



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2020 00548**

(22) Data de depozit: **31/08/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2022 BOPI nr. **3/2022**

(71) Solicitant:
• **SZEDLACSEK ȘTEFAN EUGEN,**
STR.MĂRULUI, NR.45A, AP.4, BUCUREȘTI,
B, RO;
• **BADEA RODICA-AURA,**
STR.GHEORGHE SAIDAC, NR.5B, BL.36,
SC.1, AP.10, BUCUREȘTI, B, RO;

• **SZEDLACSEK HOREA-ȘTEFAN,**
BD.IANCU DE HUNEDOARA, NR.50A,
AP.15, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **INVENTATORI NEDECLARAȚI, *, RO**

Data publicării raportului de documentare:
30.03.2022

(54) **PEPTIDE DE INTERFERENȚĂ CA INHIBITORI AI
INTERACȚIUNILOR LEGATE DE ENDOCITOZA
RECEPTORILOR AMPA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o peptidă de interferență cu acțiune inhibitorie asupra interacțiunilor legate de endocitoza receptorului AMPA de la nivelul sinapselor neuronale, la un compus peptidic, precum și la un compus peptidomimetic al peptidei de interferență cu utilizare în medicină în domeniul neurologiei și al psihiatriei. Peptida de interferență, conform invenției, are formula E-G-Y-N-V-Xa1-Xa2-Xa3, în care Xa1 este aminoacidul Y fosforilat sau nefosforilat, Xa2 este un aminoacid care lipsește sau este selectat dintre E, G, iar Xa3 este

aminoacidul D atunci când Xa2 este G. Compusul peptidic, cuprinde peptida de interferență, conform invenției, cuplată cu o secvență de transport. Compusul peptidomimetic, cuprinde peptida de interferență, conform invenției, cu acțiune inhibitorie asupra legăturilor dintre GluA2 și STEP.

Revendicări: 16
Figuri: 16



PEPTIDE DE INTERFERENȚĂ CA INHIBITORI AI INTERACȚIUNILOR LEGATE DE ENDOCITOZA AMPAR

Domeniul invenției

Prezenta invenție se referă la peptide de interferență ca inhibitori ai interacțiunilor legate de endocitoza receptorului AMPA și la compuși peptidici ai unora dintre peptidele respective care pot fi utilizați în medicină, în domeniul neurologiei și a psihiatriei, în particular pentru prevenția și terapia deprecierii cognitive ușoare în bolile neurodegenerative și/ sau în profilaxia depresiei și anxietății.

Stadiul tehnicii

Receptorul acidului α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionic, denumit pe scurt AMPAR sau, denumit alternativ, receptor AMPA este un receptor de glutamat și un canal ionotrop care mediază transmisia sinaptică excitatorie rapidă în sistemul nervos central.

Un număr important de articole de specialitate, între care Whitlock & colab. [1] indică un rol al acestui receptor în memorie și învățare printr-un proces numit potențare pe termen lung denumit pe scurt LTP (long-term potentiation).

Prin potențarea pe termen lung LTP, transmisia semnalului nervos prin sinapsă este mai bună datorită unui număr peste medie de receptori AMPA implicați în proces.

Așa cum se cunoaște de la Guntupalli & colab.[2], și Temkin & colab. [3], mai multe boli precum boala Alzheimer sau boala Parkinson par să implice o capacitate redusă de menținere a LTP în sinapse. Această depreciere este cauzată de retragerea receptorilor AMPA din regiunea post-sinaptică implicată în transmisia semnalului și incluziunea acestora în formațiuni din interiorul neuronului îndepărtate de sinapsă, numite endozomi, printr-un proces numit internalizare.

Cercetări în domeniu, precum cele ale lui Jang & colab. [4], s-au concentrat asupra unei reacții enzimatiche implicate în procesul de internalizare a receptorului: defosforilarea tirozinei 876 din coada citoplasmică a subunității GluA2 a receptorului AMPA de către o fosfatază numită STEP (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase). Această modificare post-tranlațională are un rol important în cascada de reacții care duc la endocitoza receptorului AMPA.

Studiile efectuate de Scholz, R. & colab. [5], au indicat că, într-o etapă ulterioară defosforilării receptorului, în procesul de internalizare, interacțiunea dintre GluA2 și BRAG2 (Brefeldin A-resistant Arf Guanine Nucleotide Exchange Factor 2) joacă de

asemenea un rol important. Având în vedere rolul jocat de receptorii AMPA în memorie (prin LTP), în cercetarea din domeniu s-au făcut eforturi pentru găsirea unor molecule cu potențial terapeutic care să împiedice internalizarea receptorului.

În prezent se cunosc două abordări tehnice pentru inhibiția defosforilării tirozinei 876 din GluA2.

Prima abordare presupune infuzia neuronilor cu fragmente specifice din, sau derivate din GluA2 care interacționează în locul GluA2 cu proteine din cascada de reacții care duc la internalizare, reducând astfel numărul de proteine din cascada de internalizare care ajung să interacționeze cu receptorul, internalizându-l, așa cum se dezvăluie în brevetul EP1687427B1 aparținând titularului The University of British Columbia, acordat în 24.08.2016.

A doua abordare, descrisă de Hou & colab. [6], dar și de Witten & colab. [7] și regăsită în descrierea publicației cererii internaționale de brevet WO 2012/037397A2 din 22.03.2012, presupune caracterizarea structurii tridimensionale a STEP și proiectarea asistată de calculator a unor molecule care inhibă proteaza prin legarea în zone specifice din molecula ei.

Din cererea internațională WO 2012/037397 publicată la data de 22.03.2012, se cunoaște, în plus, că au fost create molecule terapeutice având la bază o secvență peptidică, care este un derivat al STEP și care are capacitatea de a ameliora și trata leziunile cerebrale ca urmare a eliberării excesive de glutamat și/sau a stresului oxidativ, dar care au eficiență și în tratamentul și ameliorarea bolilor asociate cu pierderea memoriei. Autorii revendică o peptidă izolată, care cuprinde anumite domenii ale proteinei STEP, în care cel puțin un sit de fosforilare din aceste domenii este astfel modificat încât să fie împiedicată fosforilarea la acel sit.

Dezavantajele stadiului tehnicii

Moleculele dezvoltate până acum pentru împiedicarea internalizării receptorilor AMPA sunt fie substanțe chimice de sinteză cu potențiale efecte adverse datorate toxicității, fie peptide de interferență a căror eficiență nu a fost încă cuantificată în termeni de tărie a interacției cu care se leagă de fosfataza STEP și proteina BRAG2 sau presupune blocarea unei regiuni din coada citoplasmatică a AMPAR cu un derivat al STEP, ceea ce ar putea interfera negativ cu alte procese esențiale care au loc în aceeași zonă din receptor. În plus, până acum nu au fost raportate cercetări pentru a găsi molecule terapeutice care să vizeze interacțiunea BRAG2-receptor AMPA.

În absența unor secvențe de transport încorporate în molecula peptidei, peptidele

de interferență existente sunt relativ lungi, punând probleme dificile legate de calea și modul de administrare ca medicament.

Problema rezolvată de invenție

Prezenta invenție înlătură dezavantajele expuse în stadiul tehnicii, furnizând peptide de interferență mai scurte, care să împiedice interacțiile receptorilor AMPA cu STEP, dar și a BRAG2 cu receptorii AMPA de la nivelul sinapselor neuronale, fosfataza STEP și proteina BRAG2 intervenind în secvența de reacții care duc la internalizarea receptorului AMPA.

În plus, prezenta invenție furnizează peptide scurte fosforilate, care se pot cupla cu o secvență virală drept secvență de transport, pentru facilitarea penetrării membranei celulare la nivelul sinapselor neuronale.

Un avantaj al invenției constă și în metoda de inhibiție a endocitozei receptorilor AMPA de la nivelul sinapselor neuronale utilizând peptidele de interferență fosforilate conform invenției.

Ca urmare, problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este de a dezvolta peptide mai scurte cu activitate inhibitorie ridicată în cascada de procese biochimice ce duc la endocitoza receptorilor AMPA, având o penetrabilitate crescută la nivelul membranei celulare care determină utilizarea lor ca substanțe active în compuși peptidici cu rol de medicament în terapia afecțiunilor în care internalizarea receptorilor AMPA joacă un rol important.

Termeni utilizați în invenție

Ach – Acetilcolină

AchE –Acetilcolinesterază

AMPA – receptorul acidului α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionic (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)

BRAG2 –Factor de schimb 2 Arf Guanină rezistent la Brefeldina A (Brefeldin-A resistant Arf Guanine Nucleotide Exchange Factor 2)

CNS – sistemul nervos central

DHPG – 3,5-dihidroxi-fenil-glicină

DMSO – dimetilsulfoxid

DTT – ditiotreititol

F2Pmp – 4-(fosfonodifluorometil) fenilalanină

FP - polarizarea fluorescenței

GST - Glutation S Transferază

HEPES – acid 2-[4-(2-hidroxietyl) piperazin-1-il] etan sulfonic
IC50 – jumătate din concentrația maximă inhibitorie
Kd - constanta de disociere
Ka – constanta de asociere
K_i – constanta de inhibiție
LE – eficiența ligandului
LTD – depresie pe termen lung (long-term depression)
LTP – potențare pe termen lung (long-term potentiation)
mAChR – receptorul muscarinic de acetyl colină
mGluR – receptorul metabotropic de glutamat
NMDAR – receptorul N-metil D-aspartat (N-methyl D-aspartate receptor)
PEG - polietilenglicol
PSD – densitatea post-sinaptică
R_{max} – răspunsul maxim al aparatului (Biacore)
RU - unități de răspuns
SDS-PAGE –electroforeză cu dodecil sulfat poliacrilamidă (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SPR - Rezonanța plasmonului de suprafață (surface plasmon resonance)
STEP – protein tirozin fosfataza abundentă în Striatum (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase)
STEP32-GluA2-CT complexul dintre STEP 32 și coada citoplasmatică a GluA2
TAT - peptidă din trans-activatorul de transcripție al virusului imunodeficienței umane (Trans-activator of transcription of the human immunodeficiency virus)
TAM = TAMRA - tetrametil rodamină
A – alanină
C – cisteină
D – acid aspartic
E – acid glutamic
F – fenilalanină
G – glicină
K – lizină
N – asparagină
Q – glutamină
R – arginină
S – serină
T – treonină

V – valină
W – triptofan
Y – tirozină
pY – fosfotirozină

Descrierea pe scurt a invenției

Un obiectiv al acestei invenții este acela de a dezvolta peptide scurte cu șanse crescute de a traversa bariera hematoencefalică, capabile să se lege de fosfataza STEP, formând un compus fosforilat, care apoi, fiind defosforilat prin acțiunea STEP să inhibe formarea complexului dintre proteina BRAG2 și receptorul AMPA, împiedicând astfel endocitoza receptorului AMPA la nivelul sinapselor neuronale.

Pentru aceasta, un prim obiect al prezentei invenții se referă la o peptida de interferență cu formula

E-G-Y-N-V-Xa1-Xa2-Xa3,

având acțiune inhibitorie asupra legăturilor dintre GluA2 și STEP32 și/sau dintre GluA2 și BRAG2 la nivelul sinapselor neuronale, în care:

Xa1 reprezintă aminoacidul Y care este fosforilat sau nefosforilat.

Xa2 reprezintă un aminoacid care lipsește sau care este ales, în mod independent, dintre E și G;

Xa3 reprezintă un aminoacid care lipsește sau care este D

Invenția furnizează o hexapeptidă, o heptapeptidă și o octapeptidă, ca atare sau fosforilate la al doilea rest de tirozină ca urmare a unor modificări post-tranlaționale.

Un al doilea obiect al invenției îl reprezintă un compus peptidic care cuprinde o peptidă de interferență fosforilată, cuplată cu o secvență de aminoacizi numită secvență de transport, pentru penetrarea membranei celulare la nivelul sinapselor neuronale, în vederea utilizării peptidei de interferență conform invenției ca medicament.

Invenția furnizează și un al treilea obiect al invenției, care se referă la compuși peptidomimetici ai peptidelor de interferență fosforilate la al doilea rest de tirozină, în care acest rest este înlocuit cu gruparea 4-(fosfonodifluorometil)-L-fenilalanină (F2Pmp), compușii peptidomimetici menționați având acțiune inhibitorie asupra legăturilor dintre GluA2 și STEP la nivelul sinapselor neuronale.

Este, de asemenea furnizat un al patrulea obiect al invenției, care constă într-o metodă de inhibiție a endocitozei receptorilor AMPA de la nivelul sinapselor utilizând peptidele de interferență fosforilate conform invenției, care cuprinde ca etape succesive: inhibarea formării complexului receptor AMPA-STEP prin legarea STEP de

o peptidă de interferență fosforilată, defosforilarea compusului format în etapa precedentă sub acțiunea STEP și inhibarea de către compusul defosforilat a complexului BRAG2-receptor AMPA, împiedicându-se astfel endocitoza receptorului

Avantajele invenției

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

Peptidele conform invenției sunt mai scurte decât cele existente în stadiul tehnicii, cu o biodisponibilitate mai mare ca a acestora și toxicitate previzibil mai mică decât a inhibitorilor proteazei STEP din stadiul tehnicii.

Peptidele conform invenției au la bază secvențe polipeptidice, ceea ce le conferă șanse mari să prezinte tolerabilitate bună și toxicitate scăzută ca substanțe medicamentoase.

Peptidele conform invenției au o acțiune dublă la nivelul sinapselor neuronale, în sensul împiedicării atât a interacțiunii receptorului AMPA cu fosfataza STEP, cât și a interacțiunii dintre proteina BRAG2 și receptor, împiedicându-se astfel seria de procese biochimice în cascadă care produc internalizarea receptorilor AMPA.

Așa cum o arată experimentele de comportament făcute pe animale, prin utilizarea peptidelor conform invenției în preparate farmaceutice, datorită întârzierii sau împiedicării secvenței de procese biochimice care duc la internalizarea receptorilor AMPA se îmbunătățește memoria de scurtă durată și de lungă durată a pacientului, obținându-se, în plus și efecte antidepresive și anxiolitice ale acestor peptide cuplate cu secvențe de transport adecvate.

Existența multiplelor variante ale peptidelor conform invenției și a compușilor peptidici corespunzători acestora are avantajul de a permite selecționarea pentru utilizare ca medicament a uneia sau alteia dintre respectivele peptide în funcție de factori precum biodisponibilitate, specificitate (minimizarea reacțiilor adverse), timp de înjumătățire, potența medicamentului.

În fine, peptidele conform invenției prezintă o tărie de legare de STEP mai mare decât cea a peptidelor din stadiul tehnicii, așa cum o demonstrează rezultatele din Tabelele 2 și 3.

Prezentarea figurilor

Figura 1 – reprezintă situsul de legare al STEP cu peptida 3Y fosforilată (p3Y)

Figura 1S – reprezintă comparativ structurile cristaline ale STEP;

Figura 2 – reprezintă testul pulldown a GST-GluA2 fosforilat și STEP32 subliniind efectul concurent al 3Y fosforilat (p3Y);

Figura 2S – reprezintă pozițiile precise de legare ale peptidei 3Y fosforilate (A) și nefosforilate (B) la STEP;

Figura 3 – reprezintă structura și secvența peptidei modificate cu TAMRA-3Y-F₂Pmp utilizate în experimentele de polarizare a fluorescenței;

Figura 3S – reprezintă fosforilarea la tirozină a proteinei recombinante GST-GluA2 folosind Src kinază în prezența ATP;

Figura 4 – reprezintă exemple de peptide mai scurte propuse care interacționează cu situsul de legare a fosfatazei STEP;

Figura 4S - reprezintă analiza prin rezonanța plasmonului de suprafață a interacțiunii dintre fosfopeptidele derivate 3Y p3Ysh-2, respectiv, p3Ysh-6 și STEP32 C/S;

Figura 5 – reprezintă analiza prin rezonanța plasmonului de suprafață a interacțiunii dintre fosfopeptidele scurte derivate 3Y și STEP32 C/S, obținute prin injectarea de concentrații crescute de STEP32 pe fosfopeptidele imobilizate;

Figura 5S – reprezintă pozițiile suprapuse de legare a peptidelor EGYNVpY și GYNVpY

Figura 6 – reprezintă curbele datelor obținute prin măsurători de polarizare a fluorescenței pentru studiul inhibiției interacțiunii STEP32 - TAMRA-3Y-F₂Pmp cu peptide p3Y derivate;

Figura 6S – reprezintă pozițiile docate ale analogilor extinși ai EGYNVpY. (A) Peptida EGYNVpYE formează o legătură de hidrogen suplimentară cu cavitatea secundară. (B) Peptida EGYNVpYGD formează o punte salină cu catena laterală a K439, în timp ce păstrează interacțiunea secundară cu Q516.

Figura 7 – reprezintă analiza prin rezonanța plasmonului de suprafață a interacțiunii dintre STEP32 și tirozina fosforilată și peptidele conținând F₂Pmp

Figura 8 – reprezintă efectele administrării peptidei (15 μM) la șobolani tratați în prealabil cu scopolamină (Sco -0,7 mg/kg) asupra numărului de erori de memorie de lucru (de scurtă durată) în labirintul cu brațe radiale.

Figura 9 – reprezintă modul în care administrarea peptidelor (15 μM) a inversat deficitul cauzat de scopolamină (Sco, 0,7 mg/kg) în procentul alternărilor spontane în labirintul Y.

Figura 10 – reprezintă efectele administrării peptidei (15 μM) la șobolani tratați în prealabil cu scopolamină (Sco -0,7 mg/kg) asupra numărului de erori de memorie de referință (de lungă durată) în labirintul cu brațe radiale

Figura 11 – reprezintă efectul antidepresiv al peptidelor (15 μM) asupra

timpului de înot în testul de înot forțat la șobolanii tratați cu scopolamină (0,7 mg/kg)

Figura 12 – reprezintă efectul antidepresiv al peptidelor (15 μ M) asupra timpului de imobilitate în testul de înot forțat la șobolanii tratați cu scopolamină (0,7 mg/kg).

Figura 13 – reprezintă profilul anxiolitic al administrării peptidelor (15 μ M) pentru timpul petrecut în brațele deschise în testul cu labirintul elevat în formă de cruce la șoarecii tratați cu scopolamină (0,7 mg/kg).

Figura 14 – reprezintă profilul anxiolitic al administrării peptidelor (15 μ M) pentru numărul de intrări în brațele deschise în testul cu labirintul elevat în formă de cruce la șoarecii tratați cu scopolamină (0,7 mg/kg).

Figura 15 – reprezintă pozițiile docate de legare ale hexapeptidei, heptapeptidei și octapeptidei nefosforilate în situs-ul propus de legare al BRAG2.

