron respectivamente pep42 y pep4, tal como se indica en la figura 2. En esta figura, se observará que pep4 y pep42 incluyen las secuencias primera y segunda (indicadas mediante un fondo opaco).

Se aislaron pep4 y después pep42 a partir de la secuencia de 548 aa que incluye la parte N-ter de la proteína hHtt de tipo natural. En efecto, tal como se indica en la figura 4, la secuencia de 548 aa que incluye la parte N-ter de la proteína hHtt de tipo natural se cortó en 4 subsecuencias designadas respectivamente como pep1, pep2, pep3 y pep4. De modo inesperado, es la subsecuencia pep4 la que resulta ser activa (véase el ejemplo 1). Por tanto, la propia subsecuencia pep4 se dividió a continuación en 3 subfragmentos designados como pep41, pep42 y pep43, lo que permitió poner de manifiesto la actividad de una secuencia de 23 aa, pep42 (véase el ejemplo 2).

Resultó que pep4 y pep42 podían recuperar de la formación de agregados en células humanas, pero también en un organismo completo en las células no neuronales (tales como las glándulas salivales de la mosca) o en las motoneuronas larvales. En los siguientes ejemplos, también se demostró que pep42 puede recuperar los comportamientos fisiológicos afectados por poliQ-hHtt, tales como el tráfico axonal de las vesículas, la locomoción de las larvas o incluso la viabilidad y longevidad de las moscas adultas. Finalmente, pudo demostrarse que este péptido, que se ubica en una región rica en sitios de proteólisis, interacciona con el extremo N-terminal de la Htt, impidiendo así el fenómeno de agregación de poliQ-hHtt.

Además, la invención se refiere a un péptido aislado que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 5, o a un fragmento del mismo que presenta un tamaño inferior a 100 aminoácidos y que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4, o cualquier péptido o fragmento que presenta al menos el 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 4, y que tiene un efecto protector sobre la agregación de las proteínas poliQ-hHtt.

Recientemente se identificó con más precisión que Pep42 interaccionaba con N17 (los primeros 17 aa) que están implicados en la primera etapa de agregación, denominada nucleación. Esto sugiere que Pep42 selecciona como diana directamente la proteína poliQ-hHtt, lo que tendrá un efecto sobre la agregación y sobre los fenotipos que se derivan del mismo. Estos datos destacan el potencial terapéutico de Pep42 que combina: i) una acción directa sobre la proteína poliQ-hHtt, por tanto antes de cualquier otra acción perjudicial; ii) una gran especificidad puesto que las secuencias implicadas son regiones específicas de la Htt; iii) escasa toxicidad puesto que la acción de Pep42 implica dominios endógenos que están presentes normalmente en el organismo; iv) las ventajas de las tecnologías peptídicas con fines terapéuticos.

Por "recuperar", se entiende por tanto que los péptidos según la invención pueden hacer desaparecer los síntomas y/o los efectos nocivos asociados a la enfermedad conservando y/o restaurando las funciones fisiológicas normales.

Preferiblemente, las secuencias del péptido según la invención presentan al menos el 90% de identidad, más preferiblemente al menos el 95% de identidad.

La segunda secuencia presenta la siguiente secuencia: NAGEDAPTEAPSS (SEQ ID NO: 6). Esta secuencia corresponde a la secuencia identificada en la parte N-ter de 620 aa de la proteína de tipo natural dHtt.

Independientemente del modo de realización puesto en práctica, el péptido según la invención se incorporará ventajosamente en una proteína de fusión, con el fin de mejorar la penetración del péptido según la invención en el citoplasma de una célula. Por tanto, la invención también tiene como objetivo una proteína de fusión que comprende un péptido según la invención y un dominio de transducción de una proteína (PTD, "Protein Transduction Domain"). Preferiblemente, el PTD se elige del grupo constituido por el péptido TAT ("trans-acting activator of transcription", activador de la transcripción de acción en *trans*) (SEQ ID NO: 11: YGRKKRRQRRR), el péptido Penetratin™-1 (péptido de 16 aminoácidos (SEQ ID NO: 12: RQIKIWFQNRRMKWKK) correspondiente a la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia) y sus derivados y el péptido activo del homeodominio de la proteína Engrailed. El péptido según la invención consiste concretamente en la secuencia SEQ ID NO: 13.

Durante la síntesis del péptido de fusión Pep42-TAT (SEQ ID NO: 13:

AASSGVSTPGSAGHDIITEQPRSGGYGRKKRRQRRR), según las técnicas habituales, se insertaron 2 aminoácidos (glicina) entre la secuencia de Pep 42 y la secuencia TAT, con el fin de obtener una mayor flexibilidad entre los dos dominios. Este péptido también forma parte de la invención.

5 Los péptidos se sintetizan en fase sólida, con la estrategia de Fmoc. A continuación se analizan mediante espectrometría de masas (ESI) con el fin de determinar con exactitud la masa molecular del péptido sintetizado. La comparación entre la masa teórica y la masa experimental permite confirmar la ausencia de péptido de delección o de doble acoplamiento. La pureza de los péptidos sintetizados se determina mediante HPLC. A continuación se liofilizan los péptidos así controlados y validados. Por otro lado, debido a la sensibilidad de los péptidos y de las proteínas a las enzimas proteolíticas, estos se degradan fácilmente. Por tanto, se recomienda enormemente modificar 10 químicamente los extremos de los péptidos y las proteínas según la invención con el fin de protegerlos. Tales modificaciones químicas pueden elegirse de acetilaciones y amidaciones.

Asimismo, es posible estabilizar los péptidos y las proteínas mediante la inserción de aminoácidos no naturales, tales como por ejemplo el ácido aminohexanoico. En el caso de una proteína de fusión con TAT, es posible insertar estos aminoácidos no naturales en la región rica en arginina de TAT.

15 Según un segundo aspecto de la invención, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica para un péptido o una proteína descrito/descrita anteriormente. En particular, el polinucleótido se elige de los polinucleótidos que comprenden una secuencia que presenta al menos el 80% de identidad con las siguientes secuencias:

- GCTGCTTCTTCAGGGGTTTCCACTCCAGGGTCAGCAGGTCATGACATC
ATCACAGAACAGCCACGGTCA (SEQ ID N°7)
- CAGCAGCTCTTCAGAACGCCTCCACCCGAGCTTCTGCAAACCCTGACT
GCAGTCGGGGGCATTGGGCAGCTCACCGCTGCTAAGGAGGAGTCTGG
TGGCCGAAGCCGTAGTGGGAGTATTGTGGAAGCTTATAGCTGGAGGGGG
TTCCTCATGCAGCCCTGTCCTTTCAAGAAAACAAAAGGCAAAGTGCTC
TTAGGAGAAGAAGAAGCCTTGGAGGATGACTCTGAATCGAGATCGGAT
GTCAGCAGCTCTGCCTAACAGCCTCAGTGAAGGATGAGATCAGTGGA
GAGCTGGCTGCTTCTTCAGGGGTTTCCACTCCAGGGTCAGCAGGTCAT
GACATCATCACAGAACAGCCACGGTCACAGCACACTGCAGGCGGA
CTCAGTGGATCTGGCCAGCTGTGACTTGACAAGCTCTGCCACTGATGG
GGATGAGGAGGATATCTTGAGCCACAGCTCCAGCCAGGTCAGCGCCG
TCCCATCTGACCCTGCCATG (SEQ ID N°8)

20 Las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 codifican respectivamente para los péptidos de secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

Preferiblemente, las secuencias de los polinucleótidos según la invención presentan al menos el 90% de identidad, más preferiblemente al menos el 95% con las secuencias SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

25 La invención también tiene como objetivo un vector de expresión que comprende un polinucleótido según la invención. Ventajosamente, el vector es de tipo virus, preferiblemente, de tipo lentivirus. En efecto, los vectores de tipo lentivirus permiten transfectar numerosos tipos celulares y favorecer de manera notable la internalización en la célula y el suministro del polinucleótido. En determinados casos, permiten obtener también una incorporación duradera del polinucleótido en el genoma de la célula huésped.

