

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
21 de abril de 2016 (21.04.2016)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2016/059277 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 9/12 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2015/070744
- (22) Fecha de presentación internacional:
14 de octubre de 2015 (14.10.2015)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P 201431507
14 de octubre de 2014 (14.10.2014) ES
- (71) Solicitantes: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID [ES/ES]; Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Pabellón C, C/ Einstein nº 3, E-28049 Madrid (ES).
- (72) Inventores: DÍAZ-GUERRA GONZÁLEZ, Margarita; Instituto de Investigaciones Biomedicas (IIBM), C/ Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES). SÁNCHEZ TEJEDA, Gonzalo; Instituto de Investigaciones Biomedicas (IIBM), C/ Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES). GÓMEZ VIDAURRE, Óscar; Instituto de Investigaciones Biomedicas (IIBM), C/ Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES). AYUSO DOLADO, Sara; Instituto de Investigaciones Biomedicas (IIBM), C/ Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES).
- (74) Mandatario: PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: PEPTIDE DERIVED FROM TRKB-FL AND USE THEREOF AS A NEUROPROTECTOR

(54) Título : PÉPTIDO DERIVADO DE TRKB-FL Y SU USO COMO NEUROPROTECTOR

(57) Abstract: The invention relates to a neuroprotective peptide characterised in that it consists of 15 amino acids of the human TrkB-FL sequence corresponding to positions 458 to 472 of the canonical sequence, and can exert a neuroprotective effect when the pro-survival response time is increased. The invention also relates to the use of said peptide for preventing and/or treating neuronal damage in mammals caused by a pathology of the central nervous system associated with excitotoxicity. The invention further relates to a pharmaceutical composition characterised in that it comprises said neuroprotective peptide, and to the use of same in the treatment of cerebrovascular diseases and other pathologies of the CNS.

(57) Resumen: La presente invención hace referencia a un péptido neuroprotector, caracterizado por que consiste en 15 aminoácidos de la secuencia de TrkB-FL humana correspondiente a las posiciones 458 hasta 472 de la secuencia canónica y que es capaz de ejercer un efecto neuroprotector al aumentar el tiempo de respuesta pro-supervivencia. Asimismo, en la presente invención, se protege el uso de dicho péptido para prevenir y/o tratar el daño neuronal en mamíferos causado por una patología del sistema nervioso central asociada a excitotoxicidad. También se protege una composición farmacéutica caracterizada por comprender dicho péptido neuroprotector, así como el uso de los mismos en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares y otras patologías del SNC.



WO 2016/059277 A1

PÉPTIDO DERIVADO DE TRKB-FL Y SU USO COMO NEUROPROTECTOR

5

DESCRIPCIÓN

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se engloba en el sector farmacéutico, y en el sector de servicios públicos, sociales y colectivos. En concreto, la presente invención se dirige a compañías farmacéuticas que trabajan en el campo de la neuroprotección, tanto referida a daños agudos (isquemia, trauma agudo) como crónicos (enfermedades neurodegenerativas).

ESTADO DE LA TÉCNICA

La industria farmacéutica tiene gran interés en las patologías humanas de alta incidencia y de prevalencia creciente debido a los cambios demográficos y las mayores expectativas de vida. Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) representan la segunda causa de muerte mundial, con 6,7 millones de defunciones y un 11,9% del total (según datos recientes de la OMS del año 2012). Así mismo, la isquemia cerebral es la segunda causa de demencia tras la enfermedad de Alzheimer, y el primer motivo de incapacidad en adultos.

La isquemia cerebral o ictus es un fenómeno que caracteriza a las ECVs y se define como la reducción por diferentes causas del aporte sanguíneo hasta unos niveles insuficientes para mantener el metabolismo y funcionamiento normales de las células cerebrales. Existen dos tipos de ictus según su origen: ictus hemorrágico, generado por la ruptura de un vaso cerebral, el espasmo vascular asociado a una hemorragia subaracnoidea y la hipertensión intracraneal, y el ictus isquémico, producido por la falta de riego sanguíneo en una región del cerebro debido a la presencia de un trombo o placa aterosclerótica. En el tejido afectado podemos diferenciar dos áreas: el núcleo del infarto, que sufre la reducción más severa de flujo sanguíneo y experimenta un daño irreversible, y la zona de penumbra isquémica, caracterizada por ser funcionalmente silente pero intacta desde el punto de vista estructural. Sin embargo, si el flujo sanguíneo no se recupera en un periodo de tiempo denominado ventana

terapéutica, esta región puede sufrir procesos de degeneración neuronal secundaria que provocan la expansión del núcleo del infarto hacia la zona de penumbra isquémica.

5 El único tratamiento aprobado en la práctica clínica frente al ictus isquémico es la trombólisis con el activador tisular del plasminógeno (tPA), que contribuye a la restauración del flujo sanguíneo cerebral mediante la disolución del coágulo que obstruye la arteria. No obstante, la terapia trombolítica da lugar con relativa frecuencia a hemorragias intracerebrales sintomáticas y, además, el tPA presenta una toxicidad
10 asociada que incrementa la degeneración neuronal en modelos experimentales. Estos efectos adversos conllevan la existencia de numerosas contraindicaciones para este tipo de terapia, lo cual ocasiona un problema adicional: la ventana terapéutica en la que los beneficios del tratamiento son superiores a los riesgos se estrecha considerablemente, estando dentro de las 3-4,5 horas tras el comienzo de los
15 síntomas. Esto supone que en España únicamente un 5-10% de los pacientes de un ictus isquémico puede beneficiarse del uso de compuestos trombolíticos. Por tanto, aun mejorando la evolución de algunos pacientes, el uso del tPA no está exento de riesgos, tiene un uso muy limitado y solo es eficaz en una estrecha ventana terapéutica.

20

Entre las alternativas terapéuticas que se están tratando de desarrollar está la interferencia de las cascadas de señalización bioquímicas inducidas por la ECV que conducen al daño isquémico y la muerte neuronal secundaria de la zona de penumbra. Reducir esta muerte neuronal secundaria sería extremadamente beneficioso porque
25 permitiría atenuar el daño neurológico y el grado de discapacidad de los pacientes. El mecanismo fundamental de la muerte neuronal secundaria es la excitotoxicidad, un proceso inducido por el aumento de la concentración del neurotransmisor excitatorio glutamato en el espacio extracelular y la sobreactivación de sus receptores específicos, principalmente los de tipo N-metil-D-aspartato (NMDARs) (Olney, 1986).
30 Por ello, la excitotoxicidad es una diana fundamental en la búsqueda de estrategias de neuroprotección. En el pasado, como primera aproximación, se utilizaron fármacos que al unirse directamente a los NMDARs (antagonistas) o de manera indirecta (por ejemplo, inhibidores de la liberación de glutamato, antagonistas de los canales de calcio dependientes de voltaje) disminuían la sobreactivación del NMDAR. Sin
35 embargo, estos fármacos mostraron resultados esperanzadores en modelos

experimentales de isquemia pero fueron ineficaces en el tratamiento de la isquemia cerebral en humanos y, por tanto, no superaron los ensayos clínicos (Ikonomidou and Turski, 2002). Un defecto común a la mayoría de estos fármacos es su falta de selectividad, motivada fundamentalmente por el desconocimiento de la naturaleza dual
5 de los NMDARs, receptores que son críticos a un tiempo en procesos de supervivencia y de muerte celular (Hardingham et al., 2002). Además, los NMDARs juegan también un papel preponderante en la transmisión sináptica y la comunicación neuronal del sistema nervioso central (SNC), tanto durante el desarrollo como en su vida adulta, y son críticos en procesos vitales como el aprendizaje, la memoria, la
10 plasticidad sináptica y la sinaptogénesis. Debido a ello, los fármacos desarrollados anteriormente en general bloquean tanto la activación fisiológica del NMDAR como la patológica y, por tanto, tienen efectos secundarios sobre el aprendizaje y producen somnolencia, alucinaciones o incluso coma.

15 El interés por desarrollar nuevos fármacos capaces de reducir el proceso excitotóxico va mucho más allá de las ECVs, ya que las alteraciones funcionales del NMDAR son también causantes de la degeneración o muerte neuronal en un gran número de patologías neurológicas, como son la hipoglucemia, epilepsia y el trauma agudo (Choi, 1988). Además, la excitotoxicidad también aparece asociada a ciertas enfermedades
20 neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En general, todas estas enfermedades carecen de tratamientos etiológicos y las terapias utilizadas son sintomáticas o paliativas. Así, por ejemplo, en casos moderados o graves de la enfermedad de Alzheimer se está utilizando un antagonista no-competitivo del NMDAR de desarrollo más reciente, la
25 memantina, que presenta cierta eficacia en la reducción de la excitotoxicidad asociada a dicha enfermedad (Chen and Lipton, 2006). Por último, la excitotoxicidad también es crítica en trastornos neurológicos caracterizados por hiperexcitabilidad o hipersensibilización neuronal (algunos tipos de disquinesias, dolor neuropático), y patologías oculares (glaucoma, retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica y
30 traumatismos del nervio óptico).

En los últimos años se han comenzado a desarrollar pequeños péptidos permeables a la membrana plasmática y la barrera hematoencefálica (BHE), que no alteran la activación *per se* de los NMDARs pero si la formación de complejos con proteínas de
35 andamiaje y señalización de la densidad postsináptica (PSD) que son necesarios para

las funciones patológicas del NMDAR (Aarts et al., 2002). Se ha demostrado que el péptido NA-1 (Tat-NR2B9c, patente US 2010/0137224 A1) es capaz de reducir el daño isquémico en modelos murinos (Aarts et al., 2002) y de primates (Cook et al., 2012b) y, más recientemente, en pacientes sometidos a cirugía endovascular para la
5 reparación de un aneurisma participantes en un pequeño estudio clínico de fase 2 (Hill et al., 2012; revisado en Dolgin, 2012). Aunque prometedora, esta aproximación terapéutica no está exenta de posibles complicaciones ya que las subunidades del NMDAR diana de este péptido participan en procesos de plasticidad sináptica y formación de la memoria en individuos adultos (Brigman et al., 2010).

10

En neuronas existen otros mecanismos de control de la supervivencia neuronal, relacionados funcionalmente con los mediados por los NMDARs aunque diferentes a ellos, que también resultan alterados en condiciones patológicas. Ejemplo de estos mecanismos son los regulados por las neurotrofinas como BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), que mediante la unión a su receptor de alta afinidad TrkB-FL
15 induce su dimerización y transfosforilación, y la activación de diversas cascadas de señalización intracelular pro-supervivencia. Las neurotrofinas regulan adicionalmente otros procesos fundamentales del SNC como la liberación de neurotransmisores, la expresión génica o la trasmisión sináptica. El ARNm del gen de *TrkB (Ntrk2)* codifica
20 para la isoforma TrkB-FL completa, que es el receptor TrkB catalíticamente activo, y para varias isoformas truncadas (TrkB-T1, TrkB-T2 y TrkB-T-Shc) carentes del dominio tirosina quinasa que participan en la modulación del receptor activo. Particularmente, la isoforma TrkB-T1 bloquea la función del receptor TrkB-FL mediante la competición
25 por la unión del BDNF o la formación de heterodímeros inactivos TrkB-FL/TrkB-T1 (Carim-Todd et al., 2009).

La reducción del soporte neurotrófico es un componente importante en la patogénesis de numerosas patologías del SNC. En enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington o ELA se han observado niveles
30 alterados de BDNF y TrkB, y una disminución en la señalización (Dawbarn and Allen, 2003); también se han observado alteraciones de la vía BDNF/TrkB en esquizofrenia, modelos de síndrome de Down o estados depresivos y de estrés (Dawbarn and Allen, 2003). Recientemente, se ha demostrado que la vía BDNF/TrkB está inhibida en situaciones de excitotoxicidad e isquemia cerebral transitoria (Vidaurre et al., 2012). En
35 concreto, se ha observado la modificación en sentido opuesto de los niveles

neuronales de las isoformas TrkB-FL y TrkB-T1 mediante dos mecanismos: la inversión del balance entre los ARNm de las isoformas, que da lugar a un aumento en la expresión de TrkB-T1 en detrimento de la de TrkB-FL, y la proteólisis por calpaína de TrkB-FL, que reduce los niveles del receptor activo y produce una proteína

5 truncada de tamaño similar a TrkB-T1 y que, al igual que ella, podría actuar como un dominante negativo (Vidaurre et al., 2012). El aumento de TrkB-T1 se ha observado en modelos celulares y animales de excitotoxicidad, y también en necropsias de pacientes fallecidos a consecuencia de una ECV, apoyando la relevancia de este mecanismo para la patología isquémica en humanos. Mediante el uso de vectores

10 lentivirales que revierten el desbalance entre las isoformas, se ha demostrado que los cambios en la expresión de TrkB son fundamentales en este proceso de muerte neuronal (Vidaurre et al., 2012). Estos resultados apuntan a que el mantenimiento de los niveles del receptor activo de neurotrofinas TrkB-FL podría ser una estrategia terapéutica útil en numerosas patologías del SNC con un componente excitotóxico.