Figura 16 – reprezintă rolul 3Y în desfacerea complexului BRAG2-GluA2

Descrierea detaliată a invenției

Reducerea capacității cognitive este una dintre cele mai debilitante trăsături ale bolilor degenerative. Din ce în ce mai multe dovezi arată că modificările plasticității sinaptice [8] reprezintă caracteristici cheie ale acestor boli. Funcția sinaptică depinde de plasticitatea sinaptică, care stă la baza memoriei și învățării [9]. Modificări pe termen lung ale funcțiilor sinaptice pot fi induse prin activarea receptorilor N-metil-D-aspartat, pe scurt NMDAR sau, denumiți alternativ receptori NDMA care modifică puterea sinaptică prin reglarea numărului de receptori postsinaptici pentru receptorii acidului α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionic, pe scurt AMPAR sau, denumiți alternativ receptori AMPA. Activarea NMDAR conduce la un influx de Ca^{2+} prin canalul ionic al receptorului care poate iniția fie o potențare pe termen lung, denumită pe scurt LTP, fie o depresare pe termen lung, denumită pe scurt LTD, în funcție de profilul spațio-temporal de activare. După cum sugerează un număr crescând de studii comportamentale, capacitățile cognitive și de învățare se pot evalua pe modele animale prin modularea LTP în regiuni specifice ale creierului [10].

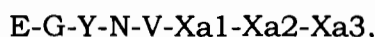
Deoarece plasticitatea sinaptică este guvernată de activitatea AMPAR și NMDAR, eforturile de a controla expresiile LTP și LTD sunt orientate către inhibiția sau activarea acestor doi receptori. Atâta vreme cât NMDAR poate fie promova, fie inhiba LTP, în funcție de tiparul de activare al receptorului, controlul activității sale este insuficient pentru aranjamentele experimentale în care este necesară reglarea expresiei LTP și LTD. Pe de altă parte, controlul activității AMPAR este o abordare mai

directă în ingineria plasticității sinaptice, deoarece un număr crescând de AMPAR, dar nu de NMDAR este caracteristica expresiei LTP [11].

AMPAR sunt canale ionice activate de glutamat care mediază transmisia sinaptică rapidă în sistemul nervos central (CNS). Un număr crescut de AMPAR postsinaptici este eliberat în densitatea sinaptică în timpul LTP [11], pe când LTD provoacă o scădere a numărului de AMPAR grupați la nivelul sinapselor [12]. Traficul AMPAR este un proces complex reglat de numeroase interacțiuni proteice și diferite căi de semnalizare. La stimularea LTP, exocitoza AMPAR și difuziunea acestor receptori de la situsurile de exocitoză către densitatea postsinaptică (PSD) îmbogățește rezerva de receptori AMPA capabili să participe în sinapse [13]. În mod opus, în timpul LTD, AMPAR difuzează față de PSD și se produce endocitoza receptorului [14].

AMPAR constă din patru tipuri de subunități, desemnate GluA1-GluA4. În general acestea se assemblează în structuri heterotetramerice formate prin alăturarea a doi homodimeri. În CA1 din hipocamp, care este probabil cea mai studiată regiune sinaptică, circa 80% din AMPAR constau din ansambluri tetramerice GluA1-GluA1-GluA2-GluA2. Mai mult, acest ansamblu este acela care mediază primar transmisia sinaptică [15]. Cele patru subunități prezintă o omologie ridicată, cu 70% identitate de secvență [16]. Totuși, există deosebiri majore în cozile citosolice ale subunităților, iar aceste diferențe controlează interacțiile proteină-proteină implicate în traficul de receptori. Într-adevăr, majoritatea interactorilor importanți implicați în plasticitatea sinaptică se leagă la capătul C-terminal al GluA2, ceea ce face această subunitate un jucător cheie în expresia LTD [17], [18].

Pentru rezolvarea problemei tehnice, un prim obiect al prezentei invenții se referă la o peptida de interferență cu formula



având acțiune inhibitorie asupra legăturilor dintre GluA2 și STEP32, unde STEP 32 este varianta trunchiată, de 32 kDa a fosfatazei STEP și/sau dintre GluA2 și BRAG2 la nivelul sinapselor neuronale

în care:

Xa1 reprezintă aminoacidul Y care este fosforilat sau nefosforilat.

Xa2 reprezintă un aminoacid care lipsește sau care este ales, în mod independent, dintre E și G;

Xa3 reprezintă un aminoacid care lipsește sau care este D.

Peptidele conform invenției sunt peptide scurte cu șanse crescute de a traversa bariera hematoencefalică, cum ar fi o hexapeptidă, o heptapeptidă sau o octapeptidă. În anumite variante, fiecare dintre peptidele conform invenției suferă o modificare

post translațională fiind fosforilate la al doilea rest de tirozină, după cum urmează:

Într-o variantă a invenției, peptida de interferență este reprezentată de hexapeptida

E-G-Y-N-V-Y

Într-o altă variantă a invenției, peptida de interferență este reprezentată de hexapeptida

E-G-Y-N-V-pY

în care pY reprezintă Y fosforilat

Într-o altă variantă a invenției, peptida de interferență este reprezentată de heptapeptida cu formula

E-G-Y-N-V-Y-E

Într-o altă variantă a invenției, peptida de interferență este reprezentată de heptapeptida cu formula

E-G-Y-N-V-pY-E

în care pY reprezintă Y fosforilat

Într-o altă variantă a invenției, peptida de interferență este reprezentată de octapeptida cu formula

E-G-Y-N-V-Y-G-D

Într-o altă variantă a invenției, peptida de interferență este reprezentată de octapeptida cu formula

E-G-Y-N-V-pY-G-D

în care pY reprezintă Y fosforilat.

Modificările post-translaționale specifice, precum fosforilarea la treonină, serină și tirozină joacă un rol reglator în proces, prin favorizarea sau împiedicarea interacțiunilor dintre capătul carboxilic al receptorului și alte proteine, după cum a fost recențat de Diering & Haganir [17].

În configurații electrofiziologice, plasticitatea sinaptică se poate studia prin inducerea a două tipuri principale de LTD: LTD mGluR-dependent și LTD NMDAR-dependent [10]. Ambele tipuri de LTD depind de modificările postranslaționale distincte ale GluA1 sau GluA2. Câteva studii arată că LTD NMDAR-dependent se poate produce deoarece Y876 din GluA2 este fosforilată [19], [20]. Pe de altă parte, LTD mGluR-dependent (sau mai specific, DHPG-LTD) depinde de defosforilarea aceleiași Y876 situată în regiunea citoplasmatică, C-terminală a GluA2 (GluA2-CT) [21]. În mod interesant, Scholz & colab. [5] au demonstrat că atât mGluR, cât și NMDAR-LTD se bazează pe interacțiunea GluA2-BRAG. Defosforilarea Y876 a fost descoperită ca esențială pentru această interacțiune și, implicit, pentru endocitoza

mediată de clathrină a AMPAR[5]. Acest rezultat important explică de ce GluA2 3Y (YKEGYNVYG), un segment scurt al GluA2-CT, și alte peptide ce interferează, pot desface interacțiile dintre GluA2 și mecanismele de endocitoză [10], [22], [19], [23], [24], [25], [26]. Pe linia acestor descoperiri, defosforilarea GluA2 Y876 de către proteina tirozin fosfataza megakariocitară (PTPMEG) și de către tirozin fosfataza îmbogățită în striat (STEP, PTPN5) au fost găsite ca fiind necesare pentru LTD cerebelar [27] și, respectiv, LTD hipocampic [28]. În plus, fosforilarea Y876 pare să joace un rol în ancorarea sinaptică a AMPAR în PSD. Localizarea receptorului în densitatea sinaptică depinde de proteina de legare a receptorului glutamat (GRIP). Specific, GRIP1 interacționează cu GluA2 stabilizând-o în PSD, doar atâta vreme cât S880 din GluA2 nu este fosforilată [29]. Pe de altă parte, fosforilarea S880 necesită ca Y876 să fie defosforilată, cel puțin în celulele Purkinje și LTD cerebelar [27]. Astfel, localizarea sinaptică a AMPAR este mai ridicată atunci când Y876 este fosforilată.

Defosforilarea Y876 pare să joace un rol critic în inducerea internalizării AMPAR și, implicit, a expresiei LTD. Consecutiv, inhibarea fosforilării Y876 va împiedica endocitoza AMPAR implicit, LTD și poate îmbunătăți abilitățile cognitive. Într-adevăr, s-a raportat că reducerea genetică a fosfatazei STEP pe un model de șoarece AD triplu transgenic a îmbunătățit performanța cognitivă [30] netezind drumul spre o proiectare rațională a medicamentului [7].

Într-o încercare de a descoperi noi inhibitori cu eficiență ridicată ai internalizării AMPAR, se prezintă în continuare detaliat modul de acțiune prin care peptidele conform invenției sunt capabile să împiedice interacțiunea STEP - GluA2-CT, și, în consecință, să împiedice internalizarea receptorilor AMPA.

Hexapeptida, heptapeptida și octapeptida conform variantelor invenției au fost identificate ca inhibitori eficace *in vitro* ai interacțiunii STEP cu GluA2-CT. Experimentele *in vivo* s-au făcut cu hexapeptida și heptapeptida fosforilate și au evidențiat că ambele peptide repară deficitele de memorie și prezintă efecte anxiolitice și antidepresive pe un model de șobolan tratat cu scopolamină. Aceste rezultate, prezentate în cele ce urmează, dovedesc că peptidele de interferență care împiedică interacțiunea proteină-proteină STEP-GluA2 sunt puncte viabile de pornire pentru dezvoltarea unor noi amplificatori cognitivi și/sau modulatori comportamentali cu eficacitate terapeutică.

Modelarea computerizată a interacțiunii dintre situsul activ al STEP și segmentul citoplasmatic al subunității AMPA GluA2

Deoarece problema tehnică a invenției este să furnizeze peptide care să împiedice

interacțiunile receptorilor AMPA cu STEP sau a BRAG2 cu receptorii AMPA care fac parte din secvența de procese care duc la internalizarea receptorului AMPA, o posibilă rezolvare este prezentată mai jos.

Într-o primă etapă are loc împiedicarea interacțiunilor proteină-proteină dintre fosfataza STEP și subunitatea GluA2 a receptorului AMPA, cu ajutorul unei peptide de interferență fosforilate, a unui competitor, prin termenul "competitor" înțelegându-se calitatea unei specii de a desface acest complex. În această etapă, peptida se leagă de STEP în locul AMPAR. În urma interacțiunii cu STEP, peptida de interferență suferă o defosforilare. În urma defosforilării, peptida capătă o formă capabilă să interacționeze cu BRAG2. În ultima etapă, prin legarea peptidei de BRAG2, interacțiunea acesteia din urmă cu AMPAR este împiedicată.

În acest sens, inventatorii au realizat mai întâi un model computerizat al suprafețelor proteinelor care interacționează, din varianta de realizare în care pY este tirozina fosforilată și în care peptidele de interferență acționează asupra legăturilor dintre GluA2 și STEP32. STEP defosforilează GluA2 la Y876 [21], localizată în coada citoplasmatică ce are următoarea secvență:

IEFCYKSRAEAKRMK VAKNAQNINPSSSQNSQNFATYKEGYNVYGIESVKI

Cu litere îngroșate se evidențiază cea mai lungă secvență din domeniul citoplasmatic prezentă într-o structură experimentală a AMPAR (Cod PDB: 5KK2) [31], iar Y din poziția 44 din secvența NVYG este situsul de fosforilare (Y876). Fragmentul subliniat este o peptidă cu lungimea de 11 aminoacizi, numită "peptidă 3Y" sau, simplu "3Y" datorită celor trei resturi de tirozină, care s-a demonstrat că se leagă la BRAG2[5] și a fost utilizată ca un sistem model în invenție.

Deoarece o căutare de proteine BLAST [32], [33] a evidențiat lipsa completă a unei matrițe structurale pentru întregul segment citoplasmatic (în afară de prima parte indicată cu litere îngroșate), inventatorii au aplicat fragmentul subliniat pentru studiile experimentale.

Este demonstrat că STEP defosforilează subunitățile GluN2B și GluA2 [34] ale receptorului pentru glutamat. Defosforilarea conduce la internalizarea receptorilor ionotropici pentru glutamat, care la rândul lor, împiedică întărirea sinaptică.

Structura 3D a STEP a fost rezolvată prin cristalografie cu raze X: în prezent, sunt disponibile public trei structuri:, 2BIJ, 2BV5 [35] și 2CJZ [36]. Din punct de vedere al activității catalitice protein tirozin fosfatazice, unul din cele mai importante fragmente ale proteinei STEP este așa numitul "motiv semnătură",

(I/V)HCXAGXGR(S/T), care conține un rest de arginină (R478) catalitic esențial, și formează o structură de tip cuib rigid care coordonează gruparea fosfat din substrat [35]. Cuibul ce leagă fosfatul (format din resturile înconjurătoare R478) permite formarea mai multor punți saline și legături de hidrogen cu un fragment încărcat negativ, precum gruparea fosfat din substrat, sau dintr-un izoster adecvat. În structura PDB a 2CJZ, mutanta catalitic inactivă C472S a STEP este co-cristalizată cu o fosfotirozină în situsul catalitic, și datorită unei orientări mai bune a argininei catalitice (în comparație cu celelalte structuri, vezi Figura 1S), inventatorii au ales această structură pentru scopuri de modelare [35].

Inventatorii au definit situsul de legare STEP pe baza localizării ligandului fosfotirozină din structura PDB a 2CJZ. Pentru a stabili un cadru de modelare computerizată pentru legarea peptidelor la situsul de legare al STEP, s-au generat ansambluri conformaționale pentru peptida 3Y nefosforilată și fosforilată la Y876 (p3Y) și s-a utilizat modul de docare rigidă din Glide pentru a propune posibile moduri de legare.

Docarea ansamblurilor conformaționale la situsul de legare al STEP a sublinat importanța grupării fosfat pentru recunoașterea ligandului: peptida fosforilată 3Y a produs un aranjament de legare unde sunt prezente toate mecansimele de interacțiune, în timp ce segmentul nefosforilat nu s-a putut potrivi în cavitate (Figura 2S). Aceasta este cu ușurință interpretată prin faptul că principala funcțiune a STEP (și a fosfatazelor, în general) este îndepărtarea grupării fosforil, care necesită, evident, prezența unei astfel de grupări fosforil în substrat. Docarea a evidențiat de asemenea restul Q516 ca un posibil punct de interacțiune pentru ambele peptide.

În plus față de cavitatea de legare a fosfatului, resturile cu sarcină negativă din proximitate (D437, E519) s-au putut utiliza pentru a forma interacțiuni stabilizatoare. Această utilizare semnifică aplicabilitatea unor molecule mici sau peptide amfionice ca inhibitori ai interacțiunilor proteină-proteină (PPI), cu grupările cu sarcini opuse relative apropiate una de alta. Suplimentar, un motiv bogat în fenilalanină din proximitatea Q516 ar putea servi drept un situs de ancorare a unui inel aromatic prin interacțiuni π - π . Caracteristicile situsului de legare sunt ilustrate în Figura 1.

Disocierea de către peptida 3Y a complexului dintre STEP și GluA2-CT

Pentru a investiga interacțiunea dintre conjugatele GluA2 - glutation-S-transferază (GST) și STEP32 inventatorii au ales dintre două alternative:

- prima, să se utilizeze mutanta STEP inactivă și GluA2 fosforilată la Y876 sau,

- a doua, să se utilizeze tipul sălbatic al STEP32 și o variantă de analog al 3Y care nu este hidrolizabilă la fosfotirozină.

Din motive de eficacitate a costurilor, s-a ales prima variantă care este GluA2 tirozin-fosforilată și mutanta catalitic inactivă, STEP32 C/S, în care cisteina din situsul activ al STEP32 a fost schimbată cu serină. Acesta este un mutant capcană, care leagă, dar nu defosforilează substratul său, GluA2. De remarcat, GST-GluA2 trebuie să fie fosforilată (Figura 3S) pentru a interacționa cu STEP32. Agentul competitiv, peptida 3Y, trebuie să fie de asemenea fosforilat.

Pentru a evalua efectul disociativ al p3Y inventatorii au realizat în soluție complexul dintre STEP32 și GST-GluA2-CT (GST-GluA2-P) tirozin fosforilată în prezența a diferite concentrații de p3Y. Apoi, s-a separat complexul nedisociat dintre GST-GluA2-P și STEP, folosind Glutathione-Sepharose. Figura 2 indică faptul că concentrația STEP32 în banda corespunzătoare este cu atât este mai scăzută, cu cât este mai ridicată concentrația de p3Y, reflectând că mai puțin STEP32 a rămas în complexul cu GST-GluA2-P.

Invenția se referă și la compuși peptidomimetici ai peptidelor de interferență fosforilate la al doilea rest de tirozină, în care acest rest este înlocuit cu gruparea 4-(fosfonodifluorometil)-L-fenilalanină (F₂Pmp), compuși peptidomimetici menționați având acțiune inhibitorie asupra legăturilor dintre GluA2 și STEP la nivelul sinapselor neuronale.

Testarea capacității peptidelor 3Y Ala-scan de a disocia complexul dintre STEP32 și o peptidă 3Y-F₂Pmp marcată fluorescent

Pentru a estima contribuția fiecărui rest de aminoacid din secvența peptidică 3Y asupra afinității globale de legare a 3Y, s-a efectuat un experiment Ala-Scan. Cea de-a treia tirozină fosforilată din secvența 3Y nu a fost înlocuită cu alanină, deoarece acest rest de tirozină este indispensabil pentru interacțiunea 3Y cu STEP. Secvențele peptidelor Ala-scan sintetizate sunt raportate în Tabelul 1. Inițial, utilizând determinări de polarizare a fluorescenței, inventatorii au evaluat capacitatea acestor peptide de a disocia, în mod competitiv, complexul dintre domeniul catalitic al STEP (STEP32) și peptida 3Y marcată N-terminal cu fluoroforul TAMRA (TAM-3Y-F₂Pmp) (Figura 3).

Cu cât o peptidă desface cu mai mult succes complexul, cu atât va fi eliberată mai multă 3Y-P marcată cu fluorofor (TAM-3Y-F₂Pmp). Cantitatea de TAM-3Y-F₂Pmp eliberată se corelează cu o creștere a polarizării fluorescenței, care este monitorizată experimental. Capacitatea inhibitorie a fiecărei peptide este reflectată de valoarea

constantei de inhibiție K_i , care a fost calculată conform descrierii din capitolul "Experimente".

Tabelul 1. Rezultatele efectului inhibitor al peptidelor Ala-scan asupra complexului TAM-3Y-F2Pmp - STEP32

Denumire	Secvență	K_i (μ M)
p3Y	ATYKEGYNVpYG	2,82
p3YAla2	AAYPEGYNVpYG	1,62
p3YAla3	ATAKEGYNVpYG	4,81
p3YAla4	ATYAEGYNVpYG	2,53
p3YAla5	ATYKAGYNVpYG	4,14
p3YAla6	ATYKEAYNVpYG	2,31
p3YAla7	ATYKEGANVpYG	4,45
p3YAla8	ATYKEGYAVpYG	2,47
p3YAla9	ATYKEGYNpYG	5,94
p3YAla10	ATYKEGYNVpYA	2,71

Trei peptide, respectiv p3YAla3, p3YAla7, p3YAla9 sunt competitori semnificativ mai slabi decât p3Y. Doi dintre acești competitori au tirozina înlocuită cu alanină și cel de-al treilea are o valină înlocuită cu alanină. Peptida p3YAla5, cu o alanină care substituie un rest de acid glutamic la poziția Y5 prezintă o creștere moderată a constantei de inhibiție.