La invención también cubre una célula huésped que comprende un vector de expresión según la invención.

30 Por tanto, los péptidos según la invención permiten impedir la formación de agregados inducidos por las proteínas anómalas poliQ-hHtt de la corea de Huntington.

Por tanto, los péptidos, las proteínas, los polinucleótidos y los vectores según la invención pueden usarse ventajosamente para la fabricación de un medicamento, en particular de un medicamento para el tratamiento de la corea de Huntington.

35 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un péptido, de una proteína, de un polinucleótido o de un vector según la invención, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ventajosamente, la composición farmacéutica según la invención comprende además un segundo compuesto elegido del grupo constituido por los péptidos dirigidos contra el poliQ, tales como QBP1 (para "Polyglutamine-Binding Peptide 1", péptido 1 de unión a poliglutamina), y los compuestos activos contra la corea de Huntington.

Entre los compuestos activos contra la corea de Huntington, pueden citarse los anticuerpos de cadena sencilla ("intracuerpos") dirigidos contra la corea de Huntington.

5 También se da a conocer un método de tratamiento terapéutico que comprende la administración de una cantidad eficaz de un péptido, de una proteína, de un polinucleótido o de un vector según la invención a un paciente afectado por corea de Huntington.

La invención se comprenderá mejor tras la lectura de la siguiente descripción, facilitada únicamente a modo de ejemplo y realizada haciendo referencia a los dibujos, en los que:

- la figura 1 presenta las partes N-terminales de las secuencias de las proteínas huntingtina de *Drosophila* (A) y humana (B),
- 10 - la figura 2 presenta las secuencias de los péptidos Pep4 (A) y Pep42 (C) y su secuencia de nucleótidos respectiva (B, D),
- la figura 3 es un esquema de la proteína huntingtina humana (hHtt) que pone de manifiesto la parte N-terminal,
- la figura 4 es un esquema del corte de una secuencia de 548 aa que comprende la parte N-terminal presentada en la figura 3, correspondiendo el corte a las diferentes subsecuencias estudiadas,
- 15 - la figura 5 ilustra el efecto protector del péptido Pep42 sobre células HeLa que expresan la proteína poliQ-hHtt,
- la figura 6 ilustra el efecto protector del péptido Pep42 sobre el fenotipo de despigmentación y de degeneración de los ojos de *Drosophila* que expresan el péptido poliQ-hHtt,
- la figura 7 ilustra la difusión y la actividad del péptido de fusión Pep42-TAT en un cultivo de células HeLa, y
- 20 - la figura 8 ilustra la difusión del péptido de fusión Pep42-TAT en el cerebro de ratones y su estabilidad a las 24 horas.

Ejemplo 1: Identificación de péptidos inhibidores de la agregación de poliQ-hHtt

Se clonaron diferentes péptidos contenidos en los 548 aa de la parte N-terminal de la huntingtina humana mediante Gateway en vectores de expresión en células HeLa en cultivo, de tipo pcDNA. Se etiquetó cada péptido o bien con Myc, o bien con Cherry en su extremo N-terminal. Se sometieron a prueba estos diferentes péptidos mediante cotransfección en células HeLa en presencia de un vector pcDNA que expresaba una proteína GFP-poliQ-hHtt (véase la figura 5). En estos experimentos, la proteína poliQ-hHtt sometida a prueba correspondía a una proteína hHtt que cubría 171 aa y que contenía un poliQ extendido con una etiqueta de GFP en su extremo N-ter (GFP-hHtt^{171aa}-136Q). Se pusieron en cultivo las células HeLa en placas de 6 pocillos y se transfectaron con 1,5 µg de ADN total usando el reactivo JetPei (Qbiogene). Se usan cantidades equivalentes de vectores de expresión (proteína poliQ y péptidos) para las cotransfecciones. Cuando sea necesario, se usa pBluescript para equilibrar la cantidad de ADN. Se visualiza la agregación de GFP-hHtt^{171aa}-136Q mediante inmunodetección con un anticuerpo anti-GFP (véase la figura 5). Esta proteína forma agregados citoplasmáticos (véase la figura 5A). En presencia de pep42, detectado en rojo en la figura 5C (simbolizado mediante la presencia de la letra R), la proteína GFP-hHtt^{171aa}-136Q ya no forma agregados tal como puede verse en las figuras 5C y 5D en comparación con la figura 5A. Este análisis permitió identificar un efecto inhibitorio de la agregación de poliQ-hHtt (que cubre 166 aa entre los aminoácidos 382 y 548, véase la figura 2A) por pep4 y por el péptido pep42 de 23 aa contenido en pep4. Este resultado se confirma mediante cuantificación tal como se muestra en el siguiente ejemplo 3.

Ejemplo 2: Propiedades inhibitorias de pep42 sobre la agregación de poliQ-hHtt en *Drosophila*

40 Se clonaron los péptidos pep4 y pep42 identificados como inhibidores de la agregación de poliQ-hHtt en células HeLa mediante la técnica Gateway en vectores de expresión pUAST de *Drosophila*, lo que permite la expresión de péptidos etiquetados (con 6 etiquetas Myc o GFP) en su extremo N-terminal.

Se produjeron moscas transgénicas que expresaban estos péptidos mediante inyección de los vectores en embriones de *Drosophila*. Se usó el sistema UAS/Gal4 (Brand y Perrimon, Development. 1993) con el fin de expresar estos péptidos en momentos y en tejidos específicos, en presencia de un vector UAS-poliQ-hHtt, etiquetado con HA (hemaglutinina).

50 Se usó el activador MS1096-Gal4 para expresar la proteína HA-hHtt^{171aa}-136Q (detectada por un anticuerpo anti-HA) en las glándulas salivales, en ausencia o en presencia del péptido GFP-pep42. En presencia del péptido GFP-pep42, detectado por un anticuerpo anti-GFP, la proteína poliQ-hHtt pierde la capacidad de agregarse. Se realizaron inmunomarcajes en las glándulas salivales de larvas de 3^{er} estadio disecadas. Se fijan las glándulas durante 20 minutos en tampón PBS en presencia de paraformaldehído (PFA) al 3,7% y Triton al 0,1%, luego se lavan en PBS/Triton al 0,1%. Se realizan las incubaciones con los anticuerpos (anti-HA, después anticuerpo conjugado con Cy3) en presencia de BSA al 1%. Estos inmunomarcajes mostraron la ausencia de agregados en presencia de pep4 o de pep42.

Ejemplo 3: Cuantificación de los agregados mediante filtración

a) A partir de células HeLa.

Se obtuvieron extractos proteicos según (Sittler *et al.*, Mol Cell. 1998) con las siguientes modificaciones: después de la transfección, se tratan los sedimentos de células con ADNasa y se resuspenden en 150 µl de SDS al 1% y DTT 50 mM en PBS. Se ponen las muestras a ebullición durante 5 min. Se filtraron conjuntamente dos alícuotas de 150 µl correspondientes a experimentos independientes y se reprodujo cada punto 3 veces.

b) A partir de las glándulas salivales.

Se disecaron las glándulas de 3 larvas de 3^{er} estadio y se trituraron en 30 µl de SDS al 2% y DTT 50 mM, después se desnaturalizaron durante 7 min a 98°C. A continuación se diluyen las muestras en 200 µl de SDS al 0,1% antes de la filtración. Para cada genotipo, se duplicaron las muestras.

Se filtraron las muestras sobre una membrana de acetato de celulosa (0,2 µM, Schleicher y Schuell) con un aparato Dot-blot de Biorad. A continuación se sometieron las membranas a una inmunodetección con un anticuerpo o bien policlonal anti-GFP para las células HeLa (Invitrogen, 1:5000), o bien policlonal anti-HA para las glándulas salivales (SC805, Santa-Cruz, 1:200), lo que permite visualizar los agregados. A continuación se detectan los agregados por un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado con HRP ("horseradish peroxidase", peroxidasa del rábano, Jackson 1:50.000). Se detectan las manchas inmunorreactivas con un sustrato electroquimioluminiscente (ECL, Roche) y se realizan las cuantificaciones mediante Image J (véase la figura 5B).