15 Concretamente, el desarrollo de péptidos neuroprotectores con TrkB-FL como diana permitiría el tratamiento y prevención del daño neuronal causado por patologías del SN en las que se encuentra alterada la vía de supervivencia BDNF/TrkB, como patologías del SNC asociadas con el proceso de excitotoxicidad, ECVs como el ictus o la isquemia cerebral, o bien en el daño neuronal causado por falta de soporte

20 neurotrófico, hipoxia, desconexión o daño mecánico consecuencia de traumatismos cerebrales y/o medulares. En el caso del ictus o isquemia cerebral, estos métodos terapéuticos podrían constituir un complemento y/o alternativa a las actuales terapias trombolíticas, las únicas existentes hoy en día.

25 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un péptido neuroprotector, a partir de ahora denominado "péptido neuroprotector de la invención", caracterizado por consistir en 15 aminoácidos de la secuencia de TrkB-FL humana (SEQ ID NO: 1) correspondiente a

30 las posiciones 458 hasta 472 de la secuencia canónica (NCBI Gene ID: 4915, UniProt Q16620). La proteína TrkB-FL está altamente conservada en mamíferos y la secuencia del péptido neuroprotector de la invención es idéntica en las proteínas de rata (NCBI Gene ID: 25054, UniProt Q63604) y ratón (NCBI Gene ID:18212, UniProt P15209), donde ocupa los residuos 457 hasta 471. El péptido neuroprotector de la

35 invención ha sido diseñado para interferir en el procesamiento de TrkB-FL por

proteasas y, en particular, por la calpaína. La reducción del procesamiento de TrkB-FL incrementa sus niveles en la membrana plasmática neuronal y, de esta forma, aumenta la capacidad de respuesta de estas células a la neurotrofina BDNF, que activa diversas cascadas neuronales de señalización pro-supervivencia. La reducción del soporte neurotrófico es un factor común frecuente en situaciones patológicas de daño neuronal asociado al proceso de excitotoxicidad. Los estímulos causantes de esta forma de muerte celular pueden ser: accidentes cerebro-vasculares (ACVs, como el ictus isquémico o el ictus hemorrágico), lesiones cerebrales traumáticas (incluidas las lesiones por neurocirugía), tumores del SNC, efectos secundarios de su tratamiento oncológico, o patologías crónicas del sistema nervioso central asociadas con un proceso de excitotoxicidad (enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica o ELA).

Un resumen de los polinucleótidos y péptidos descritos en la presente invención se describe en la siguiente tabla:

Tabla 1. Listado de secuencias mencionadas en la invención.

Nombre	SEQ ID NO aminoacídica	SEQ ID NO nucleotídica
TrkB-FL 458-472	1	26
TrkB-FL 483-496	2	
TrkB-FL 542-556	3	
TrkB-FL 640-653	4	
c-Myc 408-421	5	
TFL ₄₅₇	6	27
TFL ₄₈₂	7	
TFL ₅₄₁	8	
TFL ₆₃₉	9	
TMyC	10	
MAP	11	
pAntp43-68/Penetratin	12	
Transportan/TP10	13	
SBP	14	

FBP	15	
TAT48-60	16	
TAT47-57	17	28
SynB1	18	
SynB3	19	
pVEC	20	
Pep-1	21	
OctaArginine	22	
NonaArginine	23	
CADY	24	
RVG	25	

Así un primer objeto de la invención es un péptido neuroprotector, a partir de ahora denominado “péptido neuroprotector de la invención”, caracterizado por consistir en 15 aminoácidos de la secuencia de TrkB-FL correspondientes a las posiciones 458-472 de la secuencia canónica humana o las posiciones 457-471 de las secuencias de rata (NCBI Gene ID: 25054, UniProt Q63604) y ratón (NCBI Gene ID:18212, UniProt P15209) (SEQ ID NO: 1).

La expresión: “péptido neuroprotector”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a una secuencia de aminoácidos capaz de prevenir, mitigar o retrasar los procesos bioquímicos que ocurren en el sistema nervioso y originan neurodegeneración o muerte neuronal de tipo apoptótica o necrótica.

La expresión “muerte celular inducida por excitotoxicidad” o “excitotoxicidad” se refiere a un proceso patológico por el cual las neuronas son dañadas y destruidas por la sobreactivación mediada por la unión a sus receptores de membrana de los neurotransmisores excitatorios, fundamentalmente glutamato o sus análogos farmacológicos: NMDA (en inglés, N-methyl-D-aspartate receptor), AMPA (en inglés, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) y ácido kaínico. La presencia en el sistema nervioso de niveles patológicamente elevados de glutamato, o sus análogos NMDA o kainato, puede provocar la excitotoxicidad al permitir que niveles elevados de iones de calcio entren en las neuronas. La entrada de Ca^{+2} en las células activa una serie de enzimas, incluyendo las fosfolipasas, las endonucleasas, y

proteasas tales como la calpaína que dañan las estructuras celulares, como las que componen el citoesqueleto, la membrana y el ADN. Otras contribuciones importantes al proceso de excitotoxicidad son la generación de radicales libres y la disfunción mitocondrial.

5

Preferentemente, dicho péptido neuroprotector comprende un “agente de internalización”; con el término “agente de internalización” se hace referencia a una molécula capaz de facilitar el paso de un péptido determinado a través de la barrera hematoencefálica y la membrana plasmática para permitir su acceso al interior de las neuronas y/o células gliales. Dicha molécula puede hallarse covalentemente unida o no a la secuencia de péptido neuroprotector. Como ejemplos no limitantes pueden citarse: ciclodextrina, poloxámeros, péptidos de unión al receptor de acetil colina, virus y VLPs (Virus Like Particles), Cereport (RMP-7), nanocarriers (incluyendo los polietilenglicolados: PEG-PLA, PEG-PCL, PEG-PHDCA, etc), o péptidos penetrantes celulares.

10

En una realización preferente de esta invención, el péptido neuroprotector de la invención está unido covalentemente a un péptido penetrante celular o CPP (*Cell Penetrating Peptide*) (Milletti, 2012; Regberg et al., 2013). Algunos ejemplos de CPPs pueden verse en la Tabla 2.

15

Tabla 2: Ejemplos de CPPs y sus secuencias. Abreviaturas: MAP: *model amphipathic peptide*; Antp: *Antennapedia*; SBP: *sequence signal-based peptide*; FBP, *fusion sequence-based peptide*; TAT: *HIV-1 trans-activating transcript*; pVEC: *vascular endothelial-cadherin*; RVG: *Rabies Virus Glycoprotein fragment*.

20

Nombre del péptido	SEQ ID NO aminoacídica
MAP	11
pAntp43–68/Penetratin	12
Transportan/TP10	13
SBP	14
FBP	15
TAT48–60	16

TAT47-57	17
SynB1	18
SynB3	19
pVEC	20
Pep-1	21
OctaArginine	22
NonaArginine	23
CADY	24
RVG	25

En la presente invención “CPPs” o “péptidos penetrantes celulares”, se refiere a un grupo de péptidos cortos de menos de 30 aminoácidos que son capaces de penetrar la membrana junto con la carga que transportan hasta el interior celular sin producir efectos citolíticos; son péptidos con carga positiva, características anfipáticas, hidrofobicidad teórica, momento helicoidal o capaces de interactuar con membranas lipídicas y adoptar una estructura secundaria distintiva tras su asociación con lípidos. Los CPPs penetran en la célula fundamentalmente mediante endocitosis o macropinocitosis mediada por *rafts* lipídicos. Los CPPs son empleados como medio de transporte para introducir en las células moléculas bioactivas; normalmente mediante una unión covalente, aunque las uniones no covalentes también son posibles. Así, en una realización aún más preferente el péptido neuroprotector de la invención está unido al dominio básico de la proteína transactivadora Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), TAT47-57 (SEQ ID NO: 17) o TAT48-60 (SEQ ID NO: 16).

En un objeto particular de la invención la secuencia del péptido neuroprotector objeto de la presente invención, es un péptido quimérico con secuencia SEQ ID NO: 6 y se caracteriza por comprender:

- i. la secuencia de 11 aminoácidos del CPP TAT47-57 (SEQ ID NO: 17), fusionada con
- ii. la secuencia de 15 aminoácidos de TrkB-FL correspondiente a las posiciones 458-472 de la proteína humana (SEQ ID NO: 1),

con la particularidad de que la arginina C-terminal de la secuencia Tat es también el primer aminoácido de la secuencia de TrkB-FL.

5 Como "péptido quimérico" o "proteína de fusión" se entiende en la presente invención, un péptido creado a partir de la unión en un gen de fusión o por síntesis química de dos o más polinucleótidos con actividades conocidas diferentes. Cuando se emplea un "gen de fusión" nos refererimos a genes o fragmentos de genes, que originalmente
10 codifican para péptidos separados, pero cuya traducción resulta en un péptido individual con propiedades funcionales derivadas de cada una de los péptidos originales. Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los péptidos o polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica u homóloga a las secuencias descritas en la presente invención; preferentemente, el porcentaje de identidad es entre 70-95%, aún más preferentemente el porcentaje de identidad es
15 entre 90-95%, y más preferentemente aún el porcentaje de identidad es entre 95-99%.

La fusión proteica o peptídica es una técnica que se emplea frecuentemente en biología molecular. Habitualmente está relacionada con la producción de proteínas o péptidos en sistemas vivos, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, en bacterias,
20 levaduras, o células de mamífero. La inclusión de la secuencia codificante de interés en fase, respetando la pauta de lectura, permite la producción de una proteína o péptido quimérico.

Un péptido de fusión o quimérico, como el de la presente invención, se purifica con
25 facilidad, empleando para ello las características de las proteínas y los péptidos de unirse a una matriz cromatográfica, o de precipitar en ciertas condiciones. La purificación de un péptido de fusión puede realizarse mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos a, columnas de sefarosa-glutation.

30 La síntesis química de polipéptidos de pequeño tamaño es conocida por el experto en la materia y puede realizarse según métodos convencionales conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo mediante métodos de síntesis de péptidos en fase sólida (Stewart and Young, 1984; Bodanzsky and Bodanzsky, 1994; Lloyd-Williams et al., 1997), la síntesis en solución, una combinación de los métodos de síntesis en fase
35 sólida y en solución o la síntesis enzimática (Kullmann, 1980).

El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente a la semejanza o identidad entre los nucleótidos de posiciones equivalentes en dos o más polinucleótidos.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos polipéptidos que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, ClustalW y FASTA. Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo, en general, se asume que valores de similitud o identidad superiores al 60% indican estructuras homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80% mantendrán las mismas propiedades de dicho polipéptido.

Además, con la información suministrada, un experto en la materia es capaz de combinar las mutaciones para generar nuevas variantes del péptido neuroprotector con actividad similar o mejorada. Una posibilidad es la sustitución conservativa de los aminoácidos; así, por ejemplo, se entiende por sustitución conservativa aquella que mantiene las características de polaridad y carga del aminoácido sustituido. Por ejemplo, lisina y arginina son aminoácidos cuyas cadenas laterales están cargadas positivamente a pH neutro, por lo que se acepta que los cambios de lisina por arginina o viceversa representan cambios conservativos. Se han clasificado los 20 aminoácidos que constituyen la base de todas las proteínas naturales de acuerdo a su conservatividad en grupos: (i) aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano); (ii) aminoácidos alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina); (iii) aminoácidos ionizables básicos (histidina, lisina y arginina); (iv) aminoácidos ionizables ácidos (ácidos aspártico y glutámico); (v) amidas de aminoácidos ácidos (asparagina y glutamina); y (vi) aminoácidos hidroxilados (serina y treonina). Algunos autores incluirían la cisteína en este último grupo.

Otro objeto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada, de ahora en adelante “secuencia nucleotídica de la invención”, que codifica para el péptido de la invención, o a la secuencia nucleotídica complementaria a dicha secuencia

nucleotídica, sin que ello limite a otras secuencias nucleotídicas que por la degeneración del código genético pudieran generarse y den origen a la misma secuencia polipeptídica. Las secuencias SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 describen las secuencias nucleotídicas a partir de las cuales derivan las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1, y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se refieren de forma intercambiable a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de los mismos) enlazados a través de enlaces fosfodiéster (o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de la misma). El término polinucleótido incluye ADN genómico o ADN codificante de cadena doble o sencilla, ARN, cualquier polinucleótido sintético y manipulado genéticamente y ambos tanto la cadena codificante como la antisentido (aunque sólo se destaca la cadena codificante en la presente memoria). Esto incluye moléculas de cadena sencilla y de doble cadena, como por ejemplo, híbridos de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN.

La secuencia nucleotídica de la invención puede obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencional ampliamente conocidos en el estado de la técnica.

La secuencia nucleotídica de la invención, adicionalmente a la secuencia codificante, puede llevar otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' ó 3', sitios de unión a ribosomas, secuencias estabilizadoras, secuencias de detección celular, etc. Estos polinucleótidos adicionalmente también pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que pueden ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de él o para permitir una mejor purificación del mismo.