Aceste rezultate sugerează că aceste poziții particulare, Y3, Y7 și V9, joacă un rol mai important decât ceilalți aminoacizi pentru stabilirea interacțiunii cu STEP32 C/S. În mod remarcabil, substituția în alte poziții, precum T2, K4, G6, N8 și G11 conduce la o pierdere neglijabilă a capacității inhibitorii a peptidei 3Y (și chiar la o îmbunătățire moderată în cazul T2). Acest rezultat sugerează că pozițiile din urmă pot fi substituite în secvența 3Y cu resturile dorite de aminoacid (adică pentru efecte dorite suplimentare), fără a deteriora interacțiunea cu STEP32. Aceste constatări au fost utilizate pentru proiectarea și modelarea bibliotecilor virtuale de peptide pe baza peptidei 3Y.

Generarea de analogi modificați ai p3Y pentru disocierea complexului STEP-GluA2-CT

Următorul obiectiv a fost descoperirea de analogi mai scurți sau modificați ai

peptidei 3Y cu afinitate crescută pentru STEP32. În mod așteptat, peptidele mai scurte au șanse crescute de a traversa bariera hematoencefalică și pentru a introduce răspunsul funcțional dorit. În plus, determinarea farmacoforului peptidic minim necesar pentru legarea la interfața proteină-proteină STEP-GluA2 ar facilita proiectarea de compuși peptidomimetici pe baza unor inhibitori non-peptidici cu moleculă mică.

În acest scop, a fost efectuat un studiu de docare evaluând o serie de peptide scurte derivate de la p3Y original, la situsul de legare al STEP (STEP32). Folosind abordarea de modelare descrisă mai sus, s-a docat un total de 49.528 conformații de analogi mai scurți ai p3Y (Tabelul S1) la situsul de legare al STEP.

Tabelul S1. Secvențele și numărul conformațiilor analogilor modificați p3Y. pY denumește o tirozină fosforilată, iar resturile mutagenizate sunt subliniate.

Secvența	Număr de conformații	Secvența	Număr de conformații
Segmentele mai scurte ale 3Y pentru studiul cuplării cu STEP			
TYKEGYNVpYG	1497	ATYKEGYNVpY	1541
YKEGYNVpYG	3419	TYKEGYNVpY	1949
KEGYNVpYG	1473	YKEGYNVpY	2106
EGYNVpYG	2766	KEGYNVpY	1925
GYNVpYG	3774	EGYNVpY	3293
YNVpYG	2731	GYNVpY	4201
NVpYG	5469	YNVpY	4453
Optimizarea analogilor p3Y pentru cuplarea STEP			
Y <u>N</u> RpY	1778	<u>F</u> GY <u>N</u> DpYG	2734
Y <u>N</u> KpY	2771	<u>E</u> KY <u>N</u> DpYG	850
<u>N</u> TpYG	4783	<u>F</u> KY <u>N</u> DpYG	1867
<u>N</u> S <p>YG</p>	2735	<u>E</u> KY <u>N</u> VpYG	1279
GYNVp <u>Y</u> R	2050	<u>F</u> GYNVpYG	3816
GYNVp <u>Y</u> K	2967	<u>F</u> KYNVpYG	1945
<u>Y</u> VpYG	4226	<u>F</u> TpYG	4995
<u>K</u> VpYG	2240	<u>F</u> S <p>YG</p>	5281
<u>F</u> VpYG	4993	<u>W</u> TpYG	5218
<u>K</u> GYNVpYG	1633	<u>W</u> S <p>YG</p>	5649

<u>K</u> GYDVpYG	1437	<u>Y</u> TpYG	4043
GYDVp <u>Y</u> G	4249	<u>Y</u> SpYG	4622
EGYND <u>p</u> YG	2280		

Segmentele mai scurte au produs adesea conformații de legare cu un scor de legare mai favorabil decât peptida p3Y originală, cu scoruri de docare de până la -8,7 pentru unele dintre ele. Prin comparație, scorul de docare al p3Y a fost -6,4.

În general, segmentele mai scurte (4-6 aminoacizi) domină conformațiile cu cele mai bune scoruri, o excepție notabilă fiind heptapeptida EGYNVpYG (această concluzie se corelează de asemenea cu faptul că au fost generate în general mai multe conformații pentru segmente mai scurte, vezi Tabelul S1). Nu a existat o preferință clară între cele două serii de peptide, adică cu și fără glicina terminal. În continuare, inventatorii au evaluat vizual conformațiile de legare cu cele mai bune scoruri și au selecționat peptidele cele mai promițătoare pentru evaluare în continuare, două exemple fiind prezentate în Figura 4.

În timpul evaluării vizuale, au fost luate în considerare următoarele criterii:

- interacțiunea dintre gruparea fosfat de pe fosfotirozină și cavitatea pentru fosfat al STEP a fost o necesitate absolută.
- orice altă interacțiune cu resturi suplimentare, importante, din situsul de legare (după cum s-a menționat în textul principal) au fost considerate un avantaj. Aceasta include interacțiuni posibile cu Q516, precum și potențialele puncte de interacțiune suplimentare precum cele două catene laterale acide (D437, E519) și resturile aromatice (F280, F281) de lângă cavitatea pentru fosfat. Proximitatea cu aceste resturi și, în general, o complementaritate cu situsul de legare a fost de asemenea considerată avantajoasă.
- dacă o peptidă a fost capabilă se producă mai multe poziții de legare, bine punctate, s-a considerat de asemenea un avantaj. Întrucât au fost diferențe mari ale numerelor brute (ca și în privința numărului de conformații generate) între peptide, s-a calculat o măsură „normalizată” pentru o estimare corectă, care a fost $N_{\leq -7.5} / N_{\text{total}} * 100$, unde $N_{\leq -7.5}$ este numărul de poziții cu un scor de docare de -7.5 sau mai bun, și N_{total} este numărul total de conformații. Tabelul S2 conține aceste valori (alături de numărul de poziții de legare “bună”). Se remarcă faptul că prin aceste rezultate nu se intenționează a ierarhiza peptidele, ci mai degrabă reprezintă un prim filtru pentru peptide care sunt capabile să producă poziții bune de legare.
- pe de altă parte, prea multe „contacte slabe” așa cum s-a indicat pe interfața

Maestro sau structuri prea apropiate și colapsate au fost considerate un dezavantaj.

Tabelul S2. Numărul și procentajul pozițiilor de docare cu un scor mai bun de -7.5 pentru peptidele mai scurte și modificate. pY reprezintă resturi de tirozină fosforilată. Peptidele testate experimental sunt evidențiate cu scriere înclinată.

Peptida	$N_{s-7.5}$	$N_{s-7.5} / N_{total} * 100$
Peptide mai scurte		
<i>NVpYG</i>	463	8,5
<i>YNVpY</i>	239	5,4
<i>GYNVpY</i>	151	3,6
<i>GYNVpYG</i>	128	3,4
<i>YNVpYG</i>	86	3,1
<i>EGYNVpY</i>	53	1,6
<i>EGYNVpYG</i>	14	0,51
Peptide modificate		
<i>NTpYG</i>	451	9,4
<i>NSpYG</i>	247	9,0
<i>FVpYG</i>	355	7,1
<i>YVpYG</i>	282	6,7
<i>GYDVpYG</i>	175	4,1
<i>FGYNDpYG</i>	45	1,6
<i>FGYNVpYG</i>	23	0,60
<i>YNKpY</i>	10	0,36
<i>EGYNDpYG</i>	6	0,26
<i>GYNVpYK</i>	5	0,17
<i>FKYNVpYG</i>	1	0,051

Dintre cele mai promițătoare peptide (pe baza conformațiilor de legare prezise), s-a generat un al doilea grup de peptide modificate. Mai specific, s-au introdus modificări, adică mutații sau adății de aminoacizi în pozițiile în care acestea ar îmbunătăți interacțiunile secundare cu fosfataza STEP. Peptidele modificate, împreună cu numărul de conformeri sunt enumerate în Tabelul S1. După docarea la situsul de legare al STEP, s-au utilizat aceleași criterii pentru evaluarea conformațiilor

de docare, adăugând că peptida a trebuit să producă cel puțin o conformație de legare în care restul interacționează cu situsul de legare STEP, astfel îmbunătățind peptida originală.

Determinarea constantelor de interacțiune ale analogilor p3Y mai scurți cu STEP32 inactiv folosind rezonanța plasmonului de suprafață (SPR) și polarizarea fluorescenței

Fosfopeptidele prezise prin docare moleculară ca având cele mai favorabile conformații de docare cu STEP au fost sintetizate și folosite în studiile experimentale. Secvențele peptidelor testate în studiul cinetic sunt prezentate în Tabelul 2.

Pentru studiile de interacțiune cinetică prin SPR, fiecare dintre fosfopeptidele scurte a fost imobilizată covalent într-o celulă de eluție pe un kit de dextran carboximetilat. Peptidele au fost cuplate N-terminal la un spacer PEG2 ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{COOH}$) pentru a asigura mobilitatea și a permite recunoașterea și legarea acestora de proteina analit STEP32. Gruparea amino a spacer-ului s-a utilizat pentru a realiza legarea covalentă a liganzilor la sensor. În cazul peptidei p3Y originale, folosită drept control pozitiv, nu s-a adăugat spacer-ul PEG, dar a fost imobilizată prin intermediul grupării ϵ -amino din cea de-a patra lizină (K-4) din peptidă. Fiecărei peptide imobilizate i s-au aplicat cel puțin cinci concentrații diferite de STEP32 C/S cuprinse între 100 nM și 500 μM pentru a se obține semnale de interacțiune detectabile.

Numai patru peptide scurte (p3Ysh-1, -2, -3, și -6) au dat răspunsuri de legare pozitive pe sensorgramă. Sensorgramele corespunzătoare peptidelor p3Ysh-1, p3Ysh-3 și peptidei control p3Y sunt redate în Figura 5, în timp ce sensorgramele pentru peptidele p3Ysh-2 și p3Ysh-6 sunt prezentate în Figura 4S.

Sensorgramele s-au obținut prin injectarea de concentrații de STEP-32 crescânde pe fosfopeptida imobilizată. Pentru fiecare concentrație de STEP32, semnalul obținut pe o celulă de curgere de control au fost scăzute din semnalul obținut dintr-o celulă de curgere probă.

Cu referire la Figura 5, sunt prezentate doar sensorgramele pentru trei fosfopeptide, respectiv pentru peptida control pozitivă (p3Y), pentru peptide cu cel mai scăzut semnal de legare (p3Ysh-1) și pentru peptide cu cel mai înalt semnal de legare (p3Ysh-3)

Parametrii cinetici obținuți cu programul BIAevaluation și de modelul de fitare 1:1 Langmuir sunt prezentate în Tabelul S3.

137

Tabelul S3. Rezumatul datelor cinetice ale interacțiunii dintre peptidele derivate 3Y și STEP32 C/S calculate folosind programul BIAEvaluation versiunea 4.1.1. folosind o fitare Langmuir 1:1 cu o deviație a liniei de bază:

Fosfo peptidă	Secvența peptidei	<i>ka</i> (1/Ms)	<i>kd</i> (1/s)	<i>Ka</i> (1/M)	<i>Kd</i> (μM)	<i>Rmax</i> (RU)
p3Y	ATYKEGYN VpYG	2,58E+04	5,99E-03	4,30E+06	2,32E-07	233
p3Ysh-1	PEG2- NVpYG	96,7	2,52E-03	3,84E+04	2,60E-05	103
p3Ysh-2	PEG2- YNVpYG	4,52E+04	0,179	2,53E+05	3,96E-06	2,02E +03
p3Ysh-3	PEG2- EGYNVpY	3,31E+04	1,76E-03	1,88E+07	5,31E-08	55,1
p3Ysh-4	PEG2- NSpYG	-	-	Nicio interacțiune	Nicio interacțiune	-
p3Ysh-5	PEG2- YVpYG	-	-	ND	ND	-
p3Ysh-6	PEG2- FGYNVpYG	1,79E+04	1,10E-01	1,63E+05	6,13E-06	1,39E +03
p3Ysh-7	PEG2- FSpYG	-	-	Nicio interacțiune	Nicio interacțiune	-
3Y- F2Pmp	ATYKEGYN V{F2Pmp}G	2,45E+04	6,56E-03	3,74E+06	2,68E-07	109
3Ysh-3- F2Pmp	EGYNV{F2P mp}	1,99E+04	4,83E-03	4,12E+06	2,42E-07	83
p-fin 4	EGYNVpYE	7,82E+04	6,92E-03	1,13E+07	8,84E-08	73,8

Datele obținute prin SPR indică faptul că hexapeptida p3Ysh-3 se leagă la STEP32 C/S cu cea mai mare afinitate, constanta sa de disociere la echilibru K_d fiind de circa 4 ori mai scăzută decât K_d pentru interacțiunea între p3Y și STEP32 C/S. Alte două peptide, p3Ysh-2 și p3Ysh-6 se leagă de asemenea la mutanta inactivă a STEP32, dar mai puțin eficient, valorile lor K_d sunt de aproape 17- și, respectiv, 6,4-ori mai ridicate față de K_d a peptidei p3Y.

Analiza SPR efectuată de inventatori a evidențiat că fosfopeptida p3Ysh-3 se leagă la STEP32 C/S cu o K_d de 60 nM, care este cea mai înaltă afinitate dintre toate peptidele, sugerând o capacitate ridicată de a împiedica interacțiunea dintre GluA2 și STEP32.

Pentru a estima capacitatea peptidelor scurte de a disocia complexul STEP32 C/S cu TAMRA-3Y-F2PmP s-a utilizat un test de polarizare a fluorescenței (FP). Datele experimentale rezultate au fost reprezentate pe o curbă (polarizare vs concentrația competitorului). Caracteristică pentru aceste curbe este valoarea IC_{50} , concentrația totală de competitor la care se disociază jumătate din complex. Acest factor se utilizează pentru a calcula constanta de inhibiție, K_i pentru fiecare competitor implicat în interacțiune, STEP32 C/S și TAMRA-3Y-F2PmP. K_i este indicatorul capacității competitorului de a disocia complexul. De remarcat că valoarea K_i nu este aceeași cu K_d , care s-a utilizat în secțiunea precedentă pentru a cuantifica tăria interacțiunii directe dintre STEP32 și competitor (peptida scurtă), în absența unui al treilea component (peptida p3Y). S-a efectuat un set de experimente bazate pe FP care au implicat aceleași peptide studiate prin SPR și raportate în secțiunile anterioare, ca mod de a evalua acele date de interacțiune (K_d values). Mai presus de orice, aceste experimente au furnizat informații despre peptidele p3Ysh-4, -5 și -7 pentru care interacțiunea nu a putut fi detectată prin SPR.

Rezultatele prezentate în Figura 6 ilustrează capacitatea celor mai puternici competitori de a desface complexul dintre STEP32 C/S și TAMRA-3Y-F2PmP. Curbele de inhibiție ale celor trei cele mai eficiente fosfopeptide, p3Ysh-3, p-fin4 și p-fin5 și standard 3Y-P(ATYKEGYNVpYG) sunt reprezentate grafic pentru comparație. Cea mai scăzută valoare IC_{50} s-a obținut pentru p fin 4, așa cum se observă din Tabelul 3.

Aceste rezultate sugerează că peptida p3Y sh-3 este cel mai puternic competitor, având o K_i care este mai bună decât sau are cel puțin o capacitate similară cu a p3Y de a disocia complexul STEP-p3Y. În cele din urmă au fost generate două seturi de date, unul folosind SPR și generând K_d (date luate din Tabelul S3), iar al doilea folosind FP și generând valori K_i . Rezultatele sunt sumarizate în Tabelul 2.

Tabelul 2. Tabel comparativ pentru măsurătorile FP și SPR ale peptidelor derivate ale p3Y. Valorile K_i au fost obținute prin măsurători FP, iar valorile K_d sunt obținute prin măsurători SPR

Fosfopeptidă	Secvența peptidei	K_i (μM)	K_d (μM)
p3Ysh-1	PEG2-NVpYG	4,99	26
p3Ysh-2	PEG2-YNVpYG	13,13	3,96
p3Ysh-3	PEG2-EGYNVpY	1,64	0,06
p3Ysh-4	PEG2-NSpYG	13,67	Nicio interacțiune
p3Ysh-5	PEG2-YVpYG	5,34	ND
p3Ysh-6	PEG2-FGYNVpYG	6,96	6,13
p3Ysh-7	PEG2-FSpYG	4,57	Nicio interacțiune
p3Y	ATYKEGYNVpYG	2,36	0,24

Optimizarea avansată a peptidelor analoge p3Y și testarea lor *in vitro*

Conform Tabelului 2, peptidele fosforilate la tirozină p3Ysh-3, precum și p3Y (ATYKEGYNVpYG) s-au comportat cel mai bine în privința capacității lor de a disocia complexe STEP-peptidă. De remarcat că valoarea K_d corespunzând hexapeptidei este de peste două ori mai mică decât aceea a p3Y, semnificând că versiunea mult mai scurtă a p3Y are chiar o capacitate de desfacere mai bună a complexului decât p3Y.

Revenind la termenii eficacității ligandului (LE), [37] prima rundă de optimizare a îmbunătățit LE semnificativ față de punctul de start (LE(p3Y) = 0,38 vs. LE(p3Ysh-3) = 0,64). Ca o parte a eforturilor de a optimiza în continuare eficacitatea ligandului, inventatorii au realizat o a doua rundă de optimizare, bazată direct pe cel mai bun candidat EGYNVpY, testând câteva ipoteze specific propuse în timpul modelării pe computer.

Mai întâi, pe lângă identificarea EGYNVpY drept cel mai bun candidat, rezultatele sugerează de asemenea importanța primului rest de glutamat (E871 în GluA2) din această peptidă, deoarece peptidele în care restul a fost mutagenizat sau omis au prezentat valori deteriorate ale K_i și K_d așa cum se observă din Tabelul 2.

Cu referire la Figura 5S, docarea celor două peptide la situsul de legare al STEP dezvăluie moduri de legare similare cu remarcabila punte salină dintre primul rest glutamat din EGYNVpY și K439 din STEP, sugerată ca o altă interacțiune stabilizantă

pentru complex. Aceast avantaj a fost confirmat prin polarizarea fluorescenței, unde deleția sau chiar o modificare minoră a restului glutamat (la Q sau N) a provocat o deteriorare a constantei de inhibiție, precum și a valorii IC_{50} (Tabelul 3).

În al doilea rând, modul prezis de legare al EGYNVpY dezvăluie că “a doua cavitate”, formată de aminele din catena principală și resturile laterale OH ale radicalilor K305 și T306 (care sunt în general acceptate drept resturi determinante de selectivitate) ar putea fi țintite prin adăugarea unui rest acid adecvat la C-terminalul hexapeptidei. Prin urmare, inventatorii au propus doi astfel de analogi EGYNVpY prin docare și examinare vizuală: EGYNVpYE și EGYNVpYGD, având configurațiile de legare din Figura 6S. Dintre cele două peptide, activitatea inhibitorie a EGYNVpYGD este comparabilă cu EGYNVpY, în timp ce EGYNVpYE prezintă aproximativ o îmbunătățire de două ori față de hexapeptida originală în termeni de constantă de inhibiție (Tabelul 3).