Ejemplo 4: Propiedades inhibitoras de pep42 sobre la toxicidad del ojo

Se analizan los fenotipos de despigmentación y de degeneración de los ojos en hembras con una edad de 10 días que expresan o bien UAS-hHtt^{67aa}-98Q o bien UAS-hHtt^{548aa}-128Q bajo el control del activador gmr-Gal4, después de una transferencia a 29°C desde la embriogénesis (véase la figura 6b, debe compararse con las moscas de tipo natural presentadas en la figura 6a). También se analizaron moscas que expresan otros genes implicados en enfermedades debidas a poliQ (UAS-SCA1-poliQ o UAS-SCA3-poliQ) (figura 6d). En todos los casos, las moscas presentan una gran degeneración de los ojos en ausencia del péptido pep42 tal como se ilustra esto en las figuras 6b y 6d. Sólo las moscas que expresan los poliQ-hHtt (67 aa o 548 aa) tienen ojos normales en presencia de pep42 (debe compararse la figura 6c con la figura 6e). Estos resultados muestran la especificidad de la acción de pep42 sobre la huntingtina.

Ejemplo 5: Propiedades inhibitoras de la huntingtina normal y de pep42 sobre el transporte axonal afectado por la expresión de poliQ-hHtt

Con el fin de someter a prueba el impacto de poliQ-hHtt sobre el transporte axonal, se hizo un seguimiento del destino de vesículas que expresaban el neuropéptido Y (NPY) marcado con GFP (NPY-GFP), o bien después de disección y fijación de las larvas, o bien en microscopía en tiempo real con el fin de realizar un seguimiento del tráfico de las vesículas en las motoneuronas.

a) Fijación de las larvas.

Se disecó el sistema nervioso de larvas OK6-Gal4 que expresaban vesículas que contenían NPY-GFP (OK6-Gal4; UASNPY-GFP) y se fijó como anteriormente en PFA al 3,7%. Se realizan las incubaciones con los anticuerpos y los lavados en PBS, Triton al 0,3%. La expresión de la Htt^{548aa}-0Q normal no tiene ningún efecto sobre las vesículas que siguen siendo numerosas y también distribuidas a lo largo del axón. La Htt normal, detectada por un anticuerpo anti-Htt HU-4C8 (Chemicon, 1:750), se encuentra a lo largo del axón y no puede detectarse a nivel de las uniones neuromusculares (UNM). La expresión de la proteína hHtt^{548aa}-128Q conduce a la formación de agregados a lo largo de los axones y a una acumulación anómala de la proteína a nivel de las UNM. De ello resulta una disminución del número global de vesículas y su acumulación, sobre todo a nivel de los agregados. En todos los casos, las vesículas alcanzan las UNM. La adición de pep42 permite observar una disminución del tamaño de los agregados poliQ-hHtt, su no acumulación a nivel de las UNM y una mejor distribución de las vesículas a lo largo de los axones.

b) Microscopía en tiempo real.

Con este objetivo, se anestesiaron larvas OK6-Gal4; UAS-NPY-GFP con éter durante 2 min y se mantuvieron con el lado ventral hacia arriba entre el portaobjetos y cubreobjetos en agarosa al 1% polimerizada, para una visualización directa en microscopía de fluorescencia con un objetivo 63X, con el fin de realizar un seguimiento del movimiento de las vesículas entre los segmentos A3 y A4. Se realiza una película de 100 tomas cada 280 ms. Para cada película, se analizaron 20 vesículas mediante Image J (plugin "manual vesicle tracking" (seguimiento manual de vesículas) desarrollado por F. Cordelières, Institut Curie, Orsay, Francia). Se consideran en pausa las vesículas cuya velocidad instantánea es inferior a 0,01 µm/s. Se calcula la velocidad media como la distancia total recorrida independientemente de la dirección de la vesícula (anterógrada o retrógrada) con respecto al tiempo total estimado durante el cual se hace un seguimiento de la vesícula. Mientras que la expresión de la proteína hHtt^{548aa}-128Q conduce a un aumento del tiempo de pausa de las vesículas y a una disminución de su velocidad, la presencia de

pep42 recupera tanto el tiempo de pausa como la velocidad de las vesículas.

c) Locomoción de las larvas.

En asociación a estos problemas vesiculares de las larvas OK6-Gal4; UAS-NPY-GFP; UAS-hHtt^{548aa}-128Q, se observó una movilidad un 25% menor de las larvas, movilidad que se recupera por completo en presencia de pep42.

5 Ejemplo 6: Mecanismo de acción de pep42

El efecto protector de pep42 puede explicarse o bien mediante una interacción directa con la huntingtina poliQ, o bien porque pep42 ajusta el título de factores implicados con la htt poliQ en la enfermedad. Por tanto, se ha investigado si pep42 podría interaccionar con la Htt y con qué parte. Pep42 se ubica entre las posiciones 480 y 502 de la proteína de tipo natural y puede recuperar fenotipos inducidos por proteínas poliQ-hHtt que expresan diferentes tamaños del N-ter (67 aa, 170 aa o 548 aa). Esto sugiere que si pep42 actúa mediante una interacción directa con la Htt, esta interacción debe realizarse con los primeros 67 aa.

Se sometió a prueba esta hipótesis mediante experimentos de coimmunoprecipitación a partir de células HeLa cotransfectadas con GFP-hHtt^{171aa}-136Q o con GFP-P1 (correspondiente a los primeros 98 aa sin dominio poliQ), en presencia de Cherry-pep42. Una resina de proteína G/A-agarosa que se une a un anticuerpo anti-GFP permitió la inmunoprecipitación de la proteína GFP-hHtt^{171aa}-136Q o el péptido GFP-P1 y la coimmunoprecipitación de Cherry-pep42, visualizado mediante un anticuerpo anti-Cherry mediante inmunotransferencia de tipo Western. Estos resultados muestran que pep42 interacciona en efecto directamente con la parte N-terminal de la huntingtina, y que esta interacción no requiere la presencia del dominio poliQ, lo que explica la especificidad del efecto protector de pep42 sobre la corea de Huntington, pero no sobre otras enfermedades debidas a poliQ.

Se repitieron los mismos experimentos con éxito usando los primeros 17 aminoácidos antes del dominio poliQ de la proteína Htt humana.

Ejemplo 7: Propiedad de difusión del péptido de fusión TAT-Pep42 y conservación de la actividad protectora

- Difusión en células HeLa (figura 7a)

Se acopla el marcador fluorescente TAMRA (5-carboxamido-(6-azido)hexanil-tetrametilrodamina) con pep42-TAT de manera que se obtiene el péptido de fusión TAMRA-pep42-TAT. Se añade TAMRA-pep42-TAT a un medio de cultivo de células HeLa. A continuación se visualiza la fluorescencia de estos péptidos en microscopía de fluorescencia (figura 7a) que se superpone con la misma vista en microscopía por contraste de fase (figura 7b). La figura 7b muestra claramente que la fluorescencia está bien delimitada en el interior de las células y que el péptido de fusión (TAMRA-PEP42-TAT) difundió desde el medio de cultivo para penetrar en el citoplasma de las células.

- Actividad en las células HeLa (figura 7c)

Se transfectan células HeLa con:

1-GFP-poliQ-hHtt (Q136),

2-GFP-poliQ-hHtt cotransfectado con un vector que expresa Pep42-TAT, o

3-GFP-poliQ-hHtt en presencia de una cantidad creciente del péptido de síntesis Pep42-TAT puesto en el medio de cultivo.