Las secuencias de polinucleótidos de la invención pueden hallarse formando parte de vectores que permitan su multiplicación o clonaje así como su expresión. Dicho vector puede ser, por ejemplo un vector de clonación o un vector de expresión o un vector recombinante. El clonaje de la secuencia nucleotídica de la invención se puede

realizar empleando un vector de expresión o recombinante, o un plásmido. Estos vectores comprenden la secuencia nucleotídica de la invención o, en su caso, la secuencia polinucleotídica codificante para una proteína portadora y la secuencia nucleotídica de la invención, y una serie de secuencias codificantes para aminoácidos que son dianas de corte de proteasas. La ventaja de esta estructura es que, una vez producida la proteína o péptido de fusión, lisado el sistema de expresión y purificada ésta mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, cromatografía de afinidad, se puede escindir la proteína portadora del péptido de la invención mediante digestión con una proteasa y repurificar el péptido de la invención mediante el mismo sistema cromatográfico.

El término "vector", tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de transferir secuencias de ácidos nucleicos contenidas en la misma a la célula que trasduce y que se produce por medio de técnicas de biología molecular. Algunos ejemplos de vectores recombinantes son ADN lineal, ADN plasmídico, virus modificados, adenovirus/virus adenoasociados, vectores retrovirales y virales, etc.; todos ellos ampliamente descritos en la literatura y que pueden ser empleados siguiendo técnicas estándar de biología molecular o comprados a proveedores.

Los vectores o plásmidos pueden ser introducidos, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante transfección, transformación o infección de las células hospedadoras, como son, aunque sin limitarse a ellas, células vegetales, de mamífero, bacterias, levaduras o células de insecto. La introducción del vector de expresión en la célula hospedadora se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos físicos o biológicos para dar lugar a células transformadas o transfectadas. Dichos métodos biológicos incluyen, pero sin limitarse, el uso de vectores de ADN y ARN virales. La principal ventaja de los métodos físicos reside en que éstos no están asociados con procesos oncogénicos ni patológicos de virus. Sin embargo, los métodos físicos son menos precisos y, a menudo, resultan en inserciones de múltiples copias, integraciones aleatorias, interrupción de secuencias genéticas propias y foráneas, así como expresión impredecible. Entre los vectores virales más usados para la introducción de genes en células de mamífero, se encuentran, vectores de poxvirus, de herpes simplex, adenovirus, vectores asociados a adenovirus, etc.

Por ello, otra realización de la invención se refiere a un vector de expresión o un vector recombinante, de ahora en adelante "vector de la invención", que comprenden las secuencias nucleotídicas de la invención SEQ ID NO: 26 y/o SEQ ID NO: 27.

5 El término "vector de clonación", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de replicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

10

El término "vector de expresión", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector de clonación adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula, denominada célula huésped. Dicho ácido nucleico se encuentra, por lo general, unido operativamente a secuencias de control.

15

El término "vector recombinante", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo, de forma que la expresión del péptido neuroprotector se realiza directamente en el tejido o célula diana. Generalmente dicho vector es un virus, y es producido por la unión de diferentes fragmentos de ácidos nucleicos a partir de diferentes fuentes y cuya expresión da lugar a una partícula viral con capacidad infectiva compuesta característicamente de cápside proteica, genoma viral y proteínas asociadas al genoma viral; este virus está diseñado de tal forma que permite la expresión en el tejido o célula diana de las secuencias nucleotídicas o peptídicas de interés. La expresión en un tejido o célula de interés se realiza mediante la unión operativa del polinucleótido a secuencias de control, preferentemente secuencias de control específicas del tejido o célula donde se quiere expresar; preferentemente dichas secuencias de control son promotores o *enhancers* del SNC. Un vector recombinante según la invención puede, por tanto, emplearse tanto como herramienta biotecnológica para multiplicar el virus como emplearse en composiciones farmacéuticas como tratamiento farmacológico *per se*. Un vector recombinante típico se selecciona del grupo que consiste en un vector lentiviral, un vector adenoviral y/o un vector de virus adenoasociados.

35

El término "expresión" se refiere al proceso por el cual se sintetiza un polipéptido a partir de un polinucleótido. Incluye la transcripción del polinucleótido en un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de dicho ARNm en una proteína o un polipéptido. La expresión puede tener lugar en una célula hospedadora, pero también mediante
5 cualquier proceso de expresión proteica *in vivo*.

El término "célula hospedadora" o "célula huésped", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier organismo procariota o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de
10 ADN.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, una "célula hospedadora" o "célula huésped" incluye cualquier célula cultivable que puede ser modificada mediante la introducción de ADN no contenido de manera natural en la célula, de aquí en adelante
15 "célula hospedadora de la invención".

Preferiblemente, una célula hospedadora es aquella en la que el polinucleótido de la invención puede ser expresado, dando lugar a un polipéptido estable, modificado post-traduccionalmente y localizado en el compartimento subcelular apropiado. La elección
20 de una célula hospedadora adecuada puede también estar influida por la elección de la señal de detección. Por ejemplo, el uso de construcciones con genes reporteros (por ejemplo, *lacZ*, luciferasa, timidina quinasa o la proteína verde fluorescente "GFP") puede proporcionar una señal seleccionable mediante la activación o inhibición de la transcripción del gen de interés en respuesta a una proteína reguladora de la
25 transcripción. De cara a conseguir una selección o "screening" óptimo, el fenotipo de la célula hospedadora deberá ser considerado.

Una célula hospedadora de la presente invención incluye células procariotas y eucariotas. Entre las procariotas se incluyen organismos Gram negativos (por ejemplo,
30 *Escherichia coli*) o Gram positivos (por ejemplo, bacterias del género *Bacillus*). Las células procariotas se usarán, preferiblemente, para la propagación de la secuencia del control de la transcripción del vector que contiene el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención, lo que permitirá conseguir un mayor número de copias del vector conteniendo el(los) polinucleótido(s) objeto(s) de la invención. Entre las células
35 hospedadoras procariotas adecuadas para la transformación de este vector se

encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse a, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y otras especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. Las células eucariotas incluyen, entre otras, células de levadura, células de plantas, células de hongos, células de insectos, células de mamífero, y
5 células de organismos parásitos (por ejemplo, *Trypanosomas*). Tal y como se emplea en esta memoria, el término levadura no incluye sólo levadura en el sentido taxonómico estricto, es decir, organismos unicelulares, sino también hongos multicelulares similares a las levaduras u hongos filamentosos. Ejemplos de especies son *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Ustilago maydis*, con
10 *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* como organismos preferidos. Otras levaduras que pueden utilizarse en la producción de la(s) secuencia(s) polipeptídica(s) de la presente invención son *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Candida tropicalis*, y *Hansenula polymorpha*. Los sistemas de cultivo con células hospedadora de mamífero incluyen líneas celulares establecidas como las
15 células COS, células L, células 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), células madre embrionarias, con las células BHK, HeK o HeLa como células preferidas. Las células eucariotas son, preferiblemente, utilizadas para la expresión del gen recombinante mediante la aplicación de la secuencia de regulación de la transcripción o el vector de la presente invención.

20

Un cultivo de células hospedadoras se refiere al proceso de mantener y crecer las células hospedadoras. Los cultivos celulares necesitan condiciones controladas de temperatura, pH, porcentajes de gases (oxígeno y dióxido de carbono), así como la presencia de los nutrientes adecuados para permitir la viabilidad y la división celular.
25 Los cultivos celulares pueden desarrollarse en sustratos sólidos como el agar, o en medio líquido, lo que permite cultivar grandes cantidades de células en suspensión. La elección de un tipo celular y otro para la propagación del vector de la invención depende de las características de éste, tal y como es conocido en el estado de la técnica. Además, cuando el vector de la invención es un virus, los cultivos virales
30 además precisan de células hospedadoras que aporten la maquinaria celular y metabólica de la que carecen. Esto permite que el virus pueda no sólo mantenerse sino también multiplicarse por lo que la expresión del polinucleótido de la invención en dicho cultivo celular puede utilizarse para propagar el vector de la invención.

De esta manera, otro objeto de la invención es la célula que contiene al menos uno de los polinucleótidos de la invención, de ahora en adelante "célula hospedadora de la invención".

- 5 Una realización particular de la invención se refiere a la célula hospedadora de la invención que contiene al menos uno de los polinucleótidos de la invención SEQ ID NO: 26 ó SEQ ID NO: 27.

- 10 Así, otra realización de la invención se refiere al uso de la célula hospedadora de la invención para obtener el péptido neuroprotector de la invención, para reproducir y mantener el polinucleótido de la invención y/o para obtener el vector de la invención.

- 15 Métodos para la obtención del polipéptido neuroprotector de la invención son conocidos para el experto en el estado de la técnica. Estos comprenden tanto los métodos de cultivo de la célula hospedadora de la invención y posterior purificación del péptido, como métodos de síntesis química descritos anteriormente.

- 20 El término "purificar" tal y como se emplea en la descripción, se refiere al aislamiento y concentración del polipéptido de la invención respecto del resto de polipéptidos presentes en el medio de cultivo y de la célula hospedadora de la invención. El aislamiento del polipéptido de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque. Las técnicas de cromatografía pueden estar basadas en el peso molecular, la carga iónica (basada en el estado de ionización de los aminoácidos en las condiciones de trabajo), la afinidad de la proteína por determinadas matrices o columnas cromatográficas, o mediante etiquetas de purificación, y puede realizarse en columna, en papel o en placa. El aislamiento de la proteína puede realizarse, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato amónico, cromatografía líquida rápida (FPLC, del inglés "Fast Protein Liquid Chromatography") o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés "High Performance Liquid Chromatography"), empleando sistemas automatizados que reducen notablemente el tiempo de purificación e incrementan el rendimiento de la purificación.

- 35 La expresión "etiqueta de purificación" o "etiqueta de afinidad", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una secuencia de aminoácidos que ha sido

incorporada (generalmente, por ingeniería genética) a una proteína para facilitar su purificación. La etiqueta, que puede ser otra proteína o una secuencia corta de aminoácidos, permite la purificación de la proteína, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad. Etiquetas de purificación conocidas en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse a, el péptido de unión a calmodulina (CBP), la enzima glutatión-S-transferasa (GST) o una cola de residuos de histidina.

Otra realización de la invención se refiere al uso de la célula primera hospedadora de la invención para la obtención del polipéptido de la invención. Preferentemente, la célula hospedadora de la invención es una bacteria, más preferentemente *Escherichia coli*.

Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica o medicamento, de ahora en adelante "composición farmacéutica de la invención", que comprende al menos uno de los siguientes:

- i. el péptido neuroprotector de la invención,
- ii. el polinucleótido de la invención,
- iii. el vector de la invención.

En una realización más preferente la composición farmacéutica comprende el péptido neuroprotector de la invención, y de forma más preferentemente comprende los péptidos con secuencia SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 6.

Otra realización es el uso del péptido neuroprotector de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica o medicamento.

En otra realización más preferente la composición farmacéutica comprende el vector de la invención, de tal modo que el péptido de la invención pueda expresarse directamente en los tejidos y/o células diana deseados. En una realización aún más preferente el vector de la invención es un vector lentiviral, un vector adenoviral y/o un vector de virus adenoasociados.

Otra realización es el uso del vector de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica o medicamento.

La presente invención también hace referencia al péptido neuroprotector de la invención, así como el polinucleótido que lo codifica y el vector que lo expresa, para su uso en medicina. Así mismo, la presente invención también hace referencia al uso del péptido neuroprotector objeto de la invención, así como al polinucleótido de la invención, el vector de la invención y/o la célula hospedadora de la invención para la preparación o fabricación de una composición farmacéutica o medicamento.

En la presente invención, el término: “medicamento o composición farmacéutica”, tal y como se usa hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento y/o curación de enfermedades en el hombre y/o los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o un medicamento caracterizado por comprender el péptido de la invención o los polinucleótidos y vectores que permiten su expresión en el organismo a tratar, de forma que el péptido neuroprotector ejerza su función en el tejido/célula diana.

En una realización preferida, la composición farmacéutica o medicamento de la invención además comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización más preferida, la composición farmacéutica o medicamento de la invención además comprende un adyuvante. En una realización aún más preferida, la composición farmacéutica o medicamento de la invención además comprende otro principio activo (principio activo adicional).

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de aumentar la supervivencia neuronal en situaciones de excitotoxicidad, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, para el caso de una composición terapéutica, por las características propias de los compuestos, la ruta, forma y frecuencia de administración de los mismos, y otros factores, incluyendo la edad, estado del paciente, así como la severidad de la alteración o trastorno.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos y activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de

almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función como colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo, es el caso del fosfato de calcio dibásico, la función
5 desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término “vehículo”, al igual que el excipiente, hace referencia a una sustancia que se emplea en la composición farmacéutica o medicamento para diluir cualquiera de los
10 componentes de la presente invención comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El “vehículo farmacológicamente aceptable” es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la
15 forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.