Pe baza Corelării tuturor informațiilor obținute până în prezent, au fost sintetizate cinci fosfopeptide și în continuare testate prin polarizarea fosforescenței (FP) pentru determinarea capacității de a disocia complexul STEP-GluA2. Rezultatele obținute sunt redate în Tabelul 3.

Tabelul 3. Rezultate ale efectului inhibitor al peptidelor finale derivate 3Y asupra complexului TAM-3Y-F2Pmp - STEP32 obținut prin FP.

Denumire	Secvență	K_i (μM)	IC_{50} (μM)
p-fin 1	GYNVpY	1,9	8,01
p-fin 2	DGYNVpY	1,85	7,15
p-fin 3	NGYNVpY	2,16	8,84
p-fin 4	EGYNVpYE	0,36	1,86
p-fin 5	EGYNVpYGD	0,76	3,36
p3Ysh-3	PEG2-EGYNVpY	0,69	2,60

S-au utilizat PEG2-EGYNVpY în locul EGYNVpY ca mod de a corela rezultatele din runda anterioară de experimente (Tabelul 2). În mod evident, fosfo-hexapeptida PEG2-EGYNVpY și fosfo-heptapeptida EGYNVpYE au fost cele mai eficiente pentru disocierea complexelor, confirmând astfel predicțiile prin docare.

Prin urmare, inventatorii au ales în continuare atât hexapeptida, cât și heptapeptida pentru studii *in vivo*, pentru experimentele de comportament pe animale utilizându-se nforma fosforilată a acestor peptide.

Înainte studiilor *in vivo* inventatorii au determinat constanta de inhibiție pentru

interacțiunea fiecărei peptide (p3Y, EGYNVpY și EGYNVpYE) cu STEP32. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelele 2 și 3.

Tabelul 4 și Figura 7 prezintă rezultatele măsurate prin SPR ale tăriei de legare a unora dintre peptidele și peptidomimeticele prezentei invenții de STEP32, tărie reflectată în valoarea constantei de disociere K_d .

Tabelul 4. Comparație între afinitățile de legare ale tirozinei fosforilate și peptidele conținând F2Pmp, determinate prin SPR:

Denumire	Secvență	K_d (μ M)
3Y	ATYKEGYNVYG	nu s-a măsurat
3Y-F2Pmp	ATYKEGYNV{F2Pmp}G	0,27
3Ysh-3-F2Pmp	EGYNV{F2Pmp}	0,24
fin4-F2Pmp	EGYNV{F2Pmp}E	nu s-a măsurat
p-fin 4	EGYNVpYE	0,09

Aceste rezultate demonstrează că tirozina fosforilată sau derivatele fosfonomimetice ale peptidelor 3Y, 3Ysh și fin4 leagă puternic STEP32 având valori K_d în domeniul submicromolar. Concluzia inventatorilor este că aceste peptide desfac în mod eficient complexul STE32-GluA2-CT, prevenind astfel internalizarea AMPAR. Mai mult, peptidele 3Ysh și fin4 se leagă la STEP32 comparabil sau chiar mai puternic decât 3Y (peptida derivată din GluA2-CT).

În particular, respectiva peptidă de interferență se utilizează:

- în prevenția și tratamentul depresiei și anxietății,
- în prevenția și tratamentul afecțiunilor neuro-degenerative, cum ar fi dar nelimitat la, boala Alzheimer sau boala Parkinson,
- în prevenția și tratamentul atât al depresiei și anxietății cât și al afecțiunilor neuro-degenerative, cum ar fi dar nelimitat la boala Alzheimer sau boala Parkinson.

Efectul *in vivo* a peptidelor asupra memoriei pe termen scurt (operativă) și memoriei pe termen lung

Rezultatele de mai sus recomandă toate peptidele conform invenției și în primul rând peptida p-fin4 ca un potențial amplificator cognitiv.

De aceea, un al doilea obiect al invenției îl reprezintă un compus peptidic care cuprinde o peptidă de interferență fosforilată, cuplată cu o secvență de aminoacizi

numită secvență de transport, pentru penetrarea membranei celulare la nivelul sinapselor neuronale.

Într-un exemplu de realizare a fost aleasă ca secvență de transport secvența virală de aminoacizi GRKKRRQRRRPQ denumită generic Tat.

Respectivul compus peptidic conform invenției se utilizează ca medicament.

În particular, respectivul compus peptidic se utilizează:

- în prevenția și tratamentul depresiei și anxietății,
- în prevenția și tratamentul afecțiunilor neuro-degenerative, cum ar fi dar nelimitat la, boala Alzheimer sau boala Parkinson,
- în prevenția și tratamentul atât al depresiei și anxietății cât și al afecțiunilor neuro-degenerative, cum ar fi dar nelimitat la boala Alzheimer sau boala Parkinson.

În compusul peptidic mai sus-menționat, peptida de interferență este fie EGYNVpY, fie EGYNVpYE.

Pentru a confirma potențialul amplificator cognitiv al compusului peptidic care cuprinde o peptidă de interferență fosforilată conform invenției, cuplată cu o secvență Tat, s-au efectuat teste de memorie utilizând un model de deteriorare cognitivă indusă la șobolani de către scopolamină.

Scopolamina se utilizează frecvent pentru a studia diverse forme de demență, deoarece poate induce deficite de memorie și cognitive. Numeroase studii neurocomportamentale au demonstrat că scopolamina poate deteriora diferite forme de memorie (în particular memoria pe termen scurt) și învățarea, atât la om cât și la rozătoare [38]. Este demonstrat că administrarea cronică de scopolamină la șobolani reduce performanțele în sarcini din labirintul radial ce implică memoria operativă [39]. Astfel, inventatorii au evaluat efectele peptidelor 3Y, p3Y, p3Ysh-3 și p-fin4, atât asupra memoriei pe termen scurt cât și a memoriei pe termen lung, pe un model de șobolan indus cu scopolamină, folosind un labirint radial cu opt brațe și un labirint Y. Toate peptidele testate, adică 3Y, p3Y, p3Ysh-3 și p-fin4, au fost fuzionate N terminal cu secvența TAT de penetrare a celulei.

Efectele asupra memoriei pe termen scurt (memorie operativă)

Injecția cu scopolamină a crescut semnificativ numărul de erori de memorie operativă (Figura 8), prin comparație cu grupul control ($p < 0,0001$), sugerând un profil de deteriorare a memoriei. Toate administrările de peptide, dar în special de (TAT-)p3Y, (TAT-)p3Y-sh3, și (TAT-)p-fin 4, au prezentat o reducere semnificativă a numărului de erori de memorie operativă crescute de scopolamină, prin comparație

cu șobolanii tratați doar cu scopolamină ($p < 0,0001$).

Injectarea de scopolamină a redus semnificativ performanțele memoriei pe termen scurt în testul din labirintul-Y, după cum se evidențiază prin reducerea semnificativă a procentului de alterări spontane prin comparație cu lotul control ($p < 0,0001$). Administrarea de peptide, în special de (TAT-)3Y, a ameliorat semnificativ procentul de alternare spontană ($p < 0,0001$) redus de scopolamină, prin comparație cu șobolanii tratați numai cu scopolamină (Figura 9). Peptidele testate ((TAT-)3Y, (TAT-)p3Y, (TAT-)p3Y-sh3 și (TAT-)p-fin 4) au contracarat cu succes efectul scopolaminei asupra memoriei operaționale în testele în labirintul Y și labirintul cu opt brațe. Rezultatul este consecvent cu o serie de factori. În primul rând, administrarea de scopolamină are ca rezultat o expresie scăzută a GluA2 [40],[41]. O scădere a expresiei GluA2 conduce la o deficiență a memoriei operaționale [42]. Pe de altă parte, trebuie reținut că desfacerea interacțiunii STEP-GluA2-CT inhibă internalizarea AMPAR și în consecință reduce expresia LTD. Într-adevăr, șoarecii lipsiți de STEP61 manifestă o memorie hipocampică crescută în testul din labirintul cu apă Morris și într-un labirint cu apă cu brațe radiale [43]. Corelarea acestor fapte sugerează că performanța îmbunătățită a memoriei operaționale observată în testele din labirintul Y și labirintul radial cu opt brațe se datorează inhibiției interacțiunii GluA2-STEP61 prin intermediul peptidelor interferente și salvării receptorului de la internalizare.

Efectele asupra memoriei pe termen lung (memorie de referință)

Injectarea de scopolamină a crescut semnificativ numărul erorilor memoriei de referință (Figura 10) prin comparație cu grupul control ($p < 0,001$), sugerând un profil de afectare a memoriei de referință.

Administrarea de peptide, dar în special de (TAT-)3Y sh3 și (TAT-)p-fin 4, a prezentat o reducere semnificativă a numărului de erori ale memoriei de referință crescute de scopolamină, comparativ cu șobolanii tratați doar cu scopolamină ($p < 0,0001$).

Efectul *in vivo* al peptidelor asupra depresiei și anxietății

Pentru a examina posibilele efecte de tip andidepresiv ale peptidelor, s-a folosit testul de înot forțat (FST) și testul labirintului elevat în formă de cruce (EPMT) pe șobolani.

Testul înotului forțat

După cum se prezintă în Figura 11, animalele tratate cu scopolamină au prezentat o scădere semnificativă a timpului de înot față de lotul control ($p < 0,01$). În continuare,

la tratamentul cu compușii peptidici conform invenției, animalele tratate cu scopolamină au prezentat un timp de înot substanțial crescut comparativ cu grupul control ($p < 0,0001$), sugerând că toate cele patru peptide au un efect de tip antidepresiv.

De asemenea, așa cum se prezintă în Figura 12, șobolanii tratați cu scopolamină au prezentat niveluri crescute ale timpilor de imobilitate comparativ cu lotul control ($p < 0,001$), indicând niveluri ridicate de depresie. Administrarea peptidelor a redus semnificativ timpul de imobilitate ($p < 0,001$), în special (TAT-)p3Y, sugerând din nou o activitate de tip antidepresiv.

Testul labirintului elevat în formă de cruce

După cum se observă în Figura 13, procentul de timp petrecut de animalele tratate cu scopolamină în brațele deschise a fost semnificativ redus prin comparație cu lotul control ($p < 0,0001$). Reducerea timpului petrecut în brațele deschise sugerează nivelurile ridicate de anxietate la șobolanii tratați cu scopolamină. Prin contrast, toate loturile tratate cu peptide, dar în special (TAT-)p3Y-sh3 și (TAT-)p-fin4, au prezentat un procent ridicat al timpului în brațele deschise prin comparație cu a șobolanilor tratați doar cu scopolamină ($p < 0,0001$), indicând un profil anxiolitic.

Așa cum se observă în Figura 14, numărul de intrări în brațele deschise realizat de animalele tratate cu scopolamină a fost semnificativ redus comparativ cu lotul control ($p < 0,0001$). Reducerea numărului de intrări în brațele deschise sugerează nivele ridicate de anxietate la șobolanii tratați cu scopolamină. Pe lângă aceasta, toate peptidele, dar în special (TAT-)p3Y-sh3 și (TAT-)p-fin4, au prezentat un număr ridicat de intrări în brațele deschise comparativ cu animalele tratate doar cu scopolamină, ($p < 0,001$), indicând clar un efect anxiolitic.

Inducerea cu scopolamină a anxietății la șobolani, în experimente de tipul labirint elevat în formă de cruce au fost de mult raportate [44]. Un mecanism prin care scopolamina blochează semnalizarea colinergică, atât direct, ca antagonist al receptorului muscarinic de acetilcolină mAChR, cât și indirect, prin stimularea ACh esterazei (AChE) este considerat responsabil pentru efectul observat [45]·[46]. Stresul acut s-a demonstrat că mărește nivelele Ach din hipocamp [47] și pare să implice hiperexcitabilitatea sistemului cholinergic și chiar să provoace LTP în anumite regiuni din hipocamp [48]·[49]·[50]. Pe de altă parte, LTD hipocampic suprimă dezvoltarea comportamentelor anxioase ca răspuns la stres [51]. Conform acestui mecanism, inhibiția LTD prin injectarea de peptide 3Y ar trebui să amplifice comportamentul de tip anxios. Într-adevăr, confirmând că expresia sinaptică a AMPA stimulează anxietatea, șoarecii injectați cu 3Y au petrecut mai multă vreme imobili într-un

experiment de conflict social, manifestând o latență crescută în abordarea recompensei cu hrană, anterior învățată, atunci când li s-a oferit un mediu nou [51].

În contrast cu efectele raportate mai sus în stadiul tehnicii, experimentele inventatorilor pe șobolani în labirintul elevat în formă de cruce indică un efect anxiolitic la animalele injectate cu peptide care blochează endocitoza AMPAR.

Evaluarea peptidelor optimizate în interacțiunea cu BRAG2

Docarea versiunilor nefosforilate ale celor mai importante trei peptide scurte (EGYNVY, EGYNVYGD și EGYNVYE) la situsul propus de legare al BRAG2 (similar cu metodologia descrisă în Experimentul 9 a scos la iveală moduri favorabile de legare, care prezintă interacțiuni secundare cu cele mai importante resturi interactive mai sus-identificate pentru BRAG2, anume șanțul de legare al tirozinei (tyrosine binding subpocket) și cele două șanțuri din spatele situsului de legare. Cu referire la Figura 15, sunt observate interacțiuni ionice suplimentare între catenele laterale încărcate negativ R402, R444 și R630 ale BRAG2.

Aceste rezultate susțin calitatea de inhibitor dual al respectivelor fosfopeptide - EGYNVpY, EGYNVpYE, EGYNVpYGD: (i) țintirea fosfatazei STEP în forma fosforilată și (ii) după defosforilarea de către STEP, țintirea BRAG2 în forma defosforilată a peptidelor.

Exemple de preparare

Prezenta invenție, așa cum a fost descrisă mai sus, va fi mai ușor de înțeles prin referire la următoarele exemple de preparare, și teste pe animale, care furnizează o cale de ilustrare a acesteia, fără intenția de a o limita.

Experimentele de mai jos nu sunt singurele experimente efectuate de către inventatori, aceștia rezervându-și dreptul de a le completa în condițiile legii.

Toate procedurile privind testarea pe animale s-au conformat Reglementarilor Europene privind protecția animalelor folosite în scopuri științifice (Directiva 2010/63/EU).

Exemplul 1 - Expresia și purificarea GST-GluA2

Plasmida pGEX-6P1-GST-GluA2 conținând regiunea C-terminală a GluA2 uman (aa. 834-883 din receptorul AMPA) fuzionată N-terminal cu o etichetă GST a fost transformată în tulpina de *E. coli* BL21. Expresia proteinei a fost indusă cu 1mM IPTG timp de 3 ore la 37 °C. Celulele bacteriene s-au resuspendat în PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM pH = 7,34) cu 0,1% NP-40,

1 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF și lizate folosind o presă French (Thermo). Lizatul s-a clarificat prin centrifugare timp de 30 min la 40000xg, 4°C. Supernatantul rezultat s-a încărcat pe o coloană GStrap FF de 5ml (GE Healthcare) și eluat cu 0–20 mM glutation redus (GSH). Purificarea s-a efectuat folosind un sistem FPLC AEKTA (GE Healthcare). Frațiile colectate s-au analizat prin SDS-PAGE. Frațiile colectate s-au dializat față de un tampon conținând 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT 1 mM, pH=7,5. În final, proteina purificată s-a depozitat în alicoji mici la -80°C.

Exemplul 2 - Expresia și purificarea STEP32

Pentru expresia STEP32 WT și a mutantei pLIC-SGC1-PTPN5 WT nr. de acces 39166, Addgene) care reține substratul C/S, respectiv pLIC-SGC1-PTPN5 C496S (nr. de acces 38887, Addgene) au fost transformate în tulpina bacteriană *E. coli* BL21(DE3) construite conținând domeniul catalitic al protein tirozin fosfatazei STEP/PTPN5 (aa. 282–563) fuzionată N-terminal cu un 6XHis-tag. Expresia proteinelor s-a indus cu 1 mM IPTG peste noapte (~16 h), la 18°C. Precipitatul rezultat a fost resuspendat în tampon de liză (50mM HEPES, pH 7,5, 10mM imidazol, 500mM NaCl, 5mM β-mercaptoetanol, 0,5mg/mL lizozim, tablete de inhibitor de proteaze UltraCruz conform specificației producătorului) și lizate folosind o presă French (Thermo). Lizatul s-a clarificat prin centrifugare la 40000xg și 4°C timp de 30 min, s-a filtrat pe un filtru membrană de 0,22 μm și s-a aplicat pe o coloană HisTrap HP Ni-Sepharose de 5 mL. Eluția s-a realizat folosind un tampon de eluție (50 mM HEPES, pH 7,5, 250 mM imidazol, 500 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol) în gradient cu 0 la 100 %, timp de 25 min, la un debit de 2 ml/min. Frațiile s-au colectat și evaluat prin SDS-PAGE. Frațiile colectate s-au dializat față de un tampon conținând 50 mM HEPES, pH 7,4, 500 mM NaCl, 1mM DTT. În final, proteinele purificate s-au repartizat în alicoji mici și depozitat la -80°C cu 10% glicerol.

Exemplul 3 - Proiectarea peptidelor

Peptidele folosite în acest studiu au fost sintetizate cu GenScript Biotech (USA) și Biomatik (USA). „Peptidele Ala-scan” s-au obținut prin înlocuirea fiecărui aminoacid din secvența peptide 3Y (exceptând pY876 esențial) cu o alanină. Apoi, a fost generată o bibliotecă virtuală de peptide printr-un studiu de docare al analogilor GluA2-CT la situsul de legare al structurii PDB a STEP (2CJZ) și șapte peptide cu cele mai favorabile scoruri de docare, numite „peptide scurte derivate 3Y” au fost selectate pentru noi experimente de legare. Peptidele scurte derivate 3Y s-au sintetizat astfel

încât să conțină N-terminal un spacer PEG2 ($H_2N-CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2COOH$) pentru a asigura flexibilitatea și accesibilitatea la domeniul catalitic al STEP. Pentru studiul compușilor peptidomimetici, peptida p3Y, ATYKEGYNVpYG și hexapeptida p3Ysh-3, EGYNVpY, au fost modificate astfel încât fosfotirozina esențială Y876 a fost înlocuită cu fosfonodifluormetil fenilalanină (F2Pmp), o fosfotirozină mimetică nehidrolizabilă. Peptidele 3Y, p3Y, p3Ysh-3 și p-fin4 (EGYNVpYE) folosite în studii comportamentale au fost fuzionate N-terminal cu secvența TAT al cărei rol este de a depăși bariera lipofilă a membranelor celulare.