La figura 7c corresponde al porcentaje de agregado identificado mediante la señal de GFP unido a la cadena de poliQ-hHtt, en presencia de una cantidad creciente del péptido de fusión. Se observa que la cantidad de GFP de las células disminuye significativamente.

Estos experimentos muestran la conservación de la actividad protectora del péptido de fusión.

- Difusión en el cerebro de ratones (figura 8a)

Se realiza una inyección intracerebroventricular (ICV) de 5 µg de TAMRA-Pep-42-TAT a un ritmo de 1 µg/min, seguido por un análisis de secciones de cerebro o bien 6 horas después de la inyección (figura 8a) o bien 24 horas después de la inyección.

En la figura 8a, se observan las imágenes a dos aumentos distintos de las diferentes secciones siguientes:

- 1- Sección de la parte izquierda de la corteza,
- 2- Sección del ventrículo derecho, y
- 3- Sección subcortical (cuerpo estriado).

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural
 <400> 2
Xaa Ala Gly Xaa Asp Xaa Xaa Thr Glu Xaa Pro Xaa Ser
 10 1 5 10
 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> extraída de huntingtina humana
 <400> 3
Ser Ala Gly His Asp Ile Ile Thr Glu Gln Pro Arg Ser
 1 5 10
 <210> 4

20 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Pep42
 <400> 4
Ala Ala Ser Ser Gly Val Ser Thr Pro Gly Ser Ala Gly His Asp Ile
 1 5 10 15
Ile Thr Glu Gln Pro Arg Ser
 20

25 <210> 5
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Pep4
 <400> 5

ES 2 652 643 T3

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

Ala Val Gly Gly Ile Gly Gln Leu Thr Ala Ala Lys Glu Glu Ser Gly
 20 25 30

Gly Arg Ser Arg Ser Gly Ser Ile Val Glu Leu Ile Ala Gly Gly Gly
 35 40 45

Ser Ser Cys Ser Pro Val Leu Ser Arg Lys Gln Lys Gly Lys Val Leu
 50 55 60

Leu Gly Glu Glu Glu Ala Leu Glu Asp Asp Ser Glu Ser Arg Ser Asp
 65 70 75 80

Val Ser Ser Ser Ala Leu Thr Ala Ser Val Lys Asp Glu Ile Ser Gly
 85 90 95

Glu Leu Ala Ala Ser Ser Gly Val Ser Thr Pro Gly Ser Ala Gly His
 100 105 110

Asp Ile Ile Thr Glu Gln Pro Arg Ser Gln His Thr Leu Gln Ala Asp
 115 120 125

Ser Val Asp Leu Ala Ser Cys Asp Leu Thr Ser Ser Ala Thr Asp Gly
 130 135 140

Asp Glu Glu Asp Ile Leu Ser His Ser Ser Ser Gln Val Ser Ala Val
 145 150 155 160

Pro Ser Asp Pro Ala Met
 165

<210> 6

<211> 13

5 <212> PRT

<213> *Drosophila*

<400> 6

Asn Ala Gly Glu Asp Ala Pro Thr Glu Ala Pro Ser Ser
 1 5 10

<210> 7

10 <211> 69

<212> ADN

<213> extraída de huntingtina humana

<400> 7

ES 2 652 643 T3

	gctgcttctt caggggtttc cactccaggg tcagcaggtc atgacatcat cacagaacag	60
	ccacggtca	69
	<210> 8	
	<211> 498	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> extraída de huntingtina humana	
	<400> 8	
	cagcagctct tcagaacgcc tccacccgag cttctgcaaa ccctgactgc agtcgggggc	60
	attgggcagc tcaccgctgc taaggaggag tctggtggcc gaagccgtag tgggagtatt	120
	gtggaactta tagctggagg gggttcctca tgcagccctg tcctttcaag aaaacaaaaa	180
	ggcaaagtgc tcttaggaga agaagaagcc ttggaggatg actctgaatc gagatcggat	240
	gtcagcagct ctgccttaac agcctcagtg aaggatgaga tcagtggaga gctggctgct	300
	tcttcagggg tttccactcc agggtcagca ggtcatgaca tcatcacaga acagccacgg	360
	tcacagcaca cactgcaggc ggactcagtg gatctggcca gctgtgactt gacaagctct	420
	gccactgatg gggatgagga ggatatcttg agccacagct ccagccaggt cagcggcgtc	480
10	ccatctgacc ctgccatg	498
	<210> 9	
	<211> 620	
	<212> PRT	
	<213> <i>Drosophila</i>	
15	<400> 9	

ES 2 652 643 T3

Met Asp Lys Ser Arg Ser Ser Ala Tyr Asp Lys Phe Val Gly Phe Val
 1 5 10 15

Glu Gln Leu Arg Asn Thr Glu Cys Ser Gln Lys Gln Lys Ile Thr Cys
 20 25 30

Phe Gln Gln Ile Ala Glu Cys Ile Met Ser Pro Ser Leu Ala Gly His
 35 40 45

Ile Asn Tyr Ala Ala His Cys Gly Thr Ala Thr Asn Val Leu Leu Leu
 50 55 60

Phe Cys Glu Asp Val Asp Ser Val Val Arg Met Ser Ala Glu Glu Asn
 65 70 75 80

Leu Asn Lys Ile Leu Arg Ser Leu Glu Lys Thr Arg Val Ser Arg Ile
 85 90 95

Leu Met Asp Leu Tyr Gly Glu Ile Lys Arg Asn Gly Asn Gln Arg Ser
 100 105 110

Leu Arg Ile Cys Leu Asn Leu Phe Ser Tyr Tyr Ala Pro Gln Ile Lys
 115 120 125

Glu Lys His Ile Lys Trp Tyr Ala Val Arg Leu Leu Gln Cys Met Thr
 130 135 140

Thr Ile Ser Gln Arg Lys Glu Thr Leu Leu Gln Glu Thr Leu Cys Asp
 145 150 155 160

Phe Val Lys His Phe Ser Arg His Ile Gln Gln Gly Leu Ser Asp Ser
 165 170 175

Glu Ser Cys Lys Leu Phe Glu Thr Phe Leu Asp Gln Ile Ser Ser Asp
 180 185 190

ES 2 652 643 T3

Cys Ala Val Lys Arg Arg Cys Ser Ala Gln Asn Cys Met Ser Leu Ile
 195 200 205
 Glu Asn Ala Arg Asn Arg Ser Leu Met Ala Arg His Gly Val Asn Lys
 210 215 220
 Val Met Glu Leu Leu Leu Thr Asp Gln Gln Ala Asn Ser Val Leu Gly
 225 230 235 240
 Ala Leu Gly Leu Leu Arg Leu Leu Leu Pro Gln Leu Ile Arg Gly Tyr
 245 250 255
 Pro Gly Asp Ser His Glu Asp Ser Glu Ser Leu Ala Gly Lys Lys Gln
 260 265 270
 Gln Gln Gln Gln Thr Thr Thr Ser Asp Cys Arg Gln Ile Ile Glu Ile
 275 280 285
 Tyr Asp Tyr Cys Leu His Leu Leu Ser Thr Gln His Thr Ala Asn His
 290 295 300
 Ala Ile Ile Asn Ala Thr Leu Glu Val Ile Asn Gly Ile Leu Gln Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Ala Ala Ser Asp Gly Gln Cys Ser Gln Ser Leu Gly Gln Ser
 325 330 335
 Leu Arg Gln Leu Leu Cys Asn Gln Gln Leu Gln His Asn Glu Tyr Leu
 340 345 350
 Arg Arg Arg Lys Ser Leu Lys Asn Gln Ile Phe Gln Leu Lys Asn Tyr
 355 360 365
 Glu Val Ala Thr Ser Gln His Gln Leu Glu Asp Glu Asp Glu Asn Glu
 370 375 380
 Asp Val Asp Glu Leu Val Val Gly Ala Thr Ala Met Gln Met Lys Lys
 385 390 395 400
 Asn Ser Asn Ala Lys Leu Gln Gln Ala Lys Cys Arg Glu Gln Gln Gln
 405 410 415
 His Gln His Gln Gln Gln Leu Glu Val Asp Asn Ser Ser Leu Gly Ile
 420 425 430
 Asn Ala Gly Glu Asp Ala Pro Thr Glu Ala Pro Ser Ser Val Ala Asp
 435 440 445