En esta memoria, el término “adyuvante” se refiere a un agente que aumenta el efecto neuroprotector del péptido de la invención cuando es suministrado de forma conjunta a
20 éste o bien formando parte de un mismo protocolo de tratamiento.

En otra realización particular, dicha composición farmacéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada
25 por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de
30 administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

Otra realización de la presente invención es el uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para la prevención y/o tratamiento de la muerte celular inducida por excitotoxicidad.

5 La “muerte celular inducida por excitotoxicidad” o “excitotoxicidad”, como se ha descrito anteriormente en esta invención, es un proceso patológico por el cual las neuronas son dañadas y destruidas por las sobreactivaciones de receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato, como el receptor NMDA (en inglés, *N-methyl-D-aspartate receptor*) y los receptores AMPA (en inglés, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-*
10 *isoxazolepropionic acid receptor*) y kainato. Las excitotoxinas como el NMDA y el ácido kaínico que se unen a estos receptores, así como altos niveles patológicos de glutamato, pueden provocar la excitotoxicidad al permitir que niveles elevados de iones de calcio entren en la célula. La entrada de Ca^{2+} en las células activa una serie de enzimas, incluyendo las fosfolipasas, las endonucleasas, y proteasas tales como la
15 calpaína. Estas enzimas continúan dañando estructuras celulares como las que componen el citoesqueleto, la membrana y el ADN.

Una realización preferente de la presente invención, hace referencia al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para la prevención y/o
20 tratamiento del daño neuronal causado por una patología del SNC asociada a excitotoxicidad, como pueden ser accidentes cerebro-vasculares (ACVs, como el ictus isquémico o el ictus hemorrágico), lesiones cerebrales traumáticas (incluidas las lesiones por neurocirugía), hipoxia, hipoglucemia, epilepsia, tumores del SNC y su tratamiento oncológico, patologías crónicas del sistema nervioso central asociadas con
25 un proceso de excitotoxicidad (enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica o ELA), etc. La excitotoxicidad también es crítica en patologías oculares como el glaucoma, la retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica y traumatismos del nervio óptico. Preferentemente, el uso de la composición farmacéutica es para prevenir o tratar un ACV.

30

La expresión: “accidentes cerebro-vasculares” o “ACVs”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a un suceso que provoca que el flujo de sangre a una parte del cerebro se detenga o limite causando muerte celular. Los ACVs se clasifican en función del mecanismo de bloqueo del flujo sanguíneo, así se habla de
35 ictus isquémico cuando el vaso sanguíneo se encuentra bloqueado por la formación de

un trombo (accidente cerebrovascular trombótico) o bien el trombo procede de otra parte del cuerpo (embolia cerebral o accidente cerebrovascular embólico). Por otro lado, se habla de ictus hemorrágico cuando la interrupción del flujo sanguíneo es por una hemorragia, provocada por la rotura de un vaso sanguíneo por traumatismo o por defectos congénitos; los defectos congénitos causantes de un ictus hemorrágico pueden ser, entre otros, el aneurisma (un área débil en la pared de un vaso sanguíneo que provoca que éste protruya o se abombe) y la malformación arteriovenosa o MAV (una conexión anormal entre las arterias y las venas en el cerebro). Preferentemente, las ACVs se seleccionan de entre las siguientes: ictus o infarto cerebral, ataque isquémico transitorio, hemorragias intracerebrales, incluyendo la subaracnoidea y la demencia vascular.

La expresión “lesiones cerebrales traumáticas”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a un daño provocado al cerebro provocado por un golpe o una violenta sacudida a la cabeza. Las lesiones se clasifican en lesiones penetrantes y lesiones cerradas de cabeza. Las lesiones penetrantes se producen por la introducción de un objeto ajeno en el cerebro (como por ejemplo, una bala o el bisturí de un neurocirujano) que causa daños a regiones específicas del mismo a lo largo de la trayectoria de penetración del objeto. Las lesiones cerradas de cabeza incluyen aquellas derivadas de golpes en la cabeza, como por ejemplo, un accidente de coche o una caída.

La expresión “hipoxia”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a aquella situación en la que el organismo o una parte del mismo, como puede ser el SNC, no recibe un aporte suficiente de oxígeno. Puede producirse como consecuencia de diversas circunstancias como la isquemia; la hipoxia hipoxémica que puede ser causada por la alcalosis respiratoria, por el corto-circuito (“shunting”) de la circulación sanguínea fisiológico o patológico, y/o por problemas de ventilación pulmonar debidos a lesiones pulmonares, alteración de la relación ventilación perfusión (V/Q ratio) y/o circunstancias físicas como la exposición a grandes altitudes (alpinismo) o profundidades (buceo); la alteración de la tasa de disociación del O₂ de la hemoglobina; la anemia; el envenenamiento por monóxido de carbono; el envenenamiento por cianuro; y/o la ingesta de algunos compuestos químicos (como el nitrito sódico) o fármacos.

La expresión “hipoglucemia”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a una concentración de glucosa en la sangre anormalmente baja, asociada generalmente a alteraciones y/o pérdida del conocimiento. El normal funcionamiento del SNC y las neuronas es dependiente de un aporte continuo de glucosa; si la cantidad de glucosa en sangre cae el SNC es uno de los primeros órganos afectados. El conjunto de los efectos sobre el cerebro y el SNC son conocidos como neuroglicopenia e incluyen: la reducción de la eficiencia mental (valores por debajo de 65mg/dl de la concentración de glucosa en sangre), deterioro en las capacidades motoras y de razonamiento (valores por debajo de 40mg/dl), convulsiones, e incluso coma (valores por debajo de 10mg/dl). La hipoglucemia severa o prolongada puede producir daños permanentes en el SNC, lo que incluye la alteración de la función cognitiva, del control motor, e incluso de la consciencia. Las causas de la hipoglucemia pueden ser múltiples, y se incluyen, entre otras: el ayuno prolongado voluntario o secundario a una enfermedad (como la diarrea), la hiperinsulinemia (debida a un fallo en la administración de insulina de por ejemplo un individuo con diabetes, hiperinsulinemia congénita, tumores pancreáticos secretores de insulina, hipoglucemia reactiva, síndrome idiopático postprandial), la sepsis, la enfermedad de Addison, el hipopituitarismo congénito, las enfermedades metabólicas (enfermedad de almacenamiento de glucógeno, enfermedades de oxidación de los ácidos grasos, etc), la ingestión de ciertos productos químicos (alcohol, propanolol, sulfonilureas, algunos medicamentos), la insuficiencia adrenal adquirida, etc.

La expresión “epilepsia”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a un trastorno provocado por un desequilibrio en la actividad eléctrica de las neuronas de alguna zona del cerebro. Se caracteriza por uno o varios trastornos neurológicos que dejan una predisposición en el cerebro a padecer convulsiones recurrentes, que suelen dar lugar a consecuencias neurobiológicas, cognitivas y psicológicas. El papel de la muerte inducida por excitotoxicidad en la epilepsia está asociado con la activación persistente de la ruta del glutamato, los receptores NMDA y de kainato en las diferentes crisis epilépticas.

La expresión “tumores del sistema nervioso central”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a una masa de células transformadas, con crecimiento y multiplicación anormales localizada en el encéfalo y/o médula espinal. Su origen puede estar en las células cerebrales, en las membranas alrededor del

cerebro (meninges), o en los nervios o glándulas de la cabeza. El tratamiento de los tumores mediante los tratamientos habituales (tratamiento oncológico) suele conllevar la muerte celular de los tejidos circundantes sanos, tanto si se trata del uso de quimioterapéuticos como radiación (efecto *by-stander*).

5

La expresión “patologías crónicas del sistema nervioso central”, tal y como se emplea en la presente invención hace referencia a un conjunto de enfermedades que afectan principalmente al encéfalo y/o médula espinal en su patología y cuyo desarrollo en el tiempo es prolongado. Entre estas enfermedades se encuentran las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, el Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En todas ellas se ha visto la implicación del mecanismo de supervivencia celular basado en la ruta de señalización BDNF/TrkB, en la que el péptido neuroprotector de la invención interfiere aumentando el tiempo de respuesta pro-supervivencia de la misma.

10
15

La expresión “glaucoma”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a una patología ocular que se caracteriza por el aumento patológico de la presión intraocular, por falta de drenaje del humor acuoso, y que deriva finalmente en una neuropatía óptica que se caracteriza por la pérdida progresiva de las fibras nerviosas del nervio óptico y cambios en su aspecto.

20

La expresión “retinopatía diabética”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a una complicación ocular de la diabetes que está causada por el deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan la retina; el daño en los vasos sanguíneos puede acompañarse de proliferación de tejido fibroso en la retina, lo que conlleva un deterioro de la visión.

25

La expresión “neuropatía óptica isquémica”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a una pérdida repentina de la visión central, la visión lateral o ambas debido a una disminución o interrupción del flujo sanguíneo hacia el nervio óptico.

30

Otra realización preferente de la presente invención, hace referencia al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para la prevención y/o tratamiento del daño neuronal causado por un ACV. En una realización aún más preferente el ACV es un ictus isquémico.

35

Otra realización preferente de la presente invención, hace referencia al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para la prevención y/o tratamiento del daño neuronal causado por una lesión cerebral traumática.

5

Otra realización preferente de la presente invención, hace referencia al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención, caracterizado por que se emplea sólo o en combinación con otros medicamentos para prevenir y/o tratar el daño causado en el SNC por excitotoxicidad, y más preferentemente, para prevenir y/o

10 tratar el ictus isquémico. Por ejemplo, y de manera no limitante puede hallarse en combinación con: medicamentos anticoagulantes (como heparina, warfarina, ácido acetilsalicílico, clopidogrel, acenocumarol, dabigatrán, rivaroxaban, apixaban, fondaparinux, etc.), medicamentos antihipertensivos (como captopril, enalapril, lisinopril, ramipril, valsartán, telmisartán, losartán, irbesartán, olmesartán,

15 acetazolamida, vorzolamida, cetoconazol, amilorida, triamtereno, espironolactona, canrenoato, eplerenona, manitol, alprenolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol, penbutolol, pindolol, propranolol, timolol, sotalol, acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, celiprolol, esmolol, metoprolol, nebivolol, butaxaminam, dihidropiridinas (bepidilo, mibefradilo, amlodipino, felodipino, nicardipino) y no

20 dihidropiridinas, etc.), medicamentos trombolíticos (como el activador del plasminógeno tisular (tPA), lanoteplasa, reteplasa, estafilocinasa, estreptocinasa (SK), tenecteplasa, urocinasa, etc), también se incluyen aquí otros péptidos conocidos con propiedades neuroprotectoras, como Tat-NR2B9c o NA-1.

25 En una realización preferente, la composición farmacéutica o medicamento de la invención se usa en medicina. Preferentemente, se usa en la prevención y/o tratamiento del daño neuronal. Aún más preferentemente, dicho daño neuronal es causado por una patología del SNC asociada a excitotoxicidad. Y más preferentemente aún, la excitotoxicidad está causada por un ACV, y más

30 preferentemente aún por un ictus isquémico.

Otra realización de la presente invención hace referencia a un método para la prevención y/o el tratamiento del daño neuronal caracterizado por comprender la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición

35 farmacéutica de la invención. Aún más preferentemente, dicho daño neuronal es

causado por una patología del SNC asociada a excitotoxicidad. Preferentemente, dicho daño neuronal es causado por un ACV.

5 La presente invención también hace referencia a un método para la prevención y/o el tratamiento de ACVs y enfermedades del SNC asociadas a excitotoxicidad, caracterizado por comprender la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención.

10 La presente invención también hace referencia a un método para la prevención y/o el tratamiento de un ACV, preferentemente la isquemia cerebral, y/o una lesión traumática cerebral o medular, caracterizado por comprender la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención.

15 El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar o reducir la aparición de daños neuronales causados por la excitotoxicidad. El término “tratamiento” supone combatir los daños neuronales causados por la excitotoxicidad, para estabilizar el estado de los individuos o prevenir daños posteriores.

20

Otra realización de la presente invención hace referencia a un método para prevenir y/o tratar el daño isquémico caracterizado por comprender la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención empleada sola o combinada con otros medicamentos para prevenir y/o tratar el daño
25 provocado por excitotoxicidad, preferentemente un ACV y más preferentemente aún un ictus isquémico; por ejemplo, y de manera no limitante, puede hallarse en combinación con: medicamentos anticoagulantes (como heparina, warfarina, ácido acetilsalicílico, clopidogrel, acenocumarol, dabigatrán, rivaroxaban, apixaban, fondaparinux, etc), medicamentos antihipertensivos (como captopril, enalapril,
30 lisinopril, ramipril, valsartán, telmisartán, losartán, irbesartán, olmesartán, acetazolamida, vorzoramida, cetoconazol, amilorida, triamtereno, espironolactona, canrenoato, eplerenona, manitol, alprenolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol, penbutolol, pindolol, propranolol, timolol, sotalol, acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, celiprolol, esmolol, metoprolol, nebivolol, butaxaminam,
35 dihidropiridinas (bepridilo, mibefradilo, amlodipino, felodipino, nicardipino) y no

dihidropiridinas, etc), medicamentos trombolíticos (como el activador del plasminógeno tisular (tPA), lanoteplasa, reteplasa, estafilocinasa, estreptocinasa (SK), tenecteplasa, urocinasa, etc), también se incluyen aquí otros péptidos con propiedades neuroprotectoras conocidas como son Tat-NR2B9c o NA-1.