Exemplul 4 - Fosforilarea la tirozină a GST-GluA2

GST-GluA2 purificată a fost supusă fosforilării *in vitro* în prezența proteinei Src active (14-326, Merck) și ATP, timp de 1h la 25°C. Toate reacțiile s-au preparat în tampon de testare a kinazelor (20 mM MES pH 6,5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT). O reacție conținând GST-GluA2, dar fără Src kinază s-a preparat drept control negativ. Tirozin fosforilarea GST-GluA2 a fost controlată prin western-blot folosind anticorp anti-pTyr (PY99) HRP (sc-7020 HRP, Santa Cruz Biotechnology). Apoi, membranele au fost retestate cu anticorpi anti-GST (G7781, Sigma-Aldrich).

Exemplul 5 - Pulldown GST-GluA2 - STEP32

Probele conținând tirozinele fosforilate GST-GluA2 și STEP32 sunt cuplate la perle de Glutathione Sepharose. Înainte de legare, perlele au fost spălate minuțios cu tampon de interacțiune (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, pH = 7,5). S-a utilizat Triton X-100 pentru a evita legarea nespecifică și a minimiza riscul de avea oricare dintre proteine precipitate. Ulterior, 3Y fosforilată s-a adăugat la probe folosind mai multe concentrații (1000 μM, 100 μM, 10 μM, 1 μM). Speciile legate la perle au fost apoi analizate prin SDS-PAGE, cu un gradient de gel 4-12%.

Exemplul 6 - Imobilizarea GST-GluA2 și peptidelor pe cipuri senzori

Experimentele de rezonanță a plasmonului de suprafață (SPR) s-au realizat folosind un instrument Biacore 3000 (GE Healthcare) echipat cu cipuri senzori CMD500L (XanTec Bioanalytics GmbH).

Înainte de imobilizarea peptidelor, suprafața cipului senzori a fost condiționată prin injectarea unei soluții constând din 10 mM tetraborat de sodiu, 1M NaCl, pH 9,0, timp de 3 min la un debit de 20 μl/min. Apoi, suprafața senzoriului a fost activată prin injectarea unui amestec 1:1 de soluție 50 mM NHS (N-hidroxisuccinimidă) și 200

mM EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimidă clorhidrat) din Amine Coupling Kit (GE Healthcare), timp de 15 min, la un debit de 5 μ l/min. Peptidele p3Ysh-1, -3, -4, -5, -7, p3Y, p3Y-F2Pmp, 3Ysh-3-F2Pmp și p-fin 4 au fost dizolvate în 10 mM acetat de sodiu pH 4,0 la 4-5 mg/ml. Cele două peptide rămase, (p3Y-2 și -6) au fost întâi dizolvate în soluție de amoniac 1% și apoi diluate în 10 mM acetat de sodiu pH 4,0 la 4-5 mg/ml. Apoi, fiecare din peptidele diluate a fost injectată pe suprafața activată a unei celule de curgere, la un debit de 3-5 μ l/min până când răspunsul a fost cuprins între 600 -1000 RU. Prima celulă de curgere a fiecărui cip senzor a fost păstrată fără imobilizare de peptide ca referință pentru scăderea fondului. Pentru majoritatea cazurilor, pentru a obține un răspuns de imobilizare optim, a fost necesar să se efectueze injecții succesive de peptidă cu concentrație ridicată. Dezactivarea situsurilor de legare neocupate de pe senzor s-a efectuat prin injectarea unei soluții de 1M etanolamină-HCl, pH 8,5, timp de 13 min la debit de 3 μ l/min. Toate etapele imobilizării covalente s-au realizat la 25°C, cu apă deionizată Milli-Q degazată drept tampon de lucru. După dezactivarea suprafeței cu etanolamină, nivelul de imobilizare al fiecărei fosfopeptide a fost estimat din sensorgrame și rezultatele, în termeni de unități de răspuns (RU) sunt prezentate în Tabelul 2.

Exemplul 7 - Măsurarea cineticii de legare prin SPR

Pentru experimentele de interacțiune, peptidele imobilizate s-au folosit ca liganzi, în timp ce mutanta inactivă C/S a enzimei STEP32 (puritate > 90 %) s-a folosit ca analit. Pentru fiecare experiment cinetic, s-au folosit cel puțin cinci concentrații diferite de proteină, cuprinse între 100 nM și 500 μ M. Concentrațiile STEP32 C/S s-au estimat folosind reactivul Pierce 660nm Protein Assay (Thermo) și un cititor de microplăci. În fiecare experiment cinetic s-au injectat 50 μ l de STEP32 la un debit de 10 μ l/min folosind comanda KINJECT. Timpul de asociere și disociere s-a setat la 5 min. După fiecare test de interacțiune, s-au realizat 2-4 cicluri de regenerare prin injectarea de 1M NaCl în tampon HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% v/v Surfactant P20) timp de 2 min, la un debit de 20 μ l/min. Tamponul HBS-EP s-a folosit ca tampon de lucru. Toate măsurătorile s-au realizat la 25°C. Datele obținute au fost prelucrate cu programul BIAevaluation 3.1 folosind un model de fitare 1:1 Langmuir cu linie de bază deviantă (folosind modulul „Kinetics Simultaneous Kd/Ka”). Semnalele nespecifice au fost eliminate prin scăderea semnalelor din zona de referință.

Exemplul 8 - Polarizarea fluorescenței

O peptidă fluorescentă cuplată cu 5-carboxitetrametilrodamină (TAMRA) s-a utilizat pentru a măsura polarizarea fluorescenței. Fosfonodifluormetil alanina s-a utilizat în locul unei tirozine. Peptida a fost denumită TAMRA-3Y-F₂Pmp (vezi Figura 4) și a fost comandată de la Biomatik (USA). TAMRA-3Y-F₂Pmp s-a dizolvat în DMSO pentru a da o soluție de 1 μg/μl. Concentrațiile STEP32 C/S și TAMRA-3Y-F₂Pmp utilizate au fost de 1000 nM și, respectiv, 200 nM. Concentrațiile inhibitorului au fost în intervalul: 0 – 3 mM. Polarizarea fluorescenței a fost studiată pe un cititor de microplăci Molecular Devices SpectraMax Paradigm cu un cartuș de polarizare a fluorescenței de tip A41582, cu excitația și emisia perstabilite la 535 nm și, respectiv, 595 nm. Pentru toate experimentele s-a utilizat un tampon 50 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH = 7,4. Amestecurile de interacțiune au fost echilibrate la 4°C timp de 30 min. Plăcile s-au centrifugat la 1500 rpm timp de 10 min. S-au utilizat plăci de fluorescență Black NBS 384-well (Corning Cat. No. 3821) și Black NBS 96-well, volum mic, fund plat (Thermo Cat. No. 237105). S-au determinat constantele de disociere K_d și constantele de inhibiție K_i pentru peptidele inhibitoare [52].

Exemplul 9 - Modelarea moleculară

Pentru prepararea structurilor proteinelor, a fost folosit programul Schrödinger's Protein Preparation Wizard. Etapele de pregătire au implicat atribuirea ordinii legăturilor și hidrogenilor, modelarea buclelor lipsă și catenelor laterale, generarea stărilor protonate la un pH de 7,4, optimizarea geometriei legăturilor de H și rularea unei minimizări moderate a structurilor[53], [54]. Ansamblurile conformaționale ale peptidelor au fost generate printr-o căutare conformațională cu un amestec de eșantionare torsională și de mod scăzut cu Macromodel, cu o fereastră de energie de 50 kJ/mol și o valoare cut-off pentru devierea maximă a atomilor de 0,5 Å (pentru a elimina structurile redundante)[55]. Ansamblurile conformaționale au fost docate pe suprafața de legare a STEP (structura PDB: 2CJZ[35]) cu modul de docare rigid al Glide.[56], [57] Grupărilor laterale OH și SH din jurul situsului de legare li s-a permis rotația (specific: S397, Y406, S598, C633, Y634, C635, Y678 și S738). Imaginile incluse în manuscris au fost preparate cu PyMol[58] și Maestro.[59]

Exemplul 10 – Desfacerea complexului BRAG2-GluA2 cu ajutorul peptidei 3Y (ATYKEGYNVYG)

Probe conținând GST-GluA2 (150 μg) și BRAG2 (60 μg) s-au leagat de perle de glutatation Sepharose (20 μl). Înainte de legare, perlele s-au spălat bine cu soluție

tampon de interacțiune (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, pH = 7,5). Triton X-100 s-au folosit pentru a evita legările nespecifice și pentru minimizarea riscului de precipitare a proteinelor. Într-un pas ulterior, 3Y s-a adăugat în probe sub diferite concentrații (1000 μM, 100 μM, 10 μM, 1 μM, 0,1 μM). S-a obținut o soluție de 2,5 mM (PBS 0,1 M pH = 7,4). După incubarea probelor timp de 90 de minute la 4 °C sub agitare, perlele s-au spălat cu o soluție tampon conținând mai puțin Triton X-100 (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 1 mM DTT, pH = 7,5). Specile rămase prinse de perle au fost analizate prin SDS-PAGE (Figura 16). Aceste rezultate arată clar că 3Y (în domeniul de concentrații 10 μM – 1 mM) desface cu succes complexul BRAG2-GluA2.

Teste farmacologice

Pregătirea animalelor și administrarea medicamentelor

La începutul experimentului, au fost selecționați 30 de șobolani, masculi, adulți, cu greutatea medie de 350 g (\pm 10g) și în vârstă de 4 luni (Institutul Cantacuzino, România). Animalele au fost găzduite în biobază, în condiții de lumină controlată (un ciclu de 12-h pornind de la 07:00 h) și temperatură (22°C). S-au asigurat hrană și apă *ad libitum* pe durata experimentului. Șobolanii au fost distribuiți aleatoriu în 6 loturi (n=5 animale/lot) după cum urmează: lot control (netratat), lotul scopolamină (Sco) (netratați, Sco: 0,7 mg/kg b.w., i.p., Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), și loturile tratate cu TAT-p3Y, TAT-3Y, TAT-p3Ysh3, și TAT-pfin4 (15μM, GenScript) care au primit Sco. Dozele de peptide au fost alese în conformitate cu un raport anterior [60]. S-a administrat bromhidrat de scopolamină (Sco, 0.7 mg/kg) cu 30 min înainte de abordarea studiilor comportamentale *in vivo*. De asemenea, confirmăm că valoarea de 5 animale/lot este adecvată folosind InVivoStat, și programul R-based statistical package[61]. Pe baza unui nivel de semnificație de 0,05, puterea de a detecta o modificare biologic semnificativă este 93 %.

Procedura de injectare a peptidelor

Toate procedeele chirurgicale au fost realizate în condiții aseptice, sub anestezie cu fenobarbital (50 mg/kg b.w., i.p., Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Șobolanii au fost instalați în aparatul stereotactic cu nasul orientat la 11° sub planul orizontal. Două canule de ghidare de plastic (Portex, 0,9 mm diametru exterior) au fost implantate bilateral stereotaxic în hipocampus dorsal urmând coordonatele: A/P=3,6 mm, M/L=3,1 mm și D/V=2,4 mm. Canulele au fost poziționate cu ciment dentar (Adhesor, SpofaDental) și asigurate cu trei șuruburi de oțel inoxidabil implantate în

craniu. După intervenția chirurgicală, șobolanii au fost izolați în cuști separate și au fost protejați cu un antibiotic cu spectru larg. Animalele au fost lăsate să se recupereze după intervenție două săptămâni și au fost manevrate zilnic în acest interval.

Peptidele, precum TAT-p3Y și TAT-3Y, au fost dizolvate în dimetilsulfoxid (DMSO) împreună cu TAT-p3Ysh3 și TAT-pfin4 care au fost dizolvate în soluție salină și s-au injectat bilateral în hipocampusul dorsal la un debit de 0,25 $\mu\text{L}/\text{min}$ timp de 4 min, cu o seringă Hamilton (5 μL). Concentrația peptidelor a fost 15 μM , și volumul injecției de 1 μL . Înainte de a fi retrasă, seringă a fost lăsată în loc pentru alte 90 min pentru a minimiza tragerea soluției injectate. Șobolanii netratați au fost injectați cu soluție salină. Poziționarea canulelor în creier a fost verificată prin injectarea de colorant (albastru tripan) prin fiecare canulă la sfârșitul experimentului.

Teste comportamentale

Testul labirintului Y

Tulburarea spontană de comportament s-a evaluat într-o unică sesiune în labirintul Y, cum a fost descris anterior de Jackson [62] Postu & colab. [63].

În studiul de față, labirintul Y folosit a fost construit din Plexiglas având următoarele dimensiuni: 25 cm înălțime, 35 cm lungime, 10 cm lățimea fiecărui braț și o zonă centrală de forma unui triunghi echilateral. Fiecare șobolan a fost poziționat la capătul unui braț și i s-a dat posibilitatea de a se mișca timp de 8 min. Procentul de alternări involuntare a fost determinat conform formulei:

$$(\text{număr de alternări/intrări totale} - 2) \times 100$$

Testul labirintului cu brațe radiale

Așa cum s-a descris anterior de către Olton și Samuelson [64] și Postu et al. [63], cu ajutorul testului labirintului cu brațe radiale (RAM), a fost evaluată memoria spațială timp de o săptămână.

Labirintul, care conține opt brațe marcate de la 1 la 8 (48 cm x 12 cm), cu o extensie radială cu diametrul de 32 cm din zona centrală, a avut 50 mg de pelete hrană la extremitatea brațelor 1, 2, 4, 5 și 7. Au fost efectuate 4 zile de sesiuni de adaptare. Șobolanii au fost învățați să se miște la extremitatea brațelor și să mănânce momeala în sesiuni de câte 5 min. După adaptare, tuturor șobolanilor li s-a acordat un singur test pe zi. Pentru sarcinile de memorie de lucru și de referință, fiecare șobolan a fost individual plasat în centrul labirintului. Determinările s-au efectuat prin estimarea (i) numărului de erori de memorie operațională (pătrunderea într-un braț ce conține

hrană, dar în care a pășit mai devreme) și (ii) calcularea numărului de erori de memorie de referință (calculând intrările animalului într-un braț ce nu conține hrană).

Testul labirintului elevat în formă de cruce

Comportamentul în testul labirintului elevat în formă de cruce (E.P.M.) se utilizează pentru a evalua comportamentul de explorare, anxietate și motric.

Fiecare șobolan este plasat în centrul labirintului cu fața spre un braț închis. Comportamentul a fost observat timp de 5 min, și s-au măsurat timpul petrecut și numărul de intrări în brațele deschise[65]. S-au calculat procentele de timp petrecut în brațele deschise:

$$(\text{timp petrecut în brațe deschise} / \text{timp petrecut în toate brațele}) \times 100$$

Testul înotului forțat

Testul înotului forțat (F.S.T.) se folosește pentru estimarea răspunsurilor de tip depresiv[66].

Răspunsul de tip depresiv a fost evaluat, în principiu, folosind aceeași metodă precum cea descrisă de Campos et al. [67], dar cu modificări. În prima zi a experimentelor (sesiunea pre-test), șobolanii au fost plasați în recipiente cilindrice (diametru 30 cm, înălțime 59 cm) conținând 25 cm de apă la $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Animalele au fost lăsate să înoate timp de 15 min înainte de a fi extrase, uscate cu prosoape calde și reîntoarse în cuști. Procedura s-a repetat după 24 de ore, într-o sesiune de înot de 6 min (sesiunea test). Pe timpul sesiunii test, s-au înregistrat următoarele răspunsuri comportamentale (i) imobilitate (timp petrecut plutind cu mișcările minime pentru a-și menține capul deasupra apei); și (ii) timpul de înot (timpul petrecut cu mișcări de înot active).

Analiza statistică

Datele sunt exprimate ca medie \pm S.E.M și au fost analizate statistic prin analiza unidirecțională a varianței (ANOVA) urmată de testul post-hoc Tukey HSD pentru compararea grupurilor multiple, considerând tratamentul ca factor. Toate analizele s-au efectuat cu programul GraphPad 8.0, iar semnificația a fost stabilită la $p < 0,05$. Corelația dintre scorurile comportamentale la diferite solicitări a fost estimată prin coeficientul de corelație Pearson (r).

Din descrierea invenției mai sus-prezentate în detaliu în legătură cu multiplele sale variante și combinații ale acestora, specialistul în materie va înțelege și va aprecia

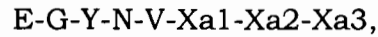
faptul că pot fi aduse unele modificări pentru a adapta o situație particulară fără a se îndepărta de învățătura invenției. Aceste modificări se pot face în spiritul invenției și în limitele conferite de întinderea protecției așa cum este ea definită în secțiunea revendicărilor.

Secvența de aminoacizi a variantei STEP 32 C/S a fosfatazei STEP

SMSRVLQAEELHEKALDPFLQAEFFEIPMNFVDPKEYDIPGLVRKNRYKTILPNPHS
RVCLTSPDPDDPLSSYINANYIRGYGGEEKVVIATQGPIVSTVADFWRMVWQEHTPIIVMI
TNIEEMNEKCTEYWPEEQVAYDGVEITVQKVIHTEDYRLRLISLKSGTEERGLKHYWFT
SWPDQKTPDRAPLLHLVREVEEAAQQEGPHCAPIIVHSSAGIGRTGCFIATSICCQQLR
QEGVVDILKTTTCQLRQDRGGMIQTCEQYQFVHHVMSLYEKQLSHQS

REVENDICĂRI

1. Peptidă de interferență cu formula



având acțiune inhibitorie asupra legăturilor dintre GluA2 și STEP32 și/sau dintre GluA2 și BRAG2 la nivelul sinapselor neuronale

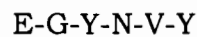
în care:

Xa1 reprezintă aminoacidul Y care este fosforilat sau nefosforilat

Xa2 reprezintă un aminoacid care lipsește sau care este ales, în mod independent, dintre E și G;

Xa3 reprezintă un aminoacid care lipsește sau care este D;

2. Peptidă de interferență conform revendicării 1, în care peptida de interferență este hexapeptida cu formula

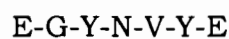


3. Peptidă de interferență conform revendicării 1, în care peptida de interferență este hexapeptida cu formula

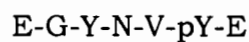


în care pY reprezintă Y fosforilat

4. Peptidă de interferență conform revendicării 1, în care peptida de interferență este heptapeptida cu formula



5. Peptidă de interferență conform revendicării 1, în care peptida de interferență este heptapeptida cu formula



în care pY reprezintă Y fosforilat

6. Peptidă de interferență conform revendicării 1, în care peptida de interferență este octapeptida cu formula



7. Peptidă de interferență conform revendicării 1, în care peptida de interferență este octapeptida cu formula



în care pY reprezintă Y fosforilat.

8. Compus peptidic care cuprinde o peptidă de interferență conform oricăreia dintre revendicările anterioare cuplată cu o secvență de aminoacizi numită secvență de transport pentru penetrarea membranei celulare la nivelul sinapselor neuronale.

9. Compus peptidic conform revendicării 8 pentru utilizare ca medicament.

10. Compus peptidic conform revendicării 9 pentru utilizare în prevenția și tratamentul depresiei și anxietății.

11. Compus peptidic conform revendicării 9 pentru utilizare în prevenția și tratamentul afecțiunilor neuro-degenerative.

12. Compus peptidic conform oricăreia dintre revendicările 9, 10 și 11 în care peptida de interferență este cuplată la capătul N-terminal cu secvența de transport GRKKRRQRRRPQ.