ES 2 652 643 T3

Glu Gly Gly Glu Pro Glu Ser Thr Lys Leu Arg Cys His Ile Arg Asn
 450 455 460

Ala Ala Arg Ser Ile Ser Glu Cys Val Ala Ser Asp Glu Asp Lys Gln
 465 470 475 480

Gly Gln Gly His Arg Gln Gln Arg Asp Glu Asp Gly Val Val Val Ala
 485 490 495

Glu Asp Met
 500 505 510

Glu Leu Leu Ser Ala Glu Cys Asp Asp Phe Thr Thr Leu Ser Gln Leu
 515 520 525

Asn Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ala Ala Leu Lys Leu Pro Thr Thr
 530 535 540

Thr Ala Ala Ser Ser Gly Gly Ala Ala Thr Ser Gln Asp Asp Lys Leu
 545 550 555 560

Ile Asp Val Asp Ala Asp Val Gly Gly Leu Pro Lys Pro Gln His Gln
 565 570 575

Ser Ser Leu Gln Asn Leu Leu Ala Gly Ser Asp Asp Lys Ser Gln His
 580 585 590

Leu Ser Asp Ile Asp Asn Glu Ser Phe Asn Ser Ile Asp Phe Asp Ala
 595 600 605

Glu Ile Thr Ile Ala Gly Ser Lys Glu Gln Gln Gln
 610 615 620

<210> 10

<211> 570

<212> PRT

5 <213> Huntingtina humana

<400> 10

Met Ala Thr Leu Glu Lys Leu Met Lys Ala Phe Glu Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Phe Gln
 20 25 30

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro
 35 40 45

ES 2 652 643 T3

Pro Gln Leu Pro Gln Pro Pro Pro Gln Ala Gln Pro Leu Leu Pro Gln
 50 55 60

Pro Gln Pro Gly Pro Ala Val
 65 70 75 80

Ala Glu Glu Pro Leu His Arg Pro Lys Lys Glu Leu Ser Ala Thr Lys
 85 90 95

Lys Asp Arg Val Asn His Cys Leu Thr Ile Cys Glu Asn Ile Val Ala
 100 105 110

Gln Ser Val Arg Asn Ser Pro Glu Phe Gln Lys Leu Leu Gly Ile Ala
 115 120 125

Met Glu Leu Phe Leu Leu Cys Ser Asp Asp Ala Glu Ser Asp Val Arg
 130 135 140

Met Val Ala Asp Glu Cys Leu Asn Lys Val Ile Lys Ala Leu Met Asp
 145 150 155 160

Ser Asn Leu Pro Arg Leu Gln Leu Glu Leu Tyr Lys Glu Ile Lys Lys
 165 170 175

Asn Gly Ala Pro Arg Ser Leu Arg Ala Ala Leu Trp Arg Phe Ala Glu
 180 185 190

Leu Ala His Leu Val Arg Pro Gln Lys Cys Arg Pro Tyr Leu Val Asn
 195 200 205

Leu Leu Pro Cys Leu Thr Arg Thr Ser Lys Arg Pro Glu Glu Ser Val
 210 215 220

Gln Glu Thr Leu Ala Ala Ala Val Pro Lys Ile Met Ala Ser Phe Gly
 225 230 235 240

Asn Phe Ala Asn Asp Asn Glu Ile Lys Val Leu Leu Lys Ala Phe Ile
 245 250 255

Ala Asn Leu Lys Ser Ser Ser Pro Thr Ile Arg Arg Thr Ala Ala Gly
 260 265 270

Ser Ala Val Ser Ile Cys Gln His Ser Arg Arg Thr Gln Tyr Phe Tyr
 275 280 285

Ser Trp Leu Leu Asn Val Leu Leu Gly Leu Leu Val Pro Val Glu Asp

ES 2 652 643 T3

Ala Met Asp Leu Asn Asp Gly Thr Gln Ala Ser Ser Pro Ile Ser Asp
 545 550 555 560

Ser Ser Gln Thr Thr Thr Glu Gly Pro Asp
 565 570

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio transductor de proteína

<400> 11

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

10 <210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> extraída de la proteína Antennapedia

<400> 12

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

15

<210> 13

<211> 36

<212> PRT

<213> Pep42-TAT

20 <400> 13

Ala Ala Ser Ser Gly Val Ser Thr Pro Gly Ser Ala Gly His Asp Ile
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Gln Pro Arg Ser Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg
 20 25 30

Gln Arg Arg Arg
 35

REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 5, o fragmento del mismo que presenta un tamaño inferior a 100 aminoácidos y que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4, o cualquier péptido o fragmento que presenta al menos el 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 4, y que tiene un efecto protector sobre la agregación de las proteínas poliQ-hHtt.
2. Péptido aislado según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 4.
3. Proteína de fusión que comprende un péptido según la reivindicación 1 ó 2 y un dominio de transducción de una proteína (PTD, "protein transduction domain"), eligiéndose concretamente dicho dominio de transducción del grupo constituido por TAT ("trans-acting activator of transcription") y el péptido Penetratin.
4. Proteína de fusión según la reivindicación 3, consistiendo dicha proteína de fusión en la secuencia SEQ ID NO: 13.
5. Polinucleótido que codifica para un péptido según la reivindicación 1 ó 2 o que codifica para una proteína según la reivindicación 3 ó 4, concretamente que consiste en una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
6. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 5, siendo concretamente dicho vector de tipo virus.
7. Célula huésped que comprende un vector de expresión según la reivindicación 6.
8. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz
 - de un péptido según la reivindicación 1 ó 2, o
 - de una proteína según la reivindicación 3 ó 4, o
 - de un polinucleótido según la reivindicación 5, o
 - de un vector según la reivindicación 6,
 en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, comprendiendo concretamente dicha composición un segundo compuesto elegido del grupo constituido por los péptidos dirigidos contra el poliQ y los compuestos activos contra la corea de Huntington.
9. Péptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o proteína según la reivindicación 3 ó 4, para un uso como medicamento.
10. Polinucleótido que codifica para un péptido o una proteína según la reivindicación 9, para su uso como medicamento.
11. Vector de expresión para su uso como medicamento que comprende un polinucleótido según la reivindicación 10, siendo concretamente dicho vector de tipo virus.
12. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o proteína según la reivindicación 3 ó 4, o polinucleótido según la reivindicación 5, o vector según la reivindicación 6, para su uso para el tratamiento de la corea de Huntington.