5

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

15 Descripción de las figuras

Fig. 1. Péptidos Tat diseñados. A. Secuencia parcial de la proteína TrkB-FL de rata (aminoácidos 401-821) indicando la posición de los residuos incluidos en los distintos péptidos Tat diseñados (cajas grises), así como su región transmembrana (aminoácidos 430-453, *itálica*) y el dominio tirosina quinasa (aminoácidos 537-806, **negrita**). Esta secuencia tiene una identidad del 97,6% respecto a la secuencia humana correspondiente (aminoácidos 402-822) y del 100% para los residuos incluidos en los péptidos Tat. **B.** Secuencia de los péptidos Tat diseñados. Los 11 aminoácidos correspondientes a la proteína Tat de HIV ocupan posiciones N-terminales y son comunes a todos los péptidos (*itálica*). Las secuencias correspondientes a TrkB-FL ocupan posiciones C-terminales, indicándose en cada caso las posiciones del primer y último aminoácido contenido de acuerdo a la numeración de la proteína de rata. En el caso de los péptidos TFL₄₅₇ (con SEQ ID NO 6, correspondiente a la unión del CPP TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento TrkB-FL 458-472 humano, SEQ ID NO 1) y TFL₅₄₁ (con SEQ ID NO 8, correspondiente a la unión del CPP TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento TrkB-FL 542-556 humano, SEQ ID NO 3), la arginina C-terminal de la secuencia Tat es también el primer aminoácido de la secuencia de 15 aminoácidos de TrkB-FL contenida en los mismos. Los péptidos TFL₄₈₂ (con SEQ ID NO 7, correspondiente a la unión del CPP TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento TrkB-FL 483-496

20

25

30

35

humano, SEQ ID NO 2) y TFL₆₃₉ (con SEQ ID NO 9, correspondiente a la unión del CPP TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento TrkB-FL 640-653 humano, SEQ ID NO 4), como los anteriores de 25 aminoácidos, sólo contienen 14 aminoácidos de TrkB-FL. Se muestran en negrita los aminoácidos de TFL₄₅₇ también presentes en la isoforma TrkB-T1. En el péptido control TMyC (con SEQ ID NO 10, correspondiente a la unión del CPP TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento c-Myc 408-421 humano, SEQ ID NO 5), las secuencias Tat están unidas a los aminoácidos 408-421 del factor de transcripción c-Myc.

10 **Fig. 2. Permeabilidad del péptido TMyC en neuronas.** Cultivos primarios de neuronas corticales embrionarias de rata de 13 DIVs fueron incubados durante 1 h con el péptido TMyC (15 µM) marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (C y D) y comparados con cultivos control que no recibieron el péptido (A y B). Las células fueron fijadas, permeabilizadas y analizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos para la proteína neuronal NeuN. Las imágenes que se muestran son secciones individuales de 0,5-1 µm de grosor de microscopía confocal. Barra de escala: 10 µM.

20 **Fig. 3. Especificidad de la interferencia mediada por el péptido TFL₄₅₇ sobre el procesamiento de TrkB-FL inducido en condiciones de excitotoxicidad.** A. Cultivos primarios de neuronas corticales de rata de 13 DIVs fueron preincubados durante 30 min con los péptidos TMyC o los distintos péptidos TFL (25 µM) y tratados a continuación con NMDA (100 µM) y glicina (10 µM) durante 2 h según se indica. Cultivos en los que el pretratamiento con los péptidos Tat fue omitido fueron utilizados como control. Se analizaron mediante *immunoblot* los niveles de TrkB-FL (*Mr* 145 kDa) con el anticuerpo TrkB-ECD, que reconoce una región extracelular común a todas las isoformas de TrkB incluyendo las formas truncadas (*trkB*; *Mr* 95 kDa). Como control también analizamos la enolasa específica neuronal (NSE), una proteína neuronal que no es procesada por calpaína. B. Cuantificación de la interferencia por TFL₄₅₇ del procesamiento de TrkB-FL por calpaína inducido en condiciones de excitotoxicidad. Los niveles de TrkB-FL se determinaron mediante análisis densitométrico de las bandas presentes en los *immunoblots* y se normalizaron respecto a los de la proteína NSE. Los resultados aparecen representados como porcentaje del valor obtenido en neuronas no preincubadas con péptido ni tratadas con NMDA, al que se le asignó arbitrariamente el 100%. Se representan los valores medios ± s.e.m. de 4

experimentos independientes y los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de ANOVA seguida de un test *post-hoc* HSD de Tukey, comparando los niveles obtenidos en cultivos preincubados con los distintos péptidos respecto a los correspondientes no preincubados, tratados o no con NMDA. Solo se encontraron
5 diferencias significativas para TFL₄₅₇ (* $p < 0,05$) pero no para el resto de cultivos tratados con NMDA y preincubados con TMyc, TFL₄₈₂, TFL₅₄₁ o TFL₆₃₉ o para los no sometidos a excitotoxicidad.

**Fig. 4. Efecto neuroprotector de la preincubación con el péptido TFL₄₅₇ sobre la
10 muerte neuronal inducida en condiciones de tratamiento crónico con NMDA.** Cultivos primarios neuronales de 13 DIVs fueron preincubados durante 30 min con los péptidos TMyc y: TFL₄₅₇ (A), TFL₄₈₂ (B), TFL₅₄₁ (C) o TFL₆₃₉ (D), (todos a concentración: 25 μ M) y tratados con NMDA como anteriormente durante 0, 2, 4 ó 6 h. La viabilidad neuronal se estableció por el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio MTT y los
15 resultados se presentan como valores relativos respecto a los obtenidos en los cultivos control no tratados con NMDA, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Para establecer la contribución de las células gliales presentes en los cultivos mixtos a la viabilidad celular total, cultivos hermanos fueron tratados en paralelo con NMDA 400 μ M y glicina 10 μ M durante 24 h, condiciones que inducen la muerte neuronal en su
20 totalidad sin afectar a la viabilidad de las células gliales. La viabilidad neuronal se calculó sustrayendo este valor de absorbancia de los obtenidos para cada una de las condiciones estudiadas. Se muestran valores medios \pm s.e.m. ($n=11$, TMyc y TFL₄₅₇; $n=7$, TFL₅₄₁ y FL₆₃₉; $n=3$, TFL₄₈₂). Los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U-Mann Whitney, comparando para
25 cada uno de los tiempos de tratamiento con NMDA la viabilidad neuronal de los cultivos preincubados con TMyc o los diferentes TFLs (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

**Fig. 5. Dependencia de la dosis de péptido TFL₄₅₇ para los efectos ejercidos
30 sobre el procesamiento de TrkB-FL y la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad.** Neuronas corticales de rata fueron preincubadas como anteriormente con los péptidos TMyc o TFL₄₅₇ (5, 15 ó 25 μ M) y tratadas a continuación con NMDA (100 μ M) y glicina (10 μ M) durante 2 (A) ó 4 h (B). A. Análisis mediante *immunoblot* de los niveles de TrkB-FL con el anticuerpo TrkB-ECD, de la forma activa del factor de transcripción pro-supervivencia CREB mediante un fosfo-anticuerpo específico para su
35 Ser 133 (pCREB) y NSE. Se muestra un cultivo no tratado con péptido ni NMDA como

control. **B.** Cuantificación mediante el ensayo de MTT de la viabilidad neuronal en cultivos preincubados con distintas concentraciones de péptido y tratados con NMDA. Los resultados se presentan como valores relativos respecto a los obtenidos en cultivos control pretratados con una concentración igual del mismo péptido pero no tratados con NMDA, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. En todos los casos, se muestran valores medios \pm s.e.m. (n=6). Los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U de Mann Whitney, comparando para cada una de las concentraciones de péptido la viabilidad neuronal de los cultivos tratados con NMDA y preincubados con TMyc o TFL₄₅₇ (*p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001).

Fig. 6. Cinética de la interferencia mediada por el péptido TFL₄₅₇ del procesamiento de TrkB-FL inducido en condiciones de excitotoxicidad. **A.** Cultivos primarios neuronales fueron preincubados como anteriormente durante 30 min con los péptidos TMyc o TFL₄₅₇ (25 μ M) y tratados a continuación con NMDA (100 μ M) y glicina (10 μ M) durante 0, 2, 4 ó 6 h. Los extractos proteicos se analizaron por *immunoblot* con el anticuerpo TrkB-ECD, o anticuerpos específicos para la isoforma TrkB-T1, pCREB, espectrina y NSE. Cuantificación de la interferencia por TFL₄₅₇ del procesamiento por calpaína de TrkB-FL (**B**) y de la inactivación de CREB (**C**) inducidos en condiciones de excitotoxicidad. Los niveles de TrkB-FL y pCREB se determinaron mediante análisis densitométrico de las bandas presentes en los *immunoblots* y se normalizaron respecto a los de la proteína NSE. Los resultados aparecen representados como porcentaje del valor obtenido en neuronas sin tratar con NMDA, al que asignamos un valor arbitrario del 100%. Se representan los valores medios \pm s.e.m. de 5 experimentos independientes y los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U de Mann Whitney, comparando los niveles obtenidos en cultivos tratados con NMDA y preincubados con TMyc o TFL₄₅₇ (*p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001).

Fig. 7. Efecto neuroprotector de la transducción del péptido TFL₄₅₇ añadido posteriormente a la inducción de muerte neuronal mediante tratamiento agudo con NMDA. Cultivos primarios neuronales de 13 DIVs fueron tratados con NMDA (50 μ M) y glicina (10 μ M) durante 1 h. A continuación este medio fue sustituido por medio condicionado libre de agonistas conteniendo el antagonista del NMDAR DL-AP-5 (200 μ M) y los péptidos TFL₄₅₇ o TMyc (15 μ M). La viabilidad neuronal se estableció como

anteriormente por el ensayo de MTT 20 h después del cambio de medio y los resultados se presentan como valores relativos respecto a los obtenidos en los cultivos incubados con TMyc y no tratados con NMDA, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Se representan valores medios \pm s.e.m. de 5 experimentos
5 independientes. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada, comparando la viabilidad de los cultivos tratados con NMDA e incubados con TMyc o TFL₄₅₇ (**p*<0,05).

**Fig. 8. Comparación del efecto neuroprotector del péptido TFL₄₅₇ y de los
10 inhibidores de calpaína.** Cultivos de neuronas corticales de rata fueron preincubados con los inhibidores de calpaína, calpeptina (Calp) e inhibidor III (CIII; ambos a 10 μ M) según se indica y, 30 min después con los péptidos TMyc o TFL₄₅₇ (25 μ M). Pasados 30 min adicionales, los cultivos se trataron con NMDA como anteriormente durante 4 h. La viabilidad neuronal se estableció por el ensayo de MTT y los resultados se
15 presentan como valores relativos respecto a los obtenidos en los cultivos control preincubados con TMyc y tratados de igual manera pero no con NMDA, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Se muestran valores medios \pm s.e.m. (n=10). Los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U de Mann Whitney, comparando la viabilidad neuronal de los
20 cultivos preincubados con TMyc y tratados con NMDA, preincubados o no con inhibidores de calpaína (**p*<0,05), o la de aquellos preincubados con TMyc o TFL₄₅₇ para cada una de las condiciones (***p*<0,01, ****p*<0,001).

Ejemplos:

25

Ejemplo 1. Diseño de un péptido inhibidor del procesamiento del receptor TrkB-FL

En primer lugar se realizó un análisis bioquímico detallado de los fragmentos N-
30 terminales de TrkB-FL generados por calpaína en cultivos primarios de neuronas corticales de rata sometidos a excitotoxicidad, tanto para el receptor endógeno como para la proteína HA-TrkB-FL recombinante expresada mediante vectores lentivirales neuro-específicos (Vidaurre et al., 2012). Estos experimentos permitieron establecer que una secuencia mayoritaria de procesamiento en TrkB-FL debía de encontrarse en
35 los 100 aminoácidos intracelulares más próximos a su región transmembrana

(aminoácidos 430-453 de la secuencia de rata; **Fig. 1A**), solapando con el inicio del dominio tirosina-quinasa. La localización precisa de los sitios putativos de procesamiento por calpaína en sus sustratos es un proceso complejo ya que no se ha establecido una secuencia consenso de reconocimiento para esta proteasa, que
5 parece reconocer elementos estructurales de orden superior y tiene tendencia a procesar zonas de separación entre distintos dominios funcionales de sus sustratos (Tompa et al., 2004). Por ello, a continuación se analizó *in silico* la región de TrkB-FL mencionada anteriormente utilizando diferentes bases de datos en red (www.calpain.org, www.dnbr.ugent.be) y la aplicación GPS-CDD
10 (<http://gps.biocuckoo.org/>), herramientas que permiten realizar predicciones teóricas sobre posibles sitios de procesamiento por calpaína en sus sustratos. Varios de los resultados predictivos de mayor valor estadístico se concentraban en torno a los aminoácidos 463, 489-494, 541-546 y 549-554 de TrkB-FL, lo que sugería que en estas secuencias podría encontrarse una diana mayoritaria de procesamiento por
15 calpaína. Por otra parte, el análisis de los fragmentos C-terminales de TrkB-FL generados por calpaína mediante digestiones *in vitro* de formas recombinantes de proteínas expresadas en sistemas heterólogos sugería la posible existencia de un segundo sitio de procesamiento en su región tirosina quinasa. El análisis *in silico* de estas secuencias mediante los algoritmos anteriores señaló los aminoácidos en torno
20 al 638 y 645-650 de TrkB-FL como posibles dianas adicionales de procesamiento por calpaína.