13. Compus peptidic conform oricăreia dintre revendicările de la 8 la 12 în care peptida de interferență este EGYNVpY.

14. Compus peptidic conform oricăreia dintre revendicările de la 8 la 12 în care peptida de interferență este EGYNVpYE.

15. Compuși peptidomimetici ai peptidelor de interferență conform oricăreia dintre revendicările 3, 5 sau 7, în care pY este înlocuit cu 4-(fosfonodifluorometil)-L-fenilalanină (F2Pmp), compușii peptidomimetici menționați având acțiuni inhibitorie asupra legăturilor dintre GluA2 și STEP la nivelul sinapselor neuronale.

16. Metodă de inhibiție a endocitozei receptorilor AMPA de la nivelul sinapselor neuronale utilizând peptide de interferență fosforilate conform revendicărilor 3, 5 și 7, care cuprinde următoarele etape succesive :

- inhibarea formării complexului receptor AMPA-STEP prin legarea STEP de o peptidă de interferență fosforilată și formarea unui compus peptidă -STEP;
- defosforilarea compusului format în etapa precedentă sub acțiunea STEP; și
- inhibarea de către compusul defosforilat a formării complexului BRAG2-receptor AMPA, împiedicându-se astfel endocitoza receptorului.

met de tratament

Desene

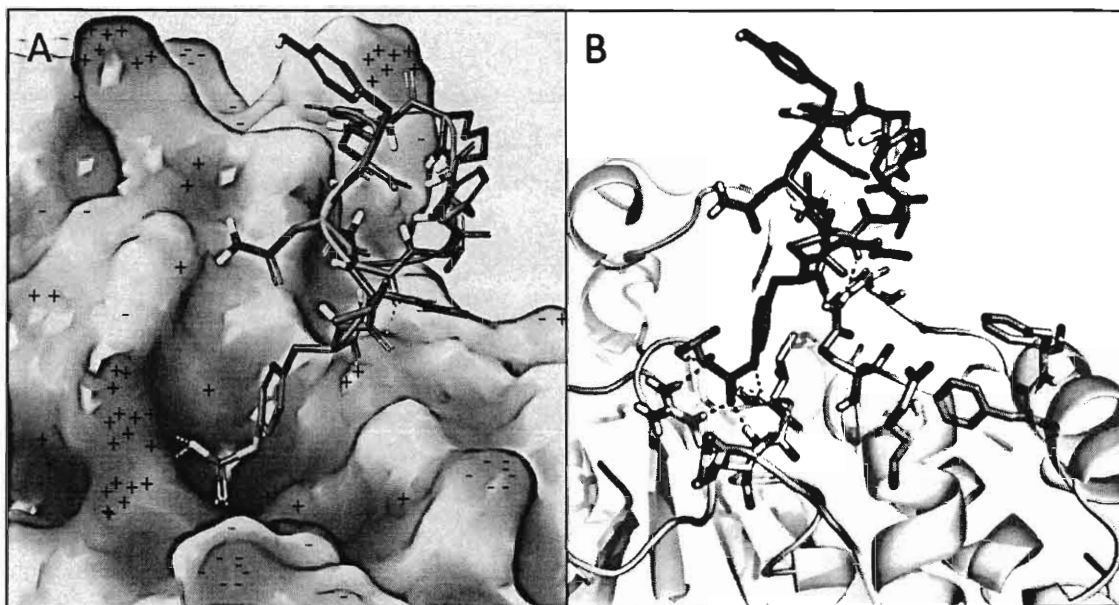


Figura 1. Situsul de legare a STEP în reprezentări de suprafață (A) și cu bețe și panglici (B), cu 3Y (p3Y) fosforilat reprezentat cu bețe gri închis. Suprafața e marcată cu semne “+” sau “-” în concordanță cu potențialul electrostatic, părțile marcate cu “+” corespund unor grupări încărcate pozitiv, iar cele marcate cu “-” corespund unor grupări încărcate negativ, precum D437 și E519 (A). Motivul bogat în fenilalanină menționat e vizibil în partea dreaptă a imaginii (B).

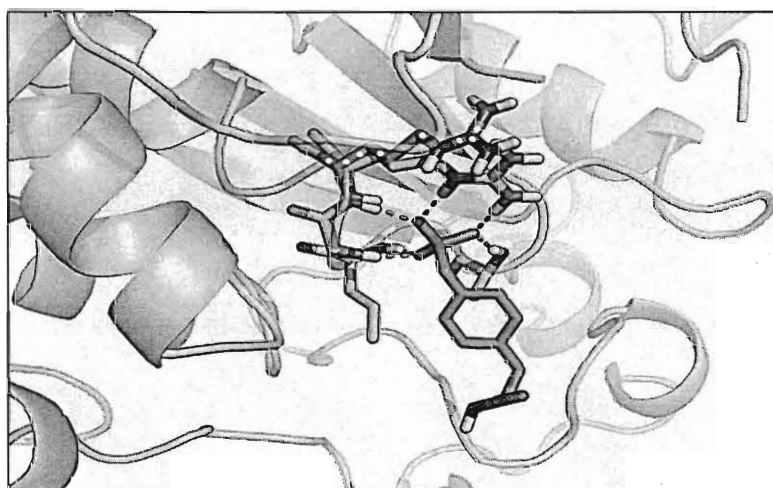


Figura 1S. Comparația structurilor cristaline ale STEP. Arginina catalitică – împreună cu resturile învecinate – stabilizează fosfotirozina legată prin punți saline și legături de hidrogen multiple (PDB: 2CJZ [35]). Orientarea R478 din structura PDB 2BIJ este inclusă pentru comparație și reprezentată de linia cu buline albe.

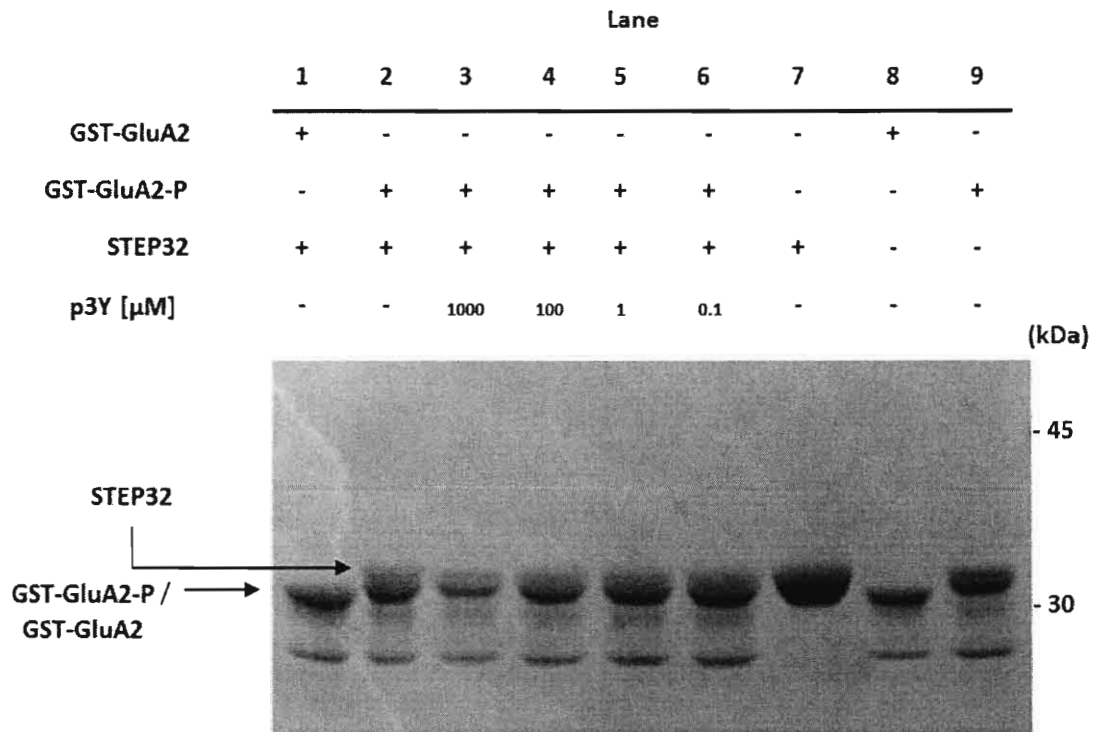


Figura 2. Experiment de pulldown pentru GST-GluA2 fosforilat și STEP32, indicând efectul competitiv al 3Y fosforilat (p3Y). Pe banda 1 se poate vedea că GST-GluA2 nefosforilat nu poate crea un complex cu STEP32. Banda 2 arată că STEP32 formează un complex cu GST-GluA2. Aproximarea maselor moleculare a STEP32 (banda 7) și GST-GluA2 cu urme de GST-GluA2 (banda 9) e evidentă, dar prezența STEP32 poate fi distinsă. Scăzând concentrația de p3Y de la 1000 μ M la 0.1 μ M (benzile 3-6) duce la creșterea intensității benzii superioare, corespunzând unei cantități mai mari de STEP32 prinse de GST-GluA2.

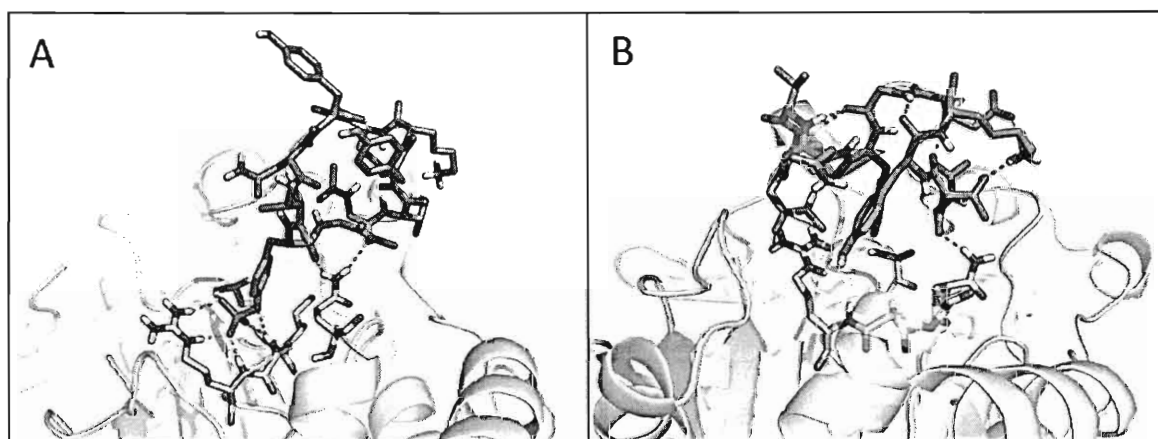


Figura 2S. Pozițiile precise de legare ale peptidei 3Y fosforilate (A) și nefosforilate (B) la STEP. În timp ce interacțiunile multiple de sarcină și de legături de hidrogen stabilizează segmentul fosforilat, cavitatea fosfat nu este complementată și se

stabilesc doar două legături de hidrogen de suprafață cu segmentul nefosforilat.

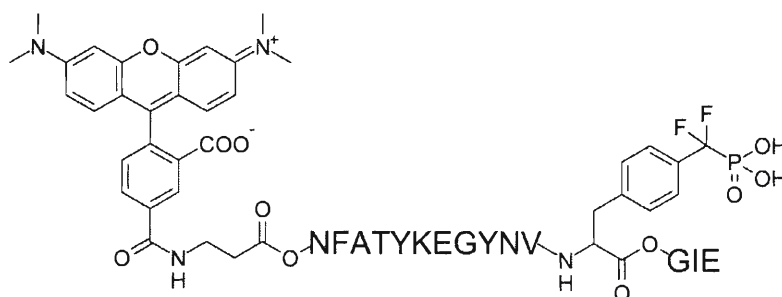


Figura 3. Structura și secvența peptidei modificate TAMRA-3Y-F₂Pmp utilizată în experimentele de polarizarea fluorescenței

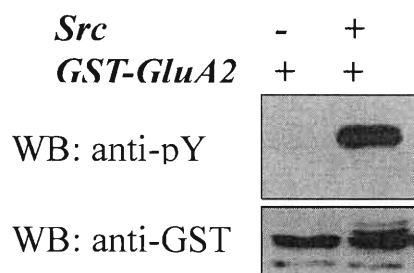


Figura 3S. Fosforilarea la tirozină a GST-GluA2 folosind Src kinază. Proteina recombinantă GST-GluA2 a fost fosforilată de Src kinază în prezența ATP. O reacție negativă, conținând GST-GluA2 dar nu și Src kinază a fost realizată drept control negativ. Fosforilarea la tirozină a GST-GluA2 s-a controlat prin western blot folosind anticorpi anti-pTyr și membrana a fost în continuare retestată cu anticorpi anti-GST pentru a confirma prezența proteinei GST-GluA2.



Figura 4. Două exemple ale peptidelor mai scurte propuse, în interacțiune cu situsul de legare al fosfatazei STEP. În plus față de legarea la structura de leagăn formată de grupările fosfat, tirozina peptidei YNVpYG formează de asemenea legături de hidrogen cu gruparea Q516 a STEP(A), în timp ce peptida EGYNVpY formează o legătură de hidrogen cu K439, precum și o legătură π - π între tirozina sa și F281 din molecula

STEP (B).

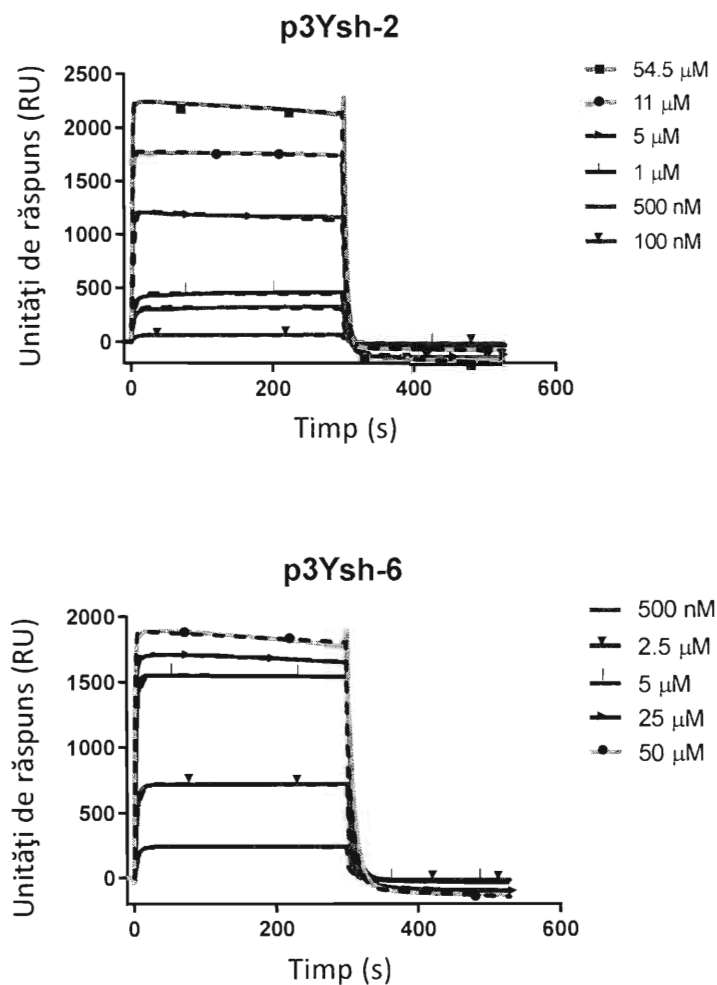


Figura 4S. Analiza prin rezonanța plasmonului de suprafață a interacțiunii dintre fosfopeptidele derivate 3Y p3Ysh-2, respectiv p3Ysh-6 și STEP32 C/S. Sensorgramele s-au obținut prin injectarea de concentrații crescânde de STEP32 peste fosfopeptidele immobilizate. Pentru fiecare concentrație de STEP32, semnalul obținut pe o celulă de curgere de control au fost scăzute din semnalul obținut dintr-o celulă de curgere probă. Liniile continue reprezintă curbele de legare măsurate, iar liniile punctate reprezintă datele fitate pentru o cinetică 1:1.

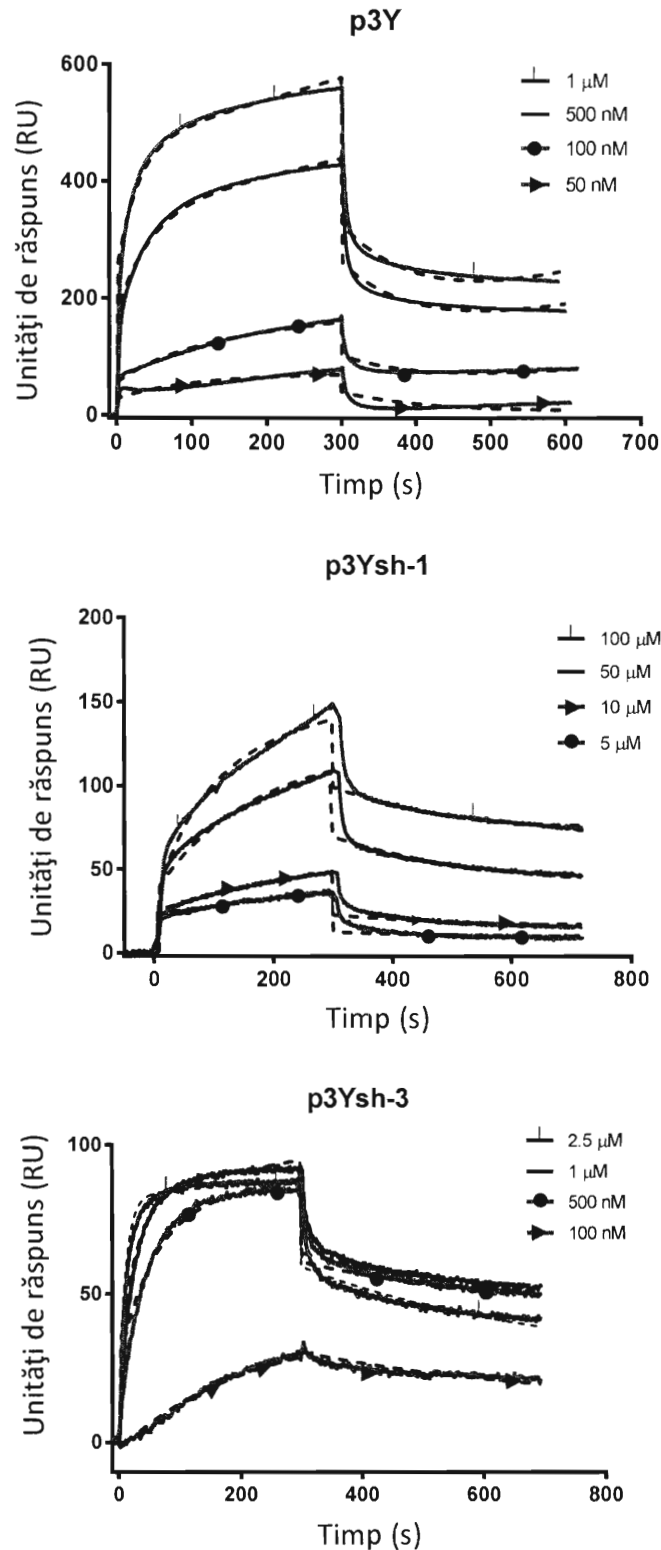


Figura 5. Analiza prin rezonanță de plasmon de suprafață a interacțiunii dintre fosfopeptidele scurte derivate din 3Y și STEP32 C/S. Sensorgramele s-au obținut prin injecția unor concentrații crescătoare de STEP32 peste fosfopeptidele immobilizate. Pentru fiecare concentrație de STEP32 semnalul obținut pe celula de flux de control a fost scăzut din semnalul obținut la celula de flux a probei. Liniile continue

reprezintă curbele de legare măsurate, iar liniile întrerupte corespund unei cinetici de 1:1. Numai sensorgramele a trei fosfopeptide sunt reprezentate mai sus: pentru peptida de control pozitiv (p3Y), pentru peptida cu cel mai slab semnal de legare (p3Ysh-1) și pentru peptida cu cel mai puternic semnal de legare (p3Ysh-3).