A - dHtt (1-620aa)

MDKSRSSAYDKFVGFVEQLRNTECSQKQKITCFQQIAECIMSPSLAGHIN
YAAHCGTATNVLLFCEDVDSVVRMSAEENLNKILRSLEKTRVSRILMDL
YGEIKRNGNQSRSLRICLNLFSSYYAPQIKEKHIKWAYVRLQLCMTTISQRK
ETLLQETLCDVFKHFSRHIQQGLSDSESCKLFETFLLDQISSDCAVKRRCS
AQNCMSLIENARNRSLMARHGVNKVMELLTDDQQAANSVLGALGLLRLLLP
QLIRGYPGDSEDSESLAGKKQQQQQTTTSDCRQIIEIYDYCLHLLSTQH
TANHAIINATLEVINGILQAVDAASDGQCSQSLGQSLRQLLCNQQLQHNE
YLRRRKS LKNQIFQLKNYEVA TSQH QLEDEDENEDVDEL VVGATAMQMKK
NSNAKLQQA KCREQQQHQQQLEVDNSSLGINAGEDAPTEAPSSVADEG
GEPESTKL RCHIRNAARSISECVASDEDKQGQGHRRQDEDEG VVVAEDDD
DDDDDDDDDDMELLSAECDDFTTSQLNEQQQALSAAKLPTTTAASSG
GAATSQDDKLIDVDADVGGLPKPQHQSSLQNLLAGSDDKSQHLSDIDNES
FNSIDFDAEITIAGSKEQQQ

B - hHtt (1-548aa)

MATLEKLMKAFESLKS FQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPPPQ
LPQPPQAQPLLPQPQPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRV
NHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGIAMELFLLCSDDAESDVRMVADEC
LNKVIKALMDSNLPRLQLELYKEIKKNGAPRSLRAALWRFAEL AHLVRPQ
KCRPYLVNLLPCLTRTSKRPEESVQETLAAAVPKIMASFGNFANDNEIKV
LLKAFIANLKSSSPTIRRTAAGSAVSICQHSRRTQYFYSWLLNVLLGLLV
PVEDEHSTLLILGVLLTLRYLVPLLQQQVKDTSLKGSFGVTRKEMEVS PS
AEQLVQVYELTLHHTQH QDHNVVTGALELL QQLFRTPPPELLQTLTAVGG
IGQLTAAKEESGGRSRSIVELIAGGGSSCSPVLSRKQKGVLLGEEEA
LEDDSESRSDVSSALTASVKDEISGELAASSGVSTPGSAGHDITEOPRS
QHTLQADSVDLASCDLTSSATDGDEEDILSHSSQVSAVPSDPAMD LND
GTQASSPISDSSQTTEGPD

Fig. 1

A - Secuencia peptídica Pep4 - SEQ ID NO: 5

QLFRTPPELLQTLTAVGGIGQLTAAKEESGGRSRSGSIVELIAGGGSSCSPVL
SRKQKGKVLLGEEEALEDDSESRSVSSALASVKDEISGEL AASSGVSTPGS
AGHDIITEQPRSQHTLQADSVDLASCDLTSSATDGDEEDILSHSSSQVSAVPSD
PAM

B - Secuencia de nucleótidos - SEQ ID NO: 8

CAGCAGCTCTTCAGAACGCCTCCACCCGAGCTTCTGCAAACCCTGACTGC
AGTCGGGGGCATTGGGCAGCTCACCGCTGCTAAGGAGGAGTCTGGTGGCC
GAAGCCGTAGTGGGAGTATTGTGGAACCTTATAGCTGGAGGGGGTTCCTCA
TGCAGCCCTGTCCTTCAAGAAAACAAAAGGCAAAGTGCTCTTAGGAGA
AGAAGAAGCCTTGGAGGATGACTCTGAATCGAGATCGGATGTCAGCAGCT
CTGCCTTAACAGCCTCAGTGAAGGATGAGATCAGTGGAGAGCTGGCTGCT
TCTTCAGGGGTTTCCACTCCAGGGTCAGCAGGTCATGACATCATCACAGA
ACAGCCACGGTCACAGCACACACTGCAGGCGGACTCAGTGGATCTGGCCA
GCTGTGACTTGACAAGCTCTGCCACTGATGGGGATGAGGAGGATATCTTG
AGCCACAGCTCCAGCCAGGTCAGCGCCGTCATCTGACCCTGCCATG