Con objeto de explorar estas hipótesis, se procedió a diseñar una serie de péptidos que, al contener las secuencias de TrkB-FL previamente establecidas (**Fig. 1A**),
25 podrían interferir de manera específica el procesamiento de esta proteína por calpaína. Como método para facilitar el paso de los péptidos interferentes a través de BHE y la membrana plasmática, se eligió utilizar la transducción peptídica por varios motivos (Dietz and Bahr, 2004). En primer lugar, esta metodología aprovecha el hecho de que las propiedades de permeabilidad de determinadas proteínas, como la proteína
30 transactivadora Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), están mediadas por secuencias cortas generalmente de naturaleza básica, como son los aminoácidos 47-57 (YGRKKRRQRRR, SEQ ID NO 17) en el caso de Tat. Además, como se mencionó, recientemente estas secuencias han sido utilizadas con éxito como vehículo para introducir en neuronas diversas secuencias, incluido el extremo C-
35 terminal de la subunidad GluN2B del NMDAR. Estas secuencias fueron capaces de

interferir la interacción de GluN2B con la proteína de andamiaje de la densidad postsináptica PSD-95 (péptido Tat-NR2B9c o NA-1) (Aarts et al., 2002); (Cook et al., 2012a, b).

5 Los péptidos Tat diseñados, por tanto, contienen los aminoácidos 457-471 (TFL₄₅₇ de SEQ ID NO 6, correspondiente a la unión del CPP TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento TrkB-FL 458-472 humano, SEQ ID NO 1), 482-495 (TFL₄₈₂ de SEQ ID NO 7, correspondiente a la unión del CPP TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento TrkB-FL 483-496 humano, SEQ ID NO 2), 541-555 (TFL₅₄₁ de SEQ ID NO 8, correspondiente a la unión del CPP TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento TrkB-FL 542-556 humano, SEQ ID NO 3) y 639-652 (TFL₆₃₉ de SEQ ID NO 9, correspondiente a la unión del CPP TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento TrkB-FL 640-653 humano, SEQ ID NO 4) de la secuencia TrkB-FL de rata fusionados con la secuencia Tat mencionada anteriormente (**Fig. 1B**). En el caso del péptido
15 TFL₄₅₇, los 9 primeros aminoácidos de la secuencia de TrkB-FL están también presentes en la isoforma truncada del receptor TrkB-T1 mientras que los 5 residuos C-terminales son exclusivos de la isoforma completa. Un péptido de igual tamaño que los anteriores conteniendo la secuencia Tat unida a los aminoácidos 408-421 del factor de transcripción c-Myc (TMyC con SEQ ID NO 10, correspondiente a la unión del CPP
20 TAT47-57 del HIV, SEQ ID NO 17, y el fragmento c-Myc 408-421 humano, SEQ ID NO 5) fue sintetizado y utilizado como control negativo en los experimentos realizados.

Todas las secuencias de TrkB-FL utilizadas en los péptidos anteriores están completamente conservadas en la secuencia de la proteína humana; por tanto, los
25 efectos neuroprotectores de los péptidos diseñados en los modelos murinos de excitotoxicidad serían extrapolables para células humanas.

Ejemplo 2. El péptido TMyCFITC es capaz de atravesar la membrana plasmática neuronal.

30

Seguidamente se confirmó la permeabilidad a la membrana plasmática neuronal de aquellos péptidos que contienen las secuencias de transducción de la proteína Tat (Dietz and Bahr, 2004). Para ello, cultivos primarios de neuronas corticales maduras de rata de 13 días *in vitro* (DIVs) fueron incubadas durante 1 h con TMyC (15 μ M) marcado con FITC (**Fig. 2, paneles C y D**) y comparados con cultivos control sin tratar
35

(Fig. 2, paneles A y B). Dado que estos cultivos consisten en una población mixta de neuronas y células gliales, empleamos inmunofluorescencia con un anticuerpo específico neuronal (NeuN) para identificar esta subpoblación celular. Las células, crecidas sobre cubreobjetos, se fijaron en una solución de paraformaldehído 4% preparada en 0,1M PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Tras bloquear durante 30 min con una solución de BSA al 1% con Tritón X-100 0,1% en PBS, las células se incubaron durante 2 h con anticuerpo anti-NeuN diluido en solución de bloqueo. La inmunoreactividad fue detectada con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos, incubados durante 1 h a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron con medio Prolong (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) sobre los portaobjetos. Mediante microscopía confocal se observó que, en estas condiciones, el péptido TMycFITC era capaz de atravesar la membrana de las neuronas presentes en estos cultivos primarios.

15 **Ejemplo 3. Los efectos del péptido TFL₄₅₇ sobre el procesamiento de TrkB-FL y la muerte neuronal en condiciones de excitotoxicidad son específicos, dependen de la dosis de péptido utilizada y siguen cinéticas paralelas.**

A continuación se analizó el efecto de los distintos péptidos TFL generados sobre el procesamiento de TrkB-FL inducido por sobreactivación del NMDAR (Fig 3). Cultivos primarios de 13 DIVs fueron incubados con los péptidos TMyc, TFL₄₅₇, TFL₄₈₂, TFL₅₄₁ o TFL₆₃₉ (25 µM) durante 30 min previamente a su tratamiento durante 2 h con los agonistas del NMDAR, NMDA (100 µM) y glicina (10 µM). Utilizamos como control cultivos en los que el pretratamiento con los péptidos fue omitido. Mediante *immunoblot* fueron estudiados los niveles de TrkB-FL (*Mr* 145 kDa) (Fig 3A) utilizando el anticuerpo TrkB-ECD, que reconoce una región extracelular común a todas las isoformas de TrkB incluyendo las formas truncadas (trkB; *Mr* 95 kDa). Como control también se analizó la enolasa específica neuronal (NSE), una proteína neuronal que no es procesada por calpaína. La interferencia del procesamiento de TrkB-FL fue cuantificada para cada uno de los péptidos, mostrándose los resultados de 4 experimentos independientes (Fig. 3B). En los cultivos que no recibieron péptido se observó una reducción notable de los niveles de TrkB-FL y un aumento de las formas truncadas (tTrkB) que fueron inducidos por las condiciones de excitotoxicidad, tal como se demostró anteriormente (Vidaurre et al., 2012). Un resultado similar se obtuvo con el péptido control TMyc y con los distintos péptidos TFL, con la excepción de TFL₄₅₇ que redujo de manera muy

notable el procesamiento de TrkB-FL inducido por el tratamiento con NMDA. Por ejemplo, en las células preincubadas con TFL₄₅₇ y sometidas a excitotoxicidad los niveles de TrkB-FL sólo sufrieron una reducción moderada, alcanzando valores del 80 ± 7% respecto a los de cultivos iguales sin tratar con NMDA, valor significativamente superior al obtenido en las células preincubadas con TMyC (36 ± 11%, *p*<0,5). El tratamiento con los distintos péptidos no tuvo un efecto significativo sobre los niveles basales de TrkB-FL encontrados en las células no sometidas a condiciones de excitotoxicidad.

Se investigó seguidamente cual era el efecto de los péptidos TFL generados sobre la muerte neuronal inducida por el proceso de excitotoxicidad (**Fig. 4**). Para ello, los cultivos primarios fueron preincubados con los péptidos TMyC, TFL₄₅₇, TFL₄₈₂, TFL₅₄₁ o TFL₆₃₉ y tratados de forma crónica con NMDA y glicina como anteriormente durante 0, 2, 4 ó 6 h. La viabilidad neuronal fue establecida mediante el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio MTT y los resultados de 3-11 experimentos independientes fueron representados como valores relativos respecto a los obtenidos en cultivos control tratados con el mismo péptido pero no NMDA. Como puede observarse, los cultivos pretratados con TFL₄₅₇ presentaron una viabilidad neuronal significativamente mayor respecto a aquellos incubados con el péptido control en todos los tiempos evaluados de tratamiento con NMDA (**Fig. 4A**). Así por ejemplo, la viabilidad de los cultivos incubados 2 h con NMDA en presencia de TMyC fue del 49 ± 5% respecto a las células sin tratar, mientras que estos valores alcanzaron el 80 ± 8% en los cultivos tratados con TFL₄₅₇ (*p*<0,01). Para el resto de los péptidos TFL no se observaron diferencias significativas respecto a TMyC (**Figs. 4C y D**), con la excepción de TFL₄₈₂ que tenía un efecto neuroprotector muy transitorio (**Fig. 4B**) que no se correlacionaba con una mayor estabilidad de TrkB-FL en las neuronas excitotóxicas (**Fig. 3**). En conjunto, los datos anteriores demostraban que solo el péptido TFL₄₅₇ tenía un efecto neuroprotector sostenido y significativo sobre la excitotoxicidad inducida por tratamiento crónico con NMDA, que se correspondía con su capacidad para interferir el procesamiento de la proteína TrkB-FL.

Con objeto de establecer las condiciones más adecuadas de tratamiento con el péptido TFL₄₅₇, los cultivos primarios fueron incubados seguidamente con distintas concentraciones de TMyC o TFL₄₅₇ (5, 15 ó 25 µM) durante 30 min previamente a su tratamiento con los agonistas del NMDAR durante 2 (**Fig. 5A**) ó 4 (**Fig. 5B**) h. El

análisis de los niveles de TrkB-FL en los cultivos preincubados con TMyc mostró resultados similares a los anteriores a todas las concentraciones de péptido empleadas. Por el contrario, TFL₄₅₇ fue capaz de interferir el procesamiento de TrkB-FL inducido por NMDA, de forma modesta a la menor concentración empleada y muy notablemente para 15 y 25 μ M (**Fig. 5A**). Un resultado adicional muy importante fue que la estabilización de la isoforma activa de TrkB mediada por el pretratamiento con TFL₄₅₇ tuvo como consecuencia el mantenimiento en condiciones de excitotoxicidad de la actividad del factor de transcripción pro-supervivencia CREB, establecida mediante análisis con un fosfo-anticuerpo específico para su Ser 133 (**Fig. 5A**). Contrariamente, el tratamiento con NMDA de los cultivos preincubados con el péptido control TMyc produjo la inactivación de pCREB, tal como se describió anteriormente (Hardingham et al., 2002). La activación de CREB por fosforilación en este residuo ocurre como consecuencia de la activación fisiológica de receptores TrkB y NMDARs en neuronas y es un mecanismo importante de supervivencia ya que pCREB induce la expresión, entre otros, de BDNF (Tao et al., 1998) y TrkB (Deogracias et al., 2004). Por el contrario, en condiciones de excitotoxicidad, la inactivación de la actividad transcripcional de pCREB es un factor crítico en el proceso de muerte neuronal (Hardingham et al., 2002). Los efectos de TFL₄₅₇ observados sobre el estado de activación de CREB son relevantes cara a su utilidad clínica ya que anteriormente se ha demostrado que el aumento de pCREB es un factor que estimula en el giro dentado de cerebro adulto la neurogénesis, un mecanismo de reparación cerebral que se activa tras el daño isquémico (Zhu et al., 2004).

Se investigó seguidamente el efecto de TFL₄₅₇ sobre la muerte neuronal inducida por el proceso de excitotoxicidad a las distintas concentraciones de péptido utilizadas (**Fig. 5B**). Los resultados de 6 experimentos independientes de viabilidad neuronal fueron representados como valores relativos respecto a los obtenidos en cultivos control tratados con péptido pero sin NMDA. Como puede observarse, los cultivos pretratados con TFL₄₅₇ presentaron una viabilidad neuronal significativamente mayor respecto a aquellos incubados con el péptido control a las tres concentraciones de péptido analizadas, encontrándose las diferencias más significativas para la concentración de 25 μ M. Así por ejemplo, la viabilidad de los cultivos incubados con NMDA en presencia de TMyc fue del $17 \pm 2\%$ respecto a las células sin tratar, mientras que estos valores alcanzaron el $50 \pm 5\%$ en los cultivos tratados con TFL₄₅₇ ($p < 0,001$). Los datos anteriores demostraban que el péptido TFL₄₅₇ tenía un efecto neuroprotector

significativo sobre la excitotoxicidad inducida por tratamiento crónico con NMDA, siendo éste dependiente de la dosis. Este efecto sobre la viabilidad se correspondía con la capacidad de TFL₄₅₇ para interferir el procesamiento de la proteína TrkB-FL y con el mantenimiento de los niveles de pCREB, forma activa del factor de transcripción pro-supervivencia CREB.