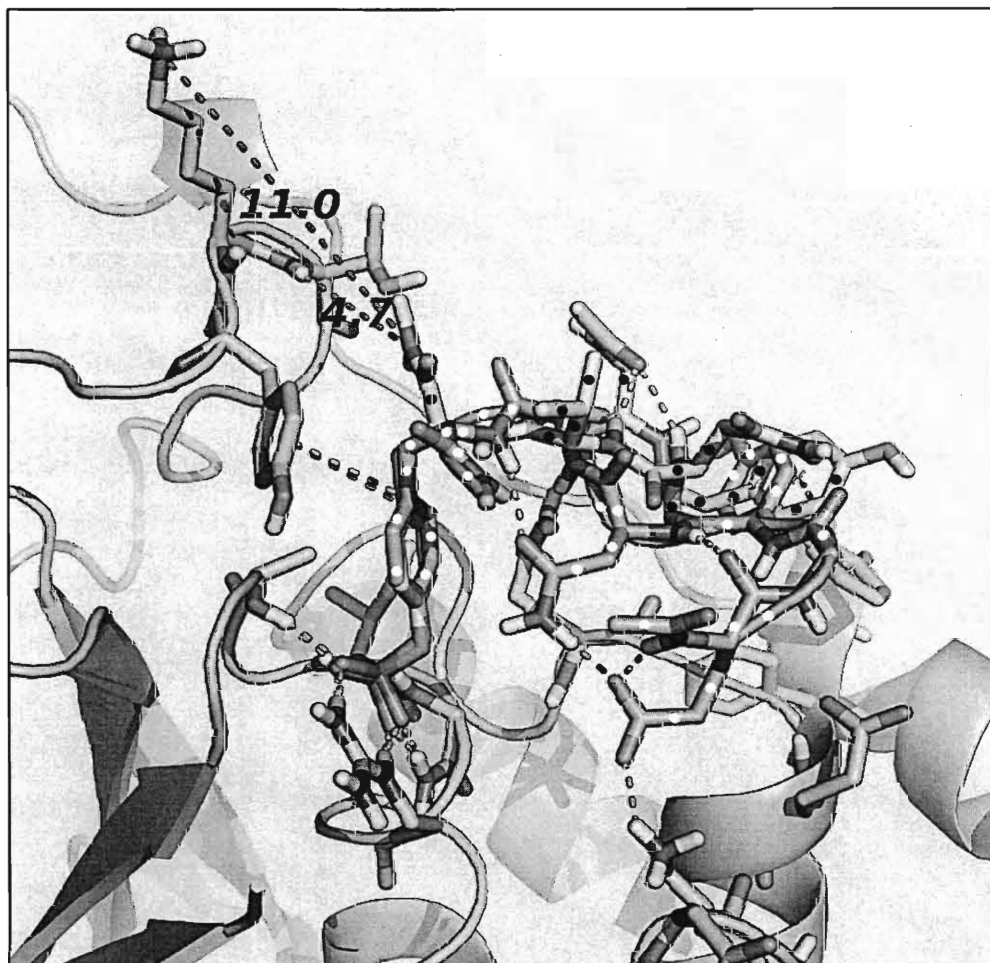


Figura 5S. Pozițiile suprapuse de legare a peptidelor EGYNVpY (catena cu buline albe) și GYNVpY (catena cu buline negre). Tiparele interacțiunii celor două peptide cu STEP sunt foarte similare (inclusive interacțiunea cu cavitatea pentru fosfat și suprapunerea π - π cu resturile de tirozină Y281 și Y304). Pe de altă parte, puntea salină dintre EGYNVpY și restul K439 din STEP (partea de jos a imaginii) sunt extrem de importante pentru stabilizarea complexului proteină-peptidă, după cum s-a verificat din rezultatele experimentale.

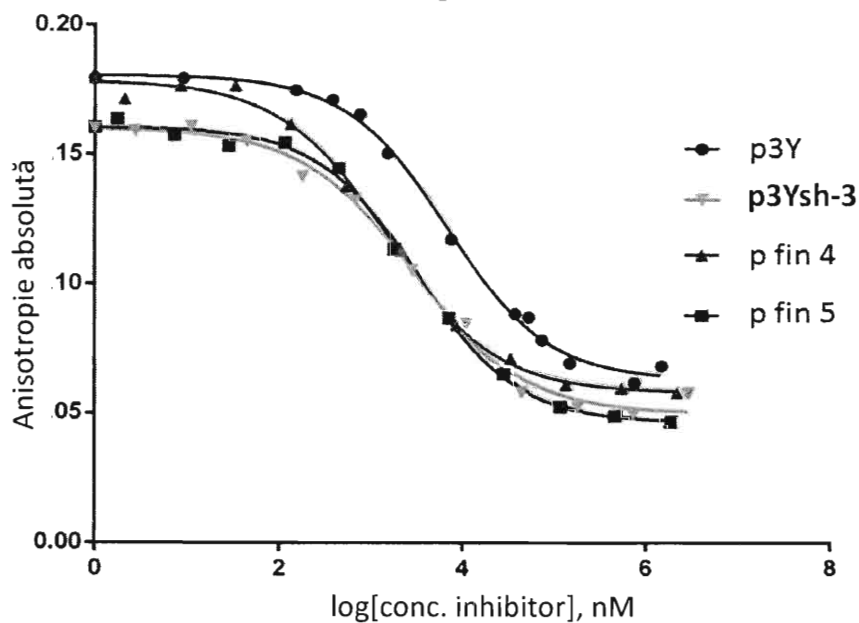


Figura 6. Reprezentarea datelor obținute prin măsurători de polarizarea fluorescenței pentru studiul inhibiției interacțiunii STEP32 - TAMRA-3Y-F2Pmp cu peptide derivate din p3Y. Curbele de inhibiție pentru trei dintre fosfopeptidele cele mai eficiente, p3Ysh-3, p-fin4, p-fin5 și standardul p3Y (ATYKEGYNVpYG) sunt reprezentate pentru comparație. Valoarea cea mai scăzută pentru IC₅₀ se obține pentru p-fin4 (vezi Tabelul 3).

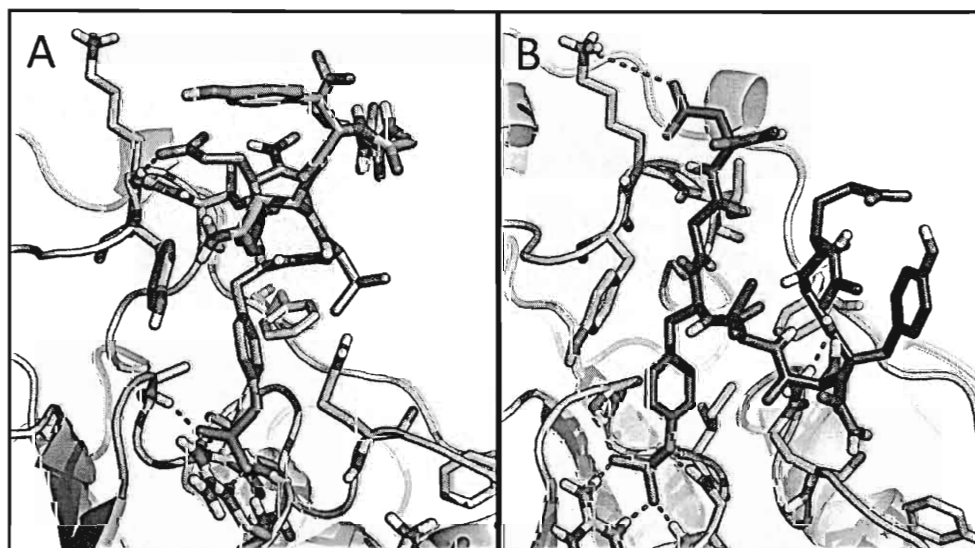


Figure 6S. Pozițiile docate ale analogilor extinși ai EGYNVpY. (A) Peptida EGYNVpYE formează o legătură de hidrogen suplimentară cu cavitatea secundară. (B) Peptida EGYNVpYGD formează o punte salină cu catena laterală a K439, în timp ce păstrează interacțiunea secundară cu Q516.

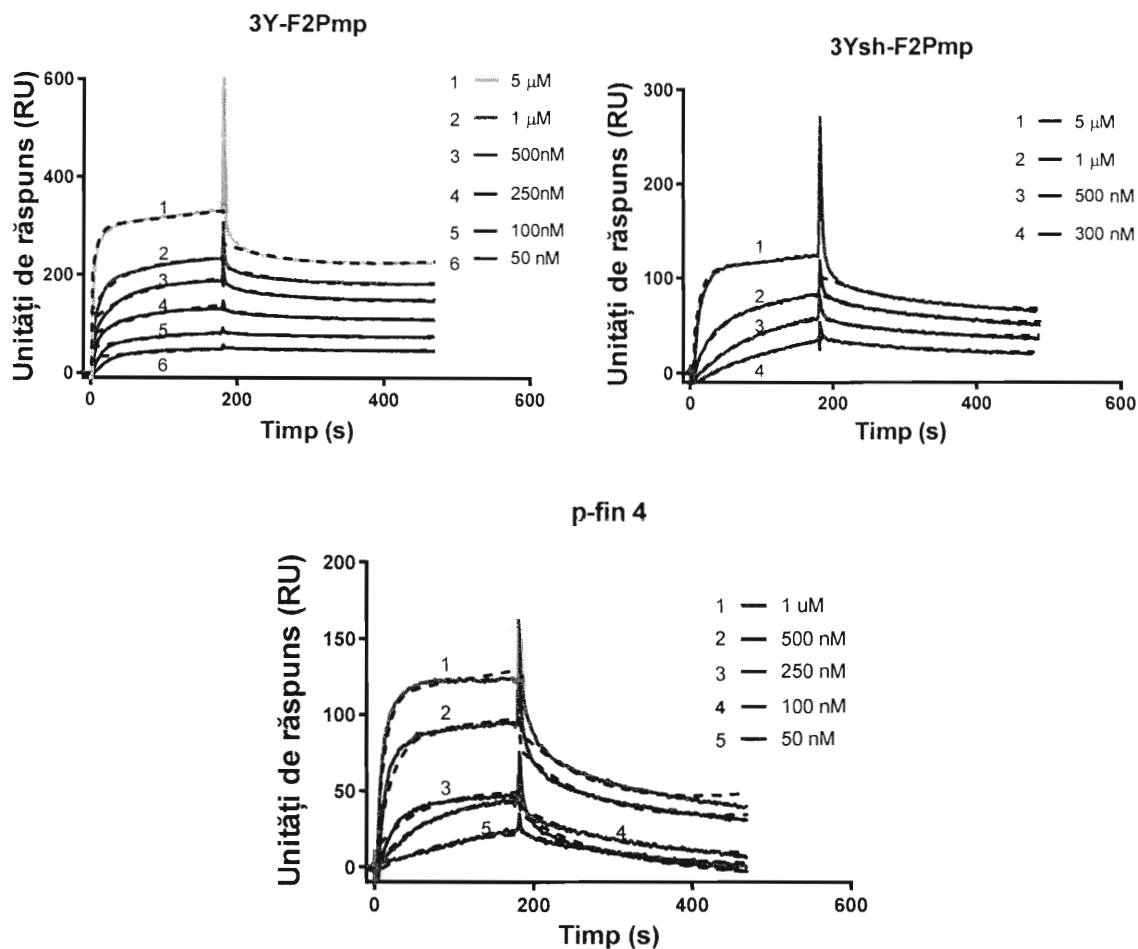


Figura 7. Analiza prin rezonanță de plasmon de suprafață a interacțiunii dintre STEP32 și peptide fosforilate la tirozină sau conținând F2Pmp. Pentru experimentele cu peptide fosfonomimetice immobilizate 3Y-F2Pmp și 3Ysh-F2Pmp s-a folosit STEP32 WT ca analit, iar pentru heptapeptida p-fin4, s-a folosit mutanta STEP32 C/S. Cel puțin patru concentrații de STEP32 au fost injectate peste peptidele immobilizate pe chip-ul senzor. Curbele de legare au s-au obținut prin scăderea semnalului obținut în celula de flux de control din semnalul de la celula de flux pentru probă. Pentru fosfopeptida p-fin 4 s-a determinat interacția cu STEP32 WT. Liniile continue reprezintă curbele de legare măsurate și liniile întrerupte reprezintă curba teoretică corespunzând unei cinetici 1:1.

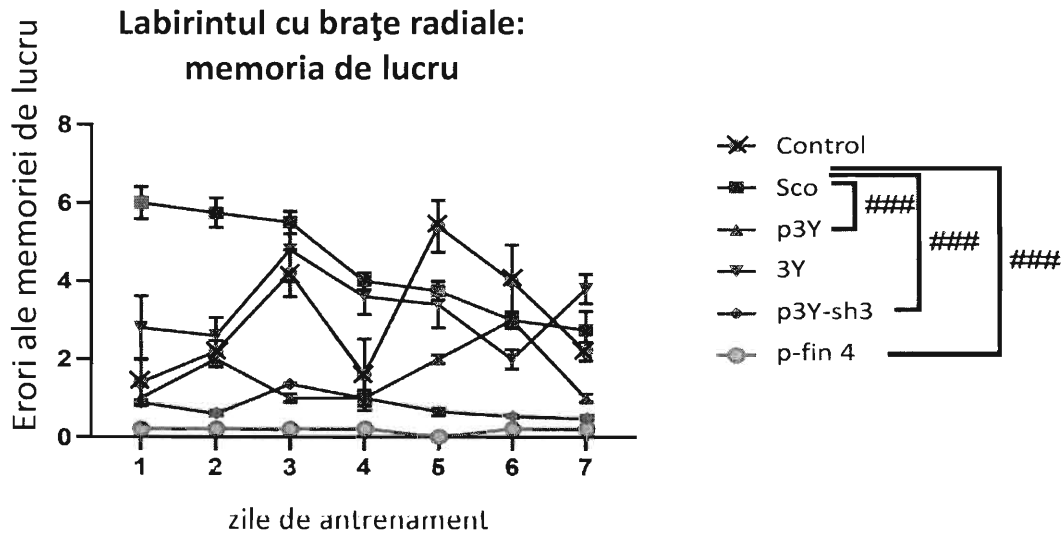


Figura 8. Efectele administrării peptidei (15 μ M) șobolanilor tratați în prealabil cu scopolamină (Sco -0,7 mg/kg) asupra numărului de erori de memorie de lucru (de scurtă durată) în labirintul cu brațe radiale. Valorile sunt medii \pm abaterea standard medie (n=5). Pentru testul Tukey posthoc de comparație multiplă: Sco vs. (TAT-)p3Y: ###p<0.0001; Sco vs. (TAT-)p3Y-sh3: ###p<0.0001 și Sco vs. (TAT-)p-fin 4: ###p<0.0001.

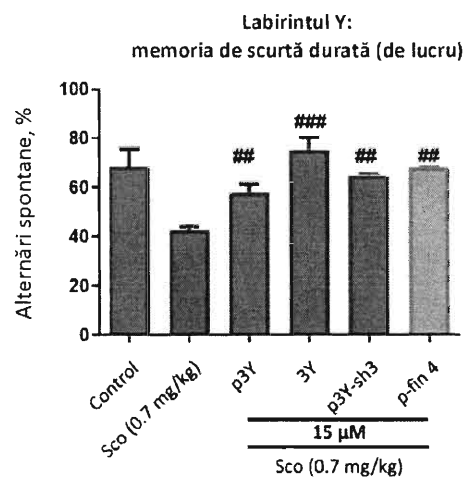


Figura 9. Administrarea peptidelor (15 μ M) a inversat deficitul cauzat de scopolamină (Sco, 0,7 mg/kg) în procentul alternărilor spontane în labirintul Y. Valorile sunt medii \pm abaterea standard medie (n=5). Pentru testul Tukey posthoc de comparație multiplă: Sco vs. (TAT-)p3Y: ##p< 0.001; Sco vs. (TAT-)3Y: ###p<0.0001; Sco vs. (TAT-)p3Y-sh3: ##p<0.001 și Sco vs.(TAT-)p-fin4: ##p<0.001.

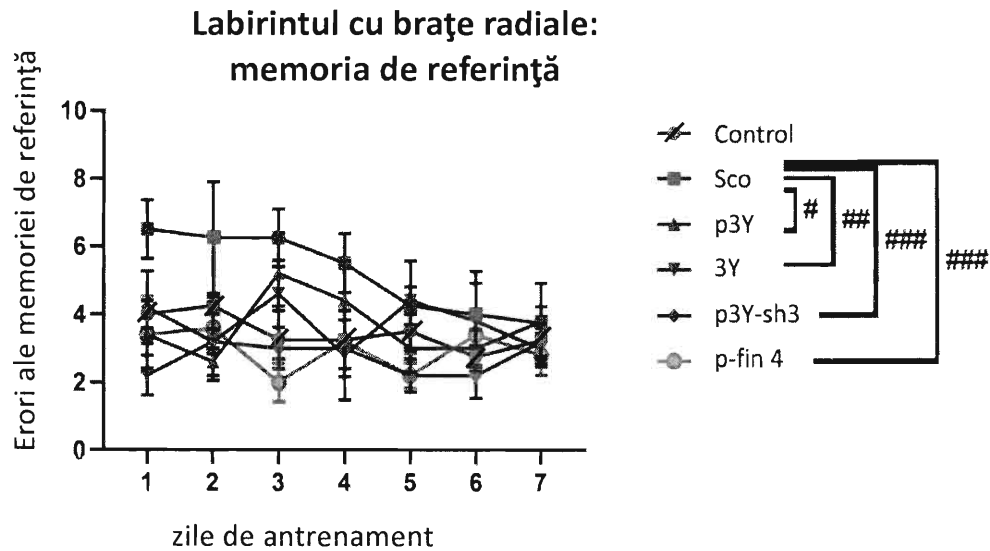


Figura 10. Efectele administrării peptidei (15 μ M) șobolanilor tratați în prealabil cu scopolamină (Sco -0,7 mg/kg) asupra numărului de erori de memorie de referință (de lungă durată) în labirintul cu brațe radiale. Valorile sunt medii \pm abaterea standard medie (n=5). Pentru testul Tukey posthoc de comparație multiplă: Sco vs. (TAT-)p3Y: #p<0.01; Sco vs. (TAT-)3Y: ##p<0.001, Sco vs. (TAT-)p3Y-sh3: ###p<0.0001, and Sco vs. (TAT-)p-fin 4: ###p<0.0001.