C - Secuencia peptídica Pep42 - SEQ ID NO: 4

AASSGVSTPGSAGHDIITEQPRS

D - Secuencia de nucleótidos - SEQ ID NO: 7

GCTGCTTCTTCAGGGGTTTCCACTCCAGGGTCAGCAGGTCATGACATCAT
CACAGAACAGCCACGGTCA

Fig. 2

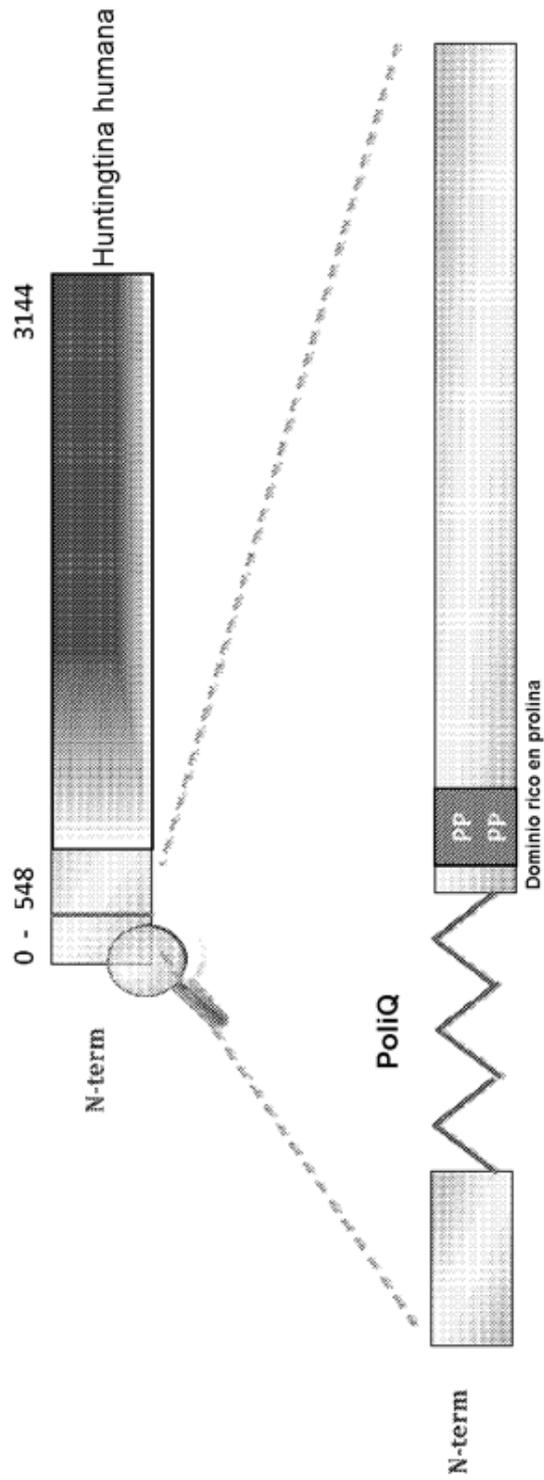


Fig. 3

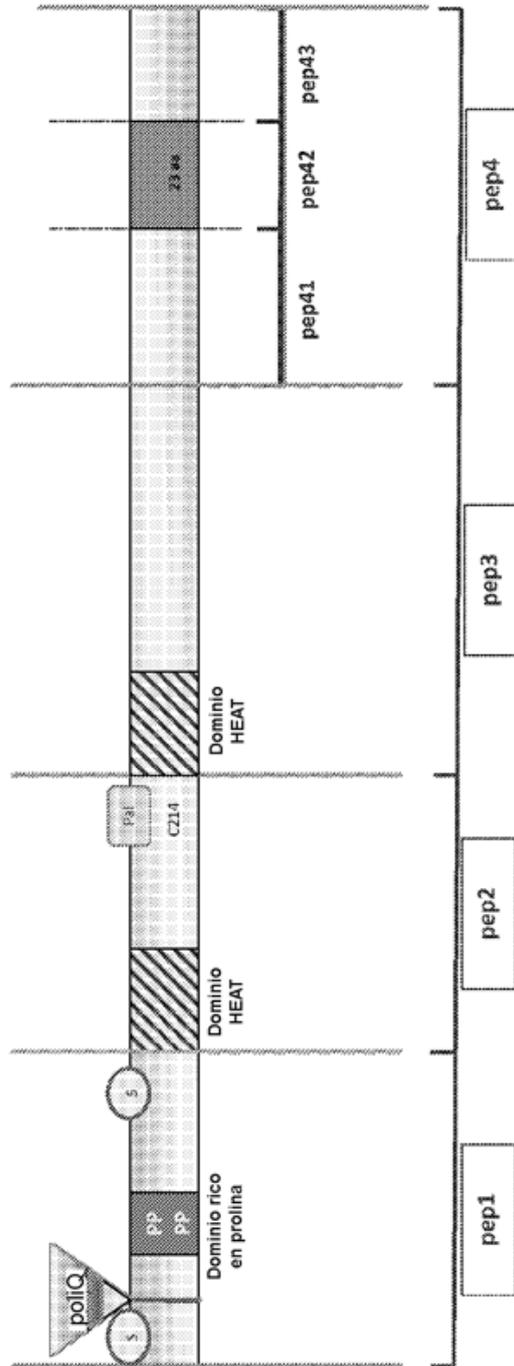


Fig. 4

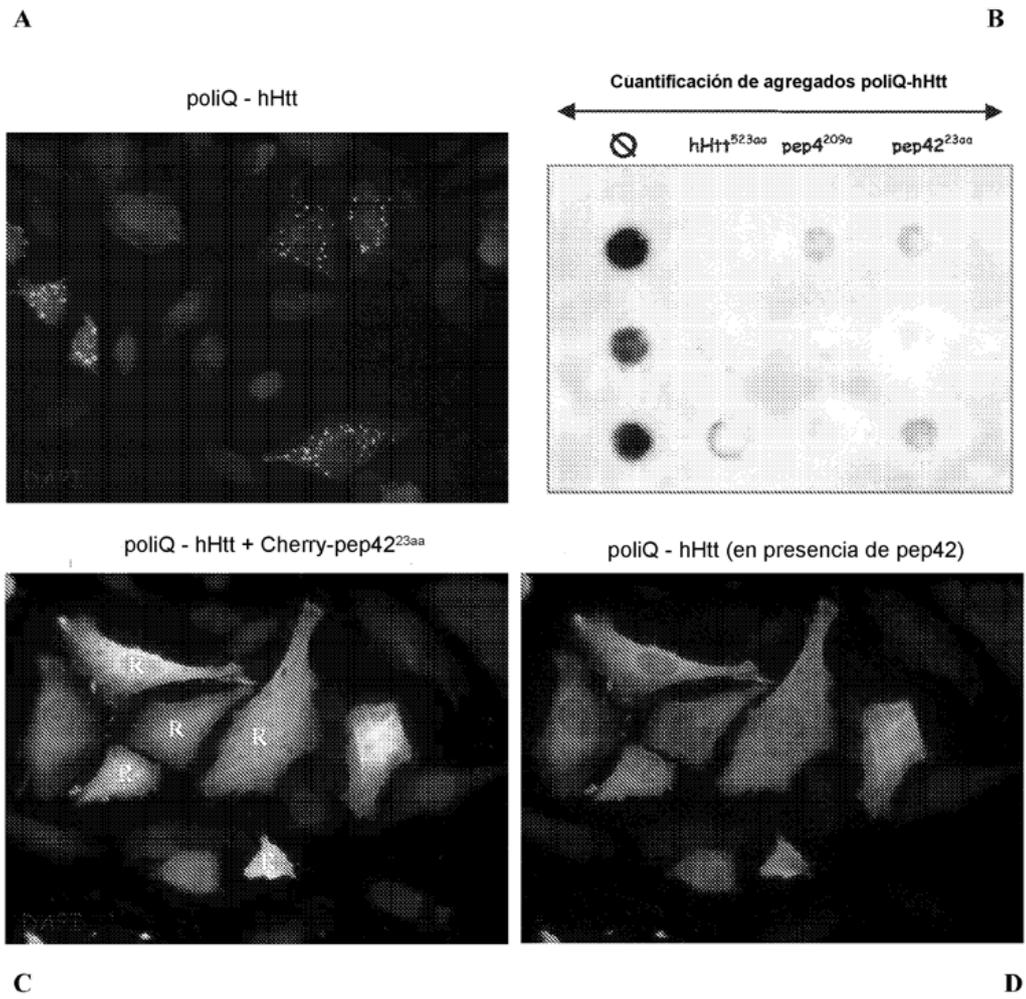


Fig. 5