Con objeto de ahondar en la correlación encontrada en los distintos efectos de TFL₄₅₇, analizamos el curso temporal del procesamiento de TrkB-FL y la inactivación de CREB inducidos por sobreactivación del NMDAR (**Fig. 6**) y los comparamos con los obtenidos previamente para la viabilidad neuronal (**Fig. 4A**). Para ello, los cultivos primarios fueron incubados con TMyC o TFL₄₅₇ (25 μ M) durante 30 min previamente a su tratamiento con NMDA durante 0, 2, 4 ó 6 h. El análisis de los niveles de TrkB mostró, en ambos casos, la reducción de TrkB-FL y el aumento progresivo de las formas truncadas tTrkB desde tiempos tempranos de tratamiento con NMDA (**Fig. 6A**) (Vidaurre et al., 2012). Se observó sin embargo que en los cultivos pretratados con el péptido TFL₄₅₇ la reducción de los niveles de TrkB-FL tras el tratamiento con NMDA era notablemente inferior que la obtenida en presencia de TMyC. La cuantificación de los resultados correspondientes a 5 experimentos independientes mostró que las diferencias observadas entre los cultivos pretratados con TFL₄₅₇ y TMyC eran estadísticamente significativas a las 2 y 4 h de tratamiento con NMDA (**Fig. 6B**). El efecto de TFL₄₅₇ era específico para la proteína TrkB-FL y no se encontraron diferencias en el procesamiento de otros sustratos de calpaína como la espectrina, que dio lugar a la aparición de fragmentos de 150 y 145 kDa en los cultivos pretratados con TFL₄₅₇ o TMyC con cinética similar. Como un control adicional se analizó NSE, proteína que ya vimos no es sustrato de calpaína ni se regula en condiciones de excitotoxicidad. La estabilización de TrkB-FL en los cultivos pretratados con TFL₄₅₇ tuvo como consecuencia muy importante el mantenimiento en condiciones de excitotoxicidad de la actividad de pCREB (**Fig. 6C**), una proteína por debajo de TrkB en las cascadas de señalización y fundamental para la función de la vía pro-supervivencia BDNF/TrkB. En los cultivos preincubados con el péptido control, el tratamiento con NMDA produjo sin embargo la inactivación de pCREB desde tiempos muy tempranos tal como se describió (Hardingham et al., 2002). Los efectos ejercidos por TFL₄₅₇ sobre TrkB-FL y pCREB presentaron una cinética muy similar a la observada previamente para la viabilidad neuronal (**Fig. 4A**), reforzando la correlación existente entre ambos fenómenos.

En conjunto, los datos anteriores demostraban que el péptido TFL₄₅₇ tenía un efecto neuroprotector específico y significativo sobre la excitotoxicidad inducida por tratamiento crónico con NMDA que se correspondía con su capacidad para interferir el procesamiento de la proteína TrkB-FL y el mantenimiento de los niveles de activación del factor de transcripción CREB.

Ejemplo 4. El péptido TFL₄₅₇ también es capaz de reducir la muerte neuronal inducida por un daño neuronal agudo.

El modelo celular utilizado en los experimentos anteriores, en el que neuronas previamente expuestas al péptido neuroprotector son enfrentadas a un estímulo excitotóxico crónico, intenta reproducir una situación clínica en la que tratásemos de reducir la muerte neuronal secundaria de un paciente que ha sufrido un ictus mediante la administración post-isquemia de un péptido neuroprotector para proteger a las neuronas de la penumbra isquémica. Sin embargo, cara a evaluar de una manera más global el potencial neuroprotector del péptido TFL₄₅₇ para su uso en clínica, también nos pareció interesante investigar su eficacia cuando se utiliza inmediatamente tras la inducción de un daño neuronal agudo, condiciones que simularían algunos otros procesos de isquemia producidos *in vivo* como consecuencia de cirugías endovasculares y cardíacas.

Se realizaron experimentos en los que las neuronas fueron sometidas sólo transitoriamente a las condiciones excitotóxicas y los péptidos se administraron posteriormente a la inducción del daño neuronal agudo (**Fig. 7**). Para ello, los cultivos primarios fueron tratados con NMDA (50 μ M) y glicina (10 μ M) durante 1 h, sustituyéndose este medio a continuación por un medio libre de los agonistas y conteniendo el antagonista genérico del NMDAR, DL-AP-5 (200 μ M), lo que permite limitar la sobreactivación del NMDAR a un corto periodo de tiempo. Los péptidos TFL₄₅₇ o TMyC (15 μ M) fueron añadidos en el medio fresco junto con el DL-AP-5. La viabilidad neuronal se estableció como anteriormente 20 h después de realizado el cambio de medio y los valores medios de 5 experimentos se representaron como valores relativos a los obtenidos en los cultivos correspondientes no tratados con NMDA. La viabilidad neuronal relativa para los cultivos tratados con TMyC fue del $36 \pm 9\%$, valor significativamente inferior al obtenido en las neuronas tratadas con TFL₄₅₇, que alcanzaron un $85 \pm 13\%$ ($p < 0,05$).

En conjunto, los resultados anteriores demuestran que el péptido TFL₄₅₇ ejerce un efecto neuroprotector significativo tanto cuando se encuentra presente en neuronas sometidas posteriormente a un daño excitotóxico crónico como si se administra inmediatamente después de un daño agudo.

5

Ejemplo 5. La inhibición de calpaína no bloquea el efecto neuroprotector del péptido TFL₄₅₇ en neuronas sometidas a excitotoxicidad.

Hemos puesto a prueba la hipótesis de que el mecanismo de acción del péptido TFL₄₅₇ sobre TrkB-FL depende de su inhibición de la actividad de calpaína específicamente sobre este sustrato mediante ensayos de neuroprotección realizados en presencia de inhibidores genéricos de esta proteasa (**Fig. 8**). Para ello, los cultivos primarios fueron preincubados con los inhibidores de calpaína, calpeptina (Calp, 10 μ M) e inhibidor III (CIII; 10 μ M) y, 30 min después, con los péptidos TMyc o TFL₄₅₇ (25 μ M). Tras 30 min adicionales, las células se trataron de forma crónica con NMDA (4 h). En los cultivos control preincubados con TMyc observamos un efecto modesto pero significativo de los inhibidores de calpaína sobre la viabilidad neuronal (28 \pm 3% versus 21 \pm 2%, $p < 0,05$). Sin embargo, el efecto neuroprotector de TFL₄₅₇ fue muy similar independientemente del tratamiento o no con los inhibidores de la proteasa (48 \pm 5% versus 47 \pm 3%). Por tanto, contrariamente a la hipótesis de partida, el efecto de TFL₄₅₇ sobre el procesamiento de TrkB-FL inducido en condiciones de excitotoxicidad podría deberse mayoritariamente a la interferencia de un sistema proteolítico alternativo a la calpaína que también se activaría en estas situaciones y participaría en la regulación del receptor de neurotrofinas TrkB en respuesta al daño neuronal.

25

Referencias

Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y.T., Salter, M.W., and Tymianski, M. (2002). Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298, 846-850.

30

Bodanzsky, M. and Bodanzsky, A. (1994). "The practice of Peptide Synthesis". Springer Verlag, Berlin.

- Brigman, J.L., Wright, T., Talani, G., Prasad-Mulcare, S., Jinde, S., Seabold, G.K., Mathur, P., Davis, M.I., Bock, R., Gustin, R.M., et al. (2010). Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J Neurosci* 30, 4590-4600.
- 5
- Carim-Todd, L., Bath, K.G., Fulgenzi, G., Yanpallewar, S., Jing, D., Barrick, C.A., Becker, J., Buckley, H., Dorsey, S.G., Lee, F.S., et al. (2009). Endogenous truncated TrkB.T1 receptor regulates neuronal complexity and TrkB kinase receptor function in vivo. *J Neurosci* 29, 678-685.
- 10
- Chen, H.S., and Lipton, S.A. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97, 1611-1626.
- 15
- Choi, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
- Cook, D.J., Teves, L., and Tymianski, M. (2012a). A translational paradigm for the preclinical evaluation of the stroke neuroprotectant Tat-NR2B9c in gyrencephalic nonhuman primates. *Science translational medicine* 4, 154ra133.
- 20
- Cook, D.J., Teves, L., and Tymianski, M. (2012b). Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. *Nature* 483, 213-217.
- Dawbarn, D., and Allen, S.J. (2003). Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathology and applied neurobiology* 29, 211-230.
- 25
- Deogracias, R., Espliguero, G., Iglesias, T., and Rodriguez-Pena, A. (2004). Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci* 26, 470-480.
- 30
- Dietz, G.P., and Bahr, M. (2004). Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci* 27, 85-131.
- Dolgin, E. (2012). To serve and neuroprotect. *Nat Med* 18, 1003-1006.
- 35

- Faulí i Trillo, C. (1993). "Tratado de Farmacia Galénica", Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.
- 5 Hardingham, G.E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience* 5, 405-414.
- 10 Hill, M.D., Martin, R.H., Mikulis, D., Wong, J.H., Silver, F.L., Terbrugge, K.G., Milot, G., Clark, W.M., Macdonald, R.L., Kelly, M.E., et al. (2012). Safety and efficacy of NA-1 in patients with iatrogenic stroke after endovascular aneurysm repair (ENACT): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet neurology* 11, 942-950.
- 15 Ikonomidou, C., and Turski, L. (2002). Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet neurology* 1, 383-386.
- Kullmann, W. (1980). Proteases as catalysts for enzymic syntheses of opioid peptides. *J Biol Chem* 255, 8234-8238.
- 20 Lloyd-Williams, P., Albericio, F., and Giralt, E. (1997). "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins". CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug discovery today* 17, 850-860.
- 25 Olney, J.W. (1986). Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv Exp Med Biol* 203, 631-645.
- 30 Regberg, J., Eriksson, J.N., and Langel, U. (2013). Cell-penetrating peptides: from cell cultures to in vivo applications. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 5, 509-516.
- Stewart, J.M. and Young, J.D. (1984). "Solid Phase Peptide Synthesis", 2nd edition. Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.

- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., and Greenberg, M.E. (1998). Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709-726.
- 5 Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilagyi, A., Banoczi, Z., Hudecz, F., and Friedrich, P. (2004). On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol Chem* 279, 20775-20785.
- Vidaurre, O.G., Gascon, S., Deogracias, R., Sobrado, M., Cuadrado, E., Montaner, J.,
10 Rodriguez-Pena, A., and Diaz-Guerra, M. (2012). Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell death & disease* 3, e256.
- Zhu, D.Y., Lau, L., Liu, S.H., Wei, J.S., and Lu, Y.M. (2004). Activation of cAMP-
15 response-element-binding protein (CREB) after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9453-9457.

REIVINDICACIONES

1. Péptido con efecto neuroprotector frente a la muerte inducida por excitotoxicidad caracterizado por consistir en la secuencia SEQ ID NO: 1.
5
2. Péptido según la reivindicación 1 unido a un agente de internalización.
3. Péptido según la reivindicación 2 caracterizado por que el agente de internalización es un péptido penetrante celular, y donde dicho péptido penetrante celular se encuentra covalentemente unido al péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1.
10
4. Péptido según la reivindicación 3 caracterizado por que la secuencia del péptido penetrante celular es TAT47-57 (SEQ ID NO: 17) o TAT48-60 (SEQ ID NO: 16).
5. Péptido según la reivindicación 4 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6, donde la secuencia SEQ ID NO: 6 consiste en el péptido penetrante TAT47-57 (SEQ ID NO: 17) en el que la arginina C-terminal de la secuencia SEQ ID NO: 17 es también el primer aminoácido de la secuencia SEQ ID NO: 1.
15
6. Polinucleótido que codifica para el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
20
7. Polinucleótido según la reivindicación 6 caracterizado por consistir en la secuencia SEQ ID NO: 26 ó SEQ ID NO: 27.
25
8. Vector que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7.
9. Célula que comprende el polinucleótido según las reivindicaciones 6 ó 7.
30
10. Uso de la célula según la reivindicación 9 para la obtención del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

11. Composición farmacéutica caracterizada por comprender el péptido neuroprotector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o el vector según la reivindicación 8.
- 5 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11 caracterizada por comprender el péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 6.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 caracterizada por comprender el péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 14. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 caracterizada por comprender el péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6.
- 15 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 11 caracterizada por comprender el vector de la invención según la reivindicación 8.
16. Uso del péptido descrito en las reivindicaciones 1 a 5 en la fabricación de una composición farmacéutica o medicamento según las reivindicaciones 11 a 14.
- 20 17. Uso del vector descrito en la reivindicación 8 en la fabricación de una composición farmacéutica o medicamento según la reivindicación 15.
18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17 donde la composición farmacéutica o el medicamento son para la prevención y/o tratamiento de la muerte celular inducida por excitotoxicidad.
- 25 19. Uso según la reivindicación 18 donde la composición farmacéutica es para la prevención y/o tratamiento de un accidente cerebrovascular.
- 30 20. Uso según la reivindicación 19 donde la composición farmacéutica es para la prevención y/o tratamiento de un ictus isquémico.
21. Uso según la reivindicación 18 donde la composición farmacéutica es para la prevención y/o tratamiento de una lesión cerebral traumática.