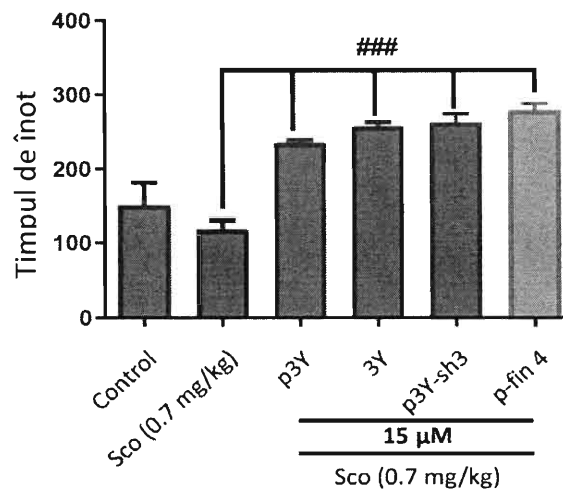


Figura 11. Efectul antidepresiv al peptidelor (15 μ M) asupra timpului de înot în testul de înot forțat la șobolanii tratați cu scopolamină (0,7 mg/kg). Valorile sunt medii \pm abaterea standard medie (n=5). Pentru testul Tukey posthoc de comparație multiplă: Sco vs. (TAT-)p3Y: ###p<0.0001; Sco vs. (TAT-)3Y: ###p<0.0001, Sco vs. (TAT-)p3Y-sh3: ###p<0.0001 and Sco vs. (TAT-)p-fin4: ###p<0.0001.

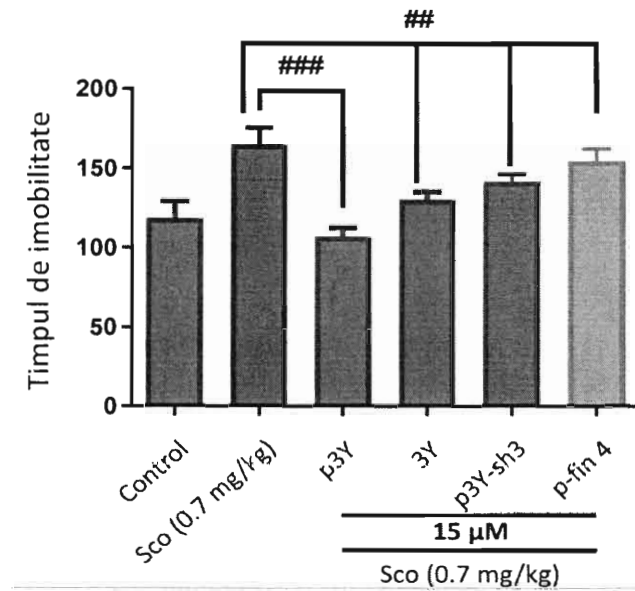


Figura 12. Efectul antidepresiv al peptidelor ($15 \mu\text{M}$) asupra timpului de imobilitate în testul de înot forțat la șobolanii tratați cu scopolamină ($0,7 \text{ mg/kg}$). Valorile sunt medii \pm abaterea standard medie ($n=5$). Pentru testul Tukey posthoc de comparație multiplă: Sco vs. (TAT-)p3Y: $###p<0.0001$; Sco vs. (TAT-)3Y: $##p<0.001$, Sco vs. (TAT-)p3Y-sh3: $##p<0.001$ și Sco vs. (TAT-)p-fin4: $##p<0.001$.

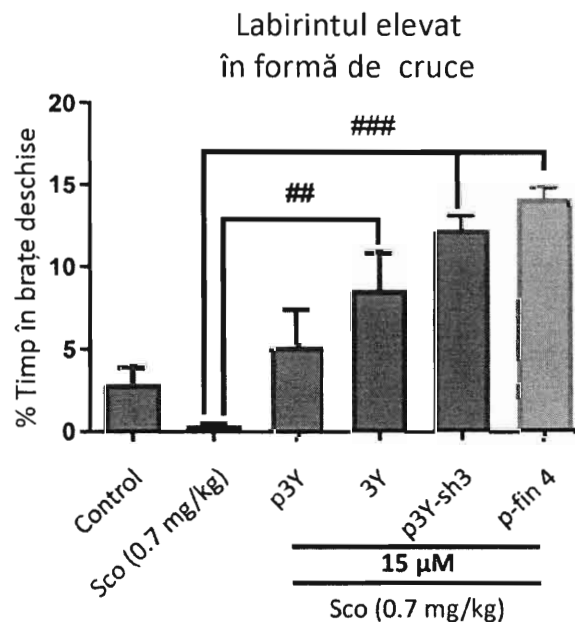


Figura. 13. Profilul anxiolitic al administrării peptidelor ($15 \mu\text{M}$) pentru timpul petrecut în brațele deschise în testul cu labirintul elevat în formă de cruce la șoarecii tratați cu scopolamină ($0,7 \text{ mg/kg}$). Valorile sunt medii \pm abaterea standard medie ($n=5$). Pentru testul Tukey posthoc de comparație multiplă: Sco vs. P2: $##p<0.001$; Sco vs. P3: $###p<0.0001$, și Sco vs. p-fin4: $###p<0.0001$

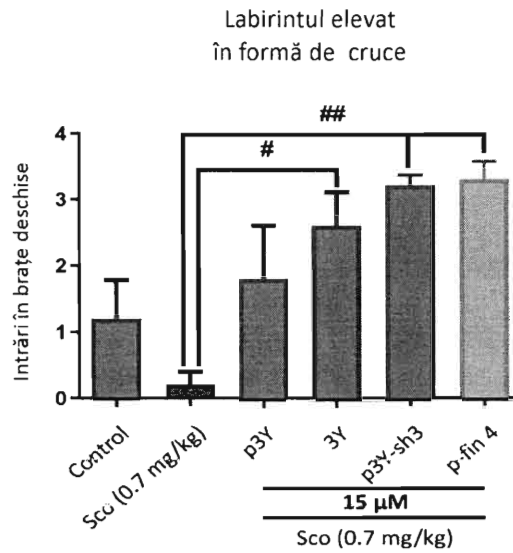


Figura 14. Profilul anxiolitic al administrării peptidelor ($15 \mu\text{M}$) pentru numărul de intrări în brațele deschise în testul cu labirintul elevat în formă de cruce la șoarecii tratați cu scopolamină ($0,7 \text{ mg/kg}$). Valorile sunt medii \pm abaterea standard medie ($n=5$). Pentru testul Tukey posthoc de comparație multiplă: Sco vs. (TAT-)3Y: $\#p<0.01$; Sco vs. (TAT-)p3Y-sh3: $\#\#p<0.001$, și Sco vs. (TAT-)p-fin4: $\#\#p<0.001$.

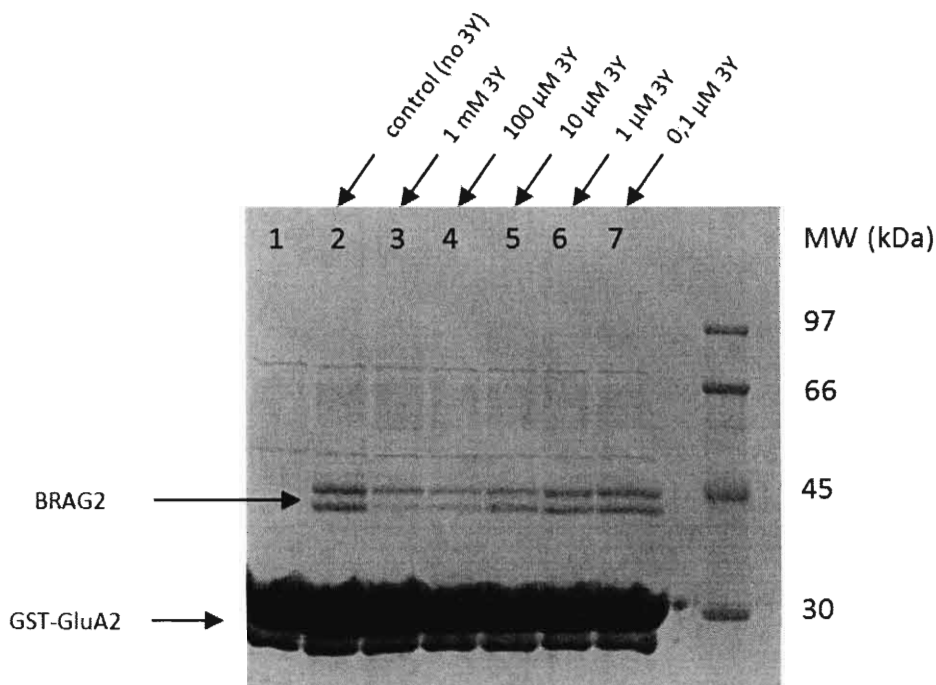


Figura 16. Rolul 3Y în desfacerea complexului BRAG2-GluA2. Toate probele conțin GST-GluA2. Banda **1.** control fără BRAG2 și fără 3Y; Banda **2.** control cu BRAG2 și fără 3Y; Benzile **3-7.** BRAG2 și concentrații crescânde de 3Y.

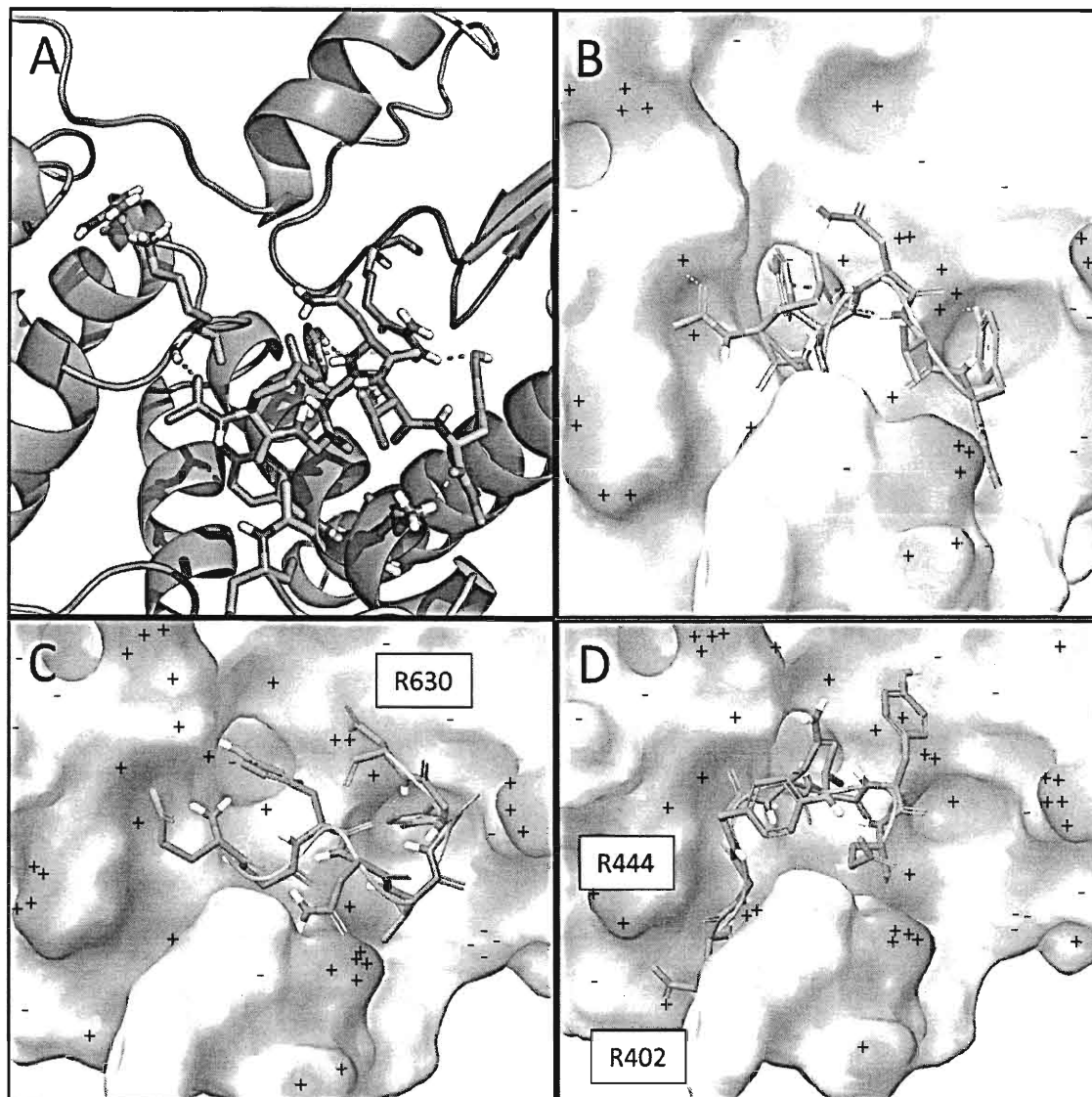


Figura 15. (A) Poziția docată de legare a peptidei EGYNVY în situs-ul propus de legare al BRAG2 (scor de docare: -7.752). Peptida stabilește multiple legături de hidrogen cu BRAG2, precum și interacțiuni cation- π cu catena laterală a grupării R630. (B) În vederea de suprafață a BRAG2 se observă că cele două resturi de tirozină ale peptidei sunt complementare cu două cavități care sunt foarte dificil de accesat. (C) Peptida EGYNVYGD prezintă un mod similar de legare cu EGYNVY, cu o punte de sare suplimentară între restul aspartic terminal și restul R630 al BRAG2 (scor de docare: -7.327). Peptida EGYNVYE prezintă un mod diferit de legare, unde coada sa N-terminală este inserată în șanțul de legare a tirozinei (eng. subpocket, groove), identificat mai devreme (scor de docare: -6.778). Aceasta permite existența a două punți suplimentare de sare între glutamatul N-terminal și resturișe R402 și R444 din BRAG2 (suprafețe albastre). Imaginea a fost produsă cu Pymol (A) [58]și Maestro (B,C,D)[59] .



Cont IBAN: RO05 TREZ 7032 0F33 5000 XXXX
Trezoreria Sector 3, București
Cod fiscal: 4266081

Serviciul Examinare de Fond: Chimie-Farmacie

RAPORT DE DOCUMENTARE

CBI nr. a 2020 00548	Data de depozit: 31/08/2020	Data de prioritate
----------------------	-----------------------------	--------------------

Titlul invenției	PEPTIDE DE INTERFERENȚĂ CA INHIBITORI AI INTERACȚIUNILOR LEGATE DE ENDOCITOZA RECEPTORILOR AMPA
------------------	---

Solicitant	SZEDLACSEK ȘTEFAN EUGEN, STR.MĂRULUI, NR.45A, AP.4, BUCUREȘTI, RO; BADEA RODICA-AURA, STR.GHEORGHE SAIDAC, NR.5B, BL.36, SC.1, AP.10, BUCUREȘTI, RO; SZEDLACSEK HOREA-ȘTEFAN, BD.IANCU DE HUNEDOARA, NR.50A, AP.15, BUCUREȘTI, RO
------------	--

Clasificarea cererii (Int.Cl.)	C07K7/06 (2006.01), A61K38/08 (2019.01), A61P25/00 (2006.01)
--------------------------------	---

Domenii tehnice cercetate (Int.Cl.)	C07K, A61K, A61P
-------------------------------------	------------------

Colecții de documente de brevet cercetate	
Baze de date electronice cercetate	RopatentSearch, Softul Comun, Epoquenet (Internal, Full text patent search, Full text nonpatent search), Google, Google Scholar, NCBI, Blast
Literatură non-brevet cercetată	

Documente considerate a fi relevante		
Categoria	Date de identificare a documentelor citate și, unde este cazul, indicarea pasajelor relevante	Relevant față de revendicarea nr.
Y, D	EP1687427 B1 (The University of British Columbia, CA) 2016.08.24 [0050], tabel 1, revendicări	1-15
Y	CN102727864 A (Univ Beijing, CN) 2012.10.17, Rezumat, întregul document (descrierea automată în limba engleză)	1-15

Strada Ion Ghica nr. 5, Sector 3, Cod 030044, București, România

Telefon centrală: +40-21-306.08.00 01 02 28 29

Fax: +40-21-312.38.19

E-mail: office@osim.ro

www.osim.ro



Documente considerate a fi relevante - continuare		
Categoria	Date de identificare a documentelor și, unde este cazul, indicarea pasajelor relevante	Relevant față de revendicarea nr.
Y	WO2020103889 A1 (Qingdao Primedicine Pharmaceutical Co Ltd, CN) 2020.05.28 Rezumat, întregul document (descrierea automată în limba engleză)	1-15
Y	CN106632601 A (Kunming Inst Zoology CAS, CN) 2017.05.10 rezumat, întregul document (descrierea automată în limba engleză)	1-15
Unitatea invenției (art.18)		
Observații:	RD nu s-a efectuat pentru revendicarea 16 pentru că aceasta nu îndeplinește prevederile Art. 17 alin 3 din Legea 64/1991.	

Data redactării: 22.06.2021

Examinator,
BABALIGEA IRINA



Litere sau semne, conform ST.14, asociate categoriilor de documente citate	
<p>A - Document care definește stadiul general al tehnicii și care nu este considerat de relevanță particulară;</p> <p>D - Document menționat deja în descrierea cererii de brevet de invenție pentru care este efectuată cercetarea documentară;</p> <p>E - Document de brevet de invenție având o dată de depozit sau de prioritate anterioară datei de depozit a cererii în curs de documentare, dar care a fost publicat la sau după data de depozit a acestei cereri, document al cărui conținut ar constitui un stadiu al tehnicii relevant;</p> <p>L - Document care poate pune în discuție data priorității/lor invocată/e sau care este citat pentru stabilirea datei de publicare a altui document citat sau pentru un motiv special (se va indica motivul);</p> <p>O - Document care se referă la o dezvăluire orală, utilizare, expunere, etc;</p>	<p>P - Document publicat la o dată aflată între data de depozit a cererii și data de prioritate invocată;</p> <p>T - Document publicat ulterior datei de depozit sau datei de prioritate a cererii și care nu este în contradicție cu aceasta, citat pentru mai buna înțelegere a principiului sau teoriei care fundamentează invenția;</p> <p>X - document de relevanță particulară; invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau nu poate fi considerată ca implicând o activitate inventivă, când documentul este luat în considerare singur;</p> <p>Y - document de relevanță particulară; invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând o activitate inventivă, când documentul este combinat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași categorie, o astfel de combinație fiind evidentă unei persoane de specialitate;</p> <p>& - document care face parte din aceeași familie de brevete de invenție.</p>