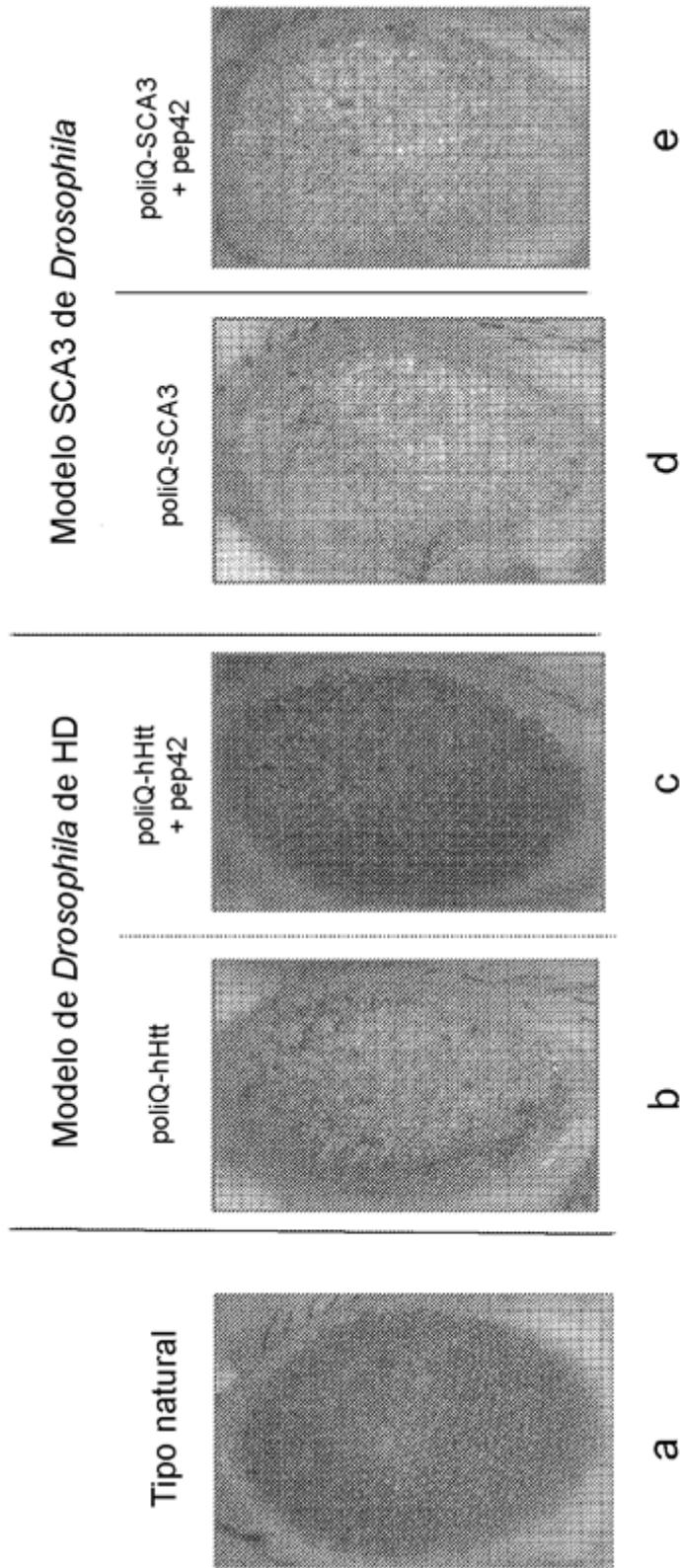


Fig. 6

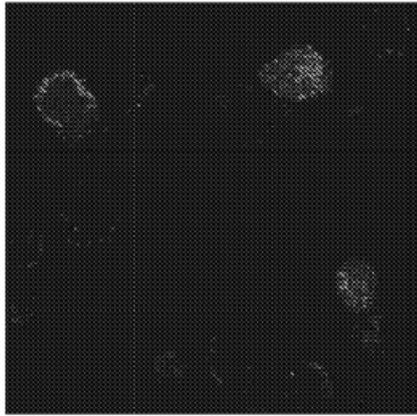


Fig. 7a

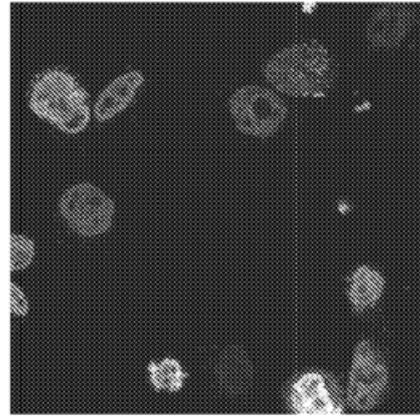


Fig. 7b

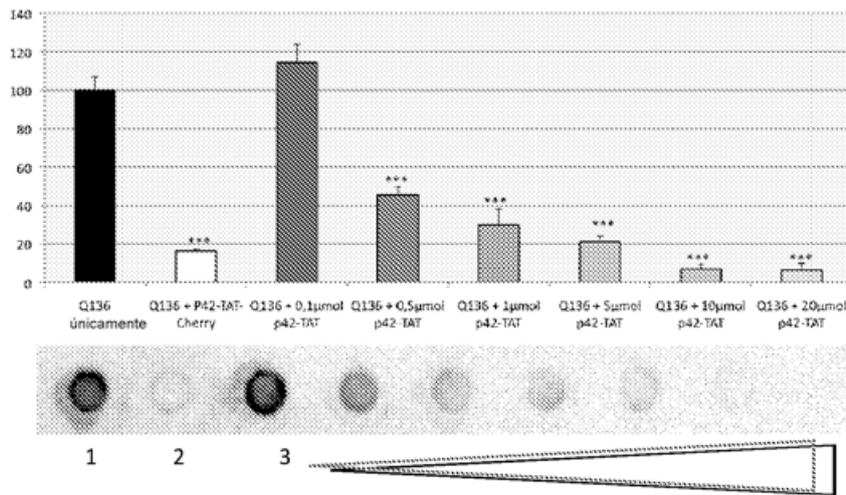


Fig. 7c

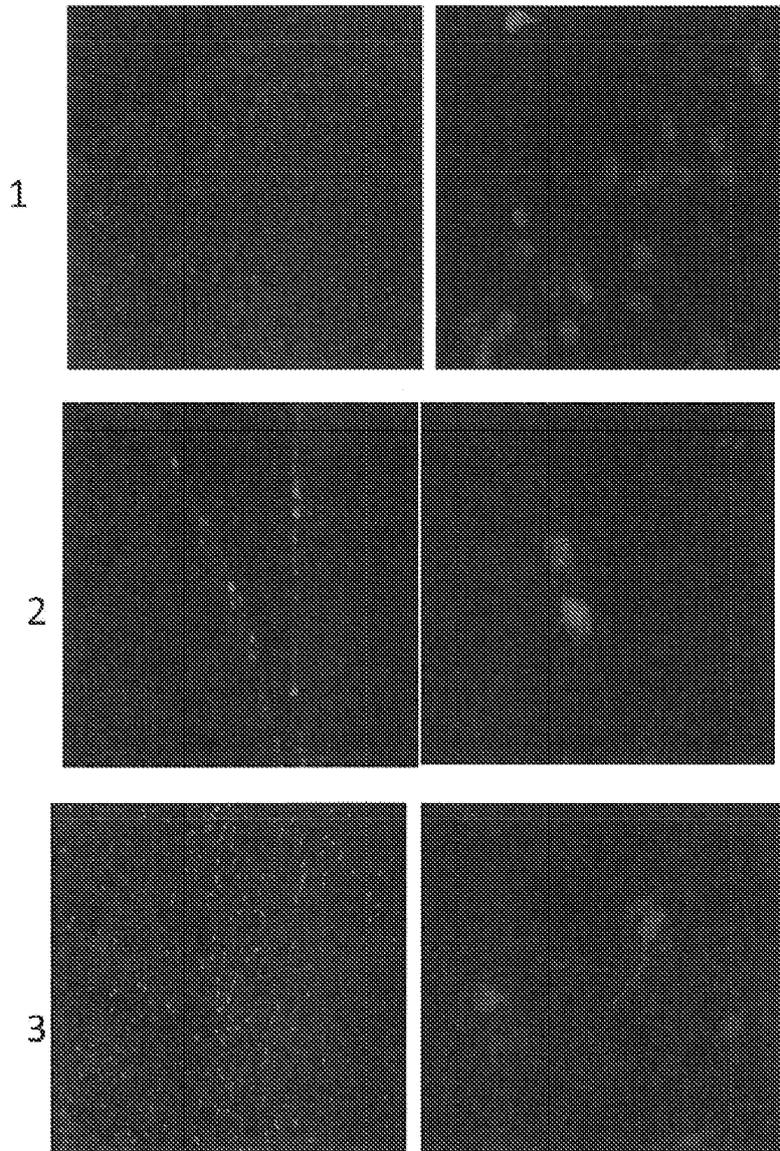
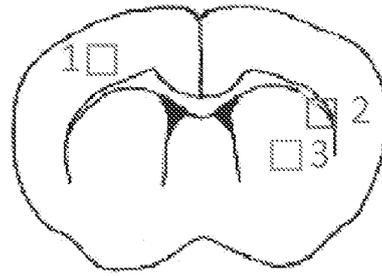


Fig. 8a

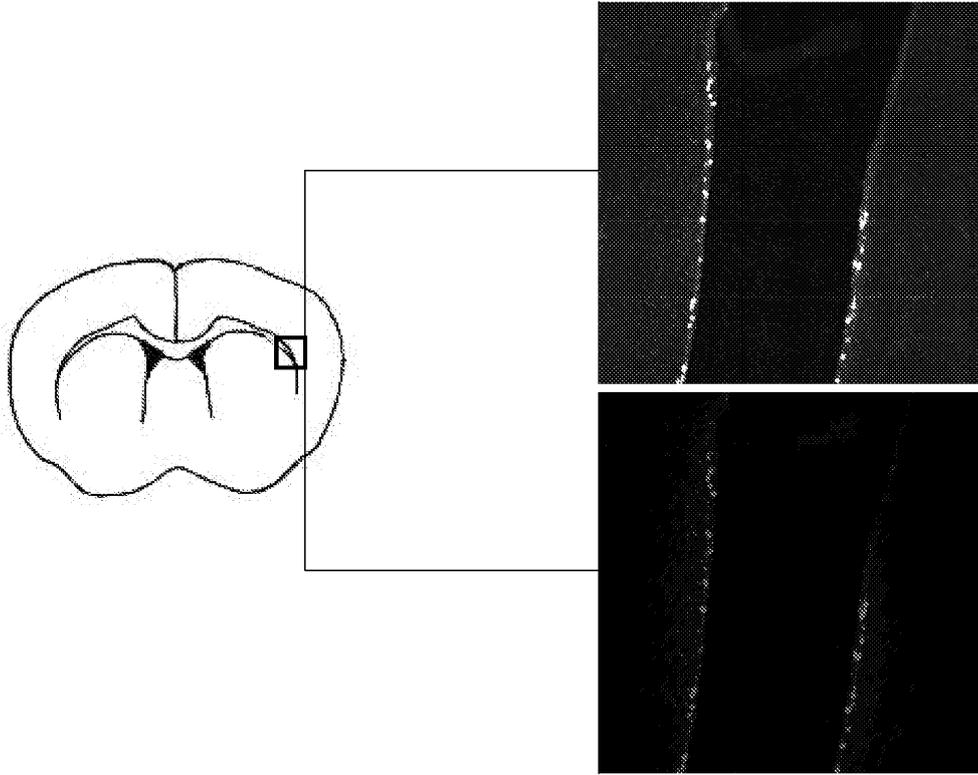


Fig. 8b