A

401 TTPTDIGDIT NKSNEIPSTD VADQTNREHL SVYAVVVIAS VVGFCLLVML
 451 LLLKLA**RHSKFGMKGPASVIS**NDDDSASPL H**HISNGSNTPSSSSE**GPDAV
 501 IIGMTKIPVI ENPQYFGITN SQLKPDTFVQ HIKRHNIVLK **RELGEGAFGK**
 551 **HISAE**CYNLC PEQDKILVAV KTLKDASDNA RKDFHREAEL LTNLQHEHIV
 601 KFYGVCEVD PLIMVFEYMK HGDLNKFLRA HGPDAVLM**AE** **GNPTELTQS**
 651 **GL**LHIAQQIA AGMVYLASQH FVHRDLATRN CLVGENLLVK IGDFGMSRDV
 701 YSTDYRVGG HTMLPIRWMP PESIMYRKFT TESDVWSLGV VLWEIFTYGK
 751 QPWYQLSNE VIECITQGRV LQRPRTCPQE VYELMLGCWQ REPHTRKNIK
 801 NIHTLLQNLA KASPVYLDIL G

B

⁴⁵⁷ YGRKKRRQRR**RHSKFGMKGPASVIS**⁴⁷¹ **TFL₄₅₇**
⁴⁸² YGRKKRRQRR**HISNGSNTPSSSE**⁴⁹⁵ **TFL₄₈₂**
⁵⁴¹ YGRKKRRQRR**RELGEGAFGKVFLAE**⁵⁵⁵ **TFL₅₄₁**
⁶³⁹ YGRKKRRQRR**AEGNPTELTQSQM**⁶⁵² **TFL₆₃₉**
 YGRKKRRQRR**AAEEQKLISEEDLLR** **TMyC**

FIG. 1

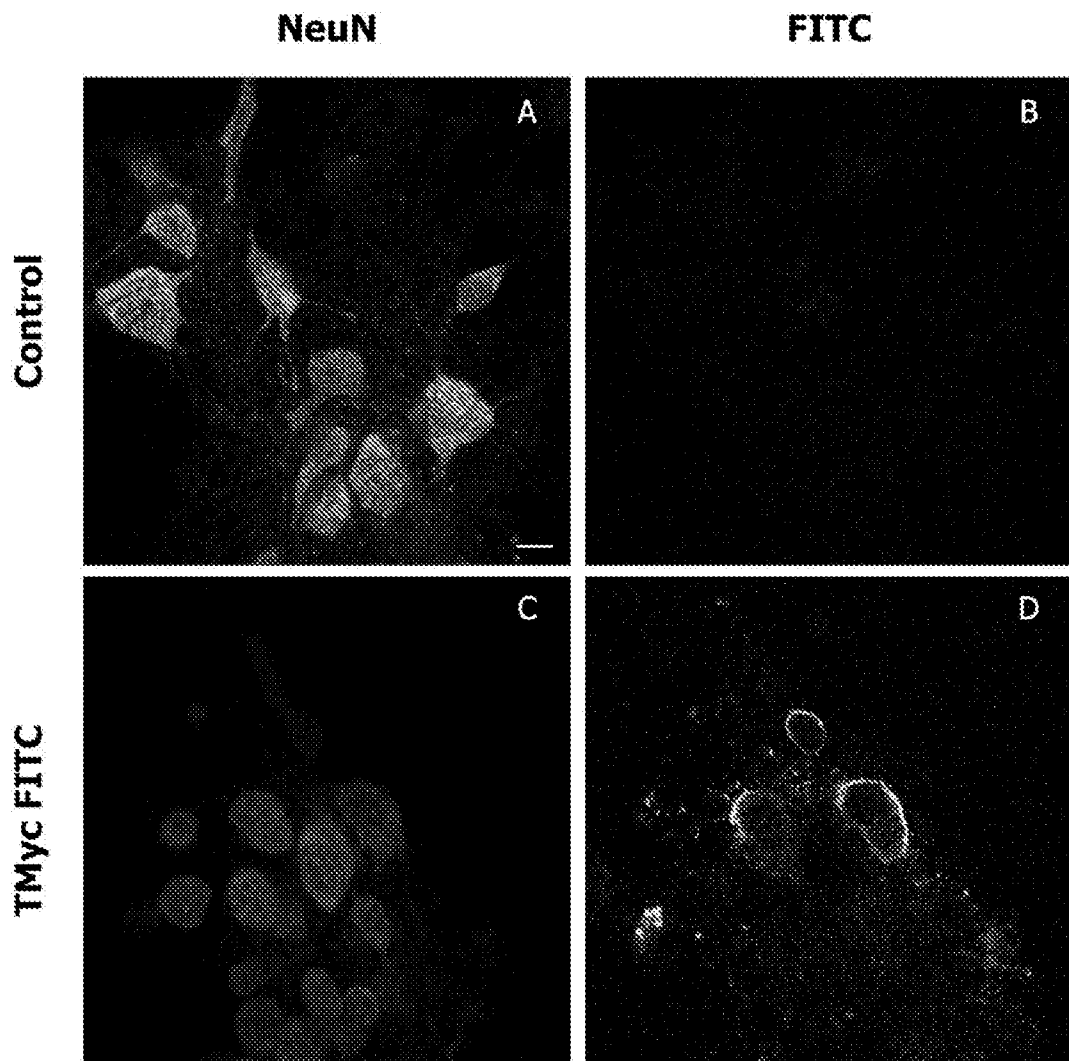
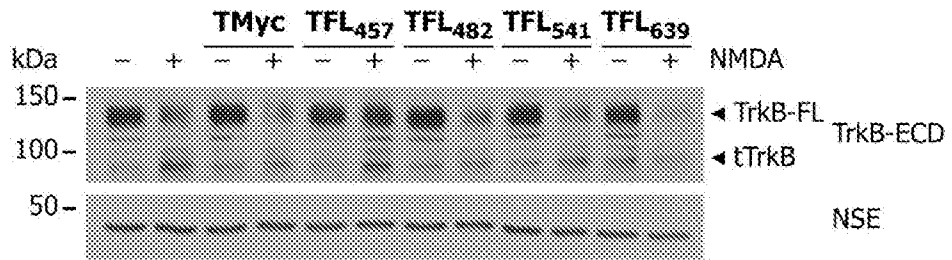


FIG. 2

A



B

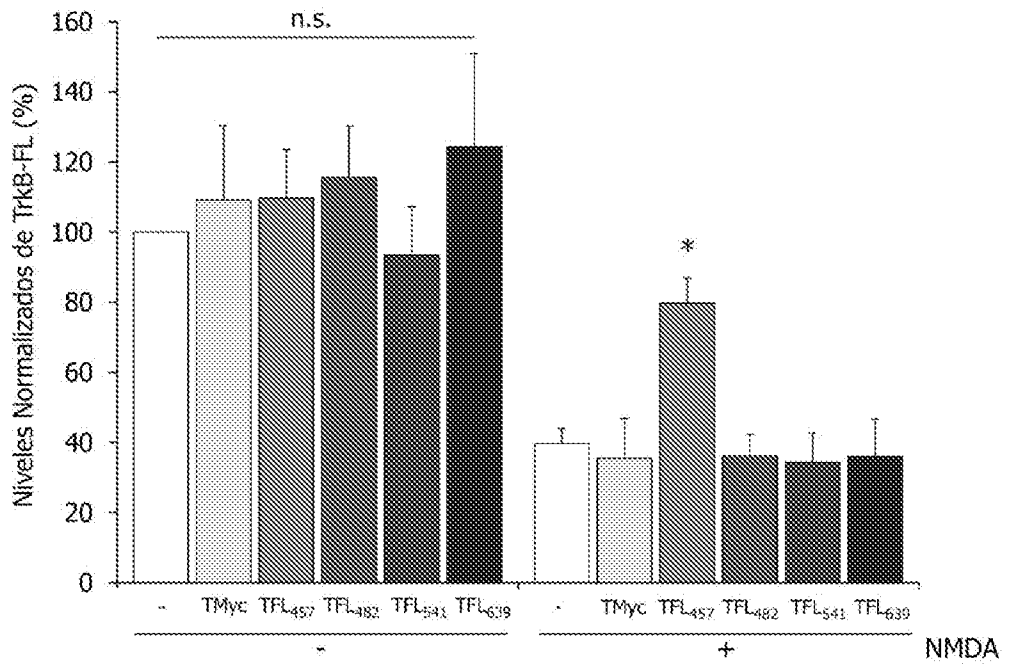


FIG. 3

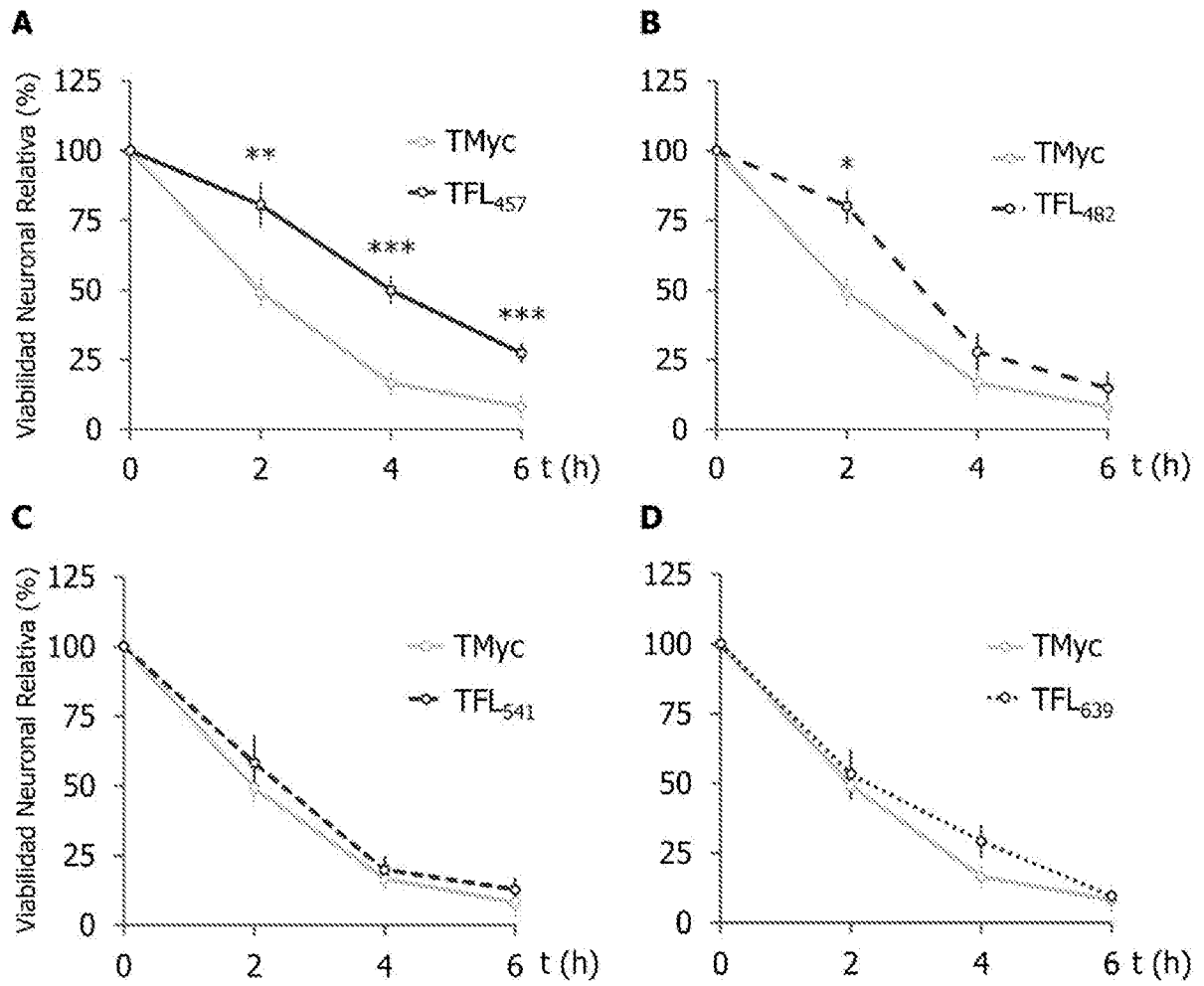


FIG. 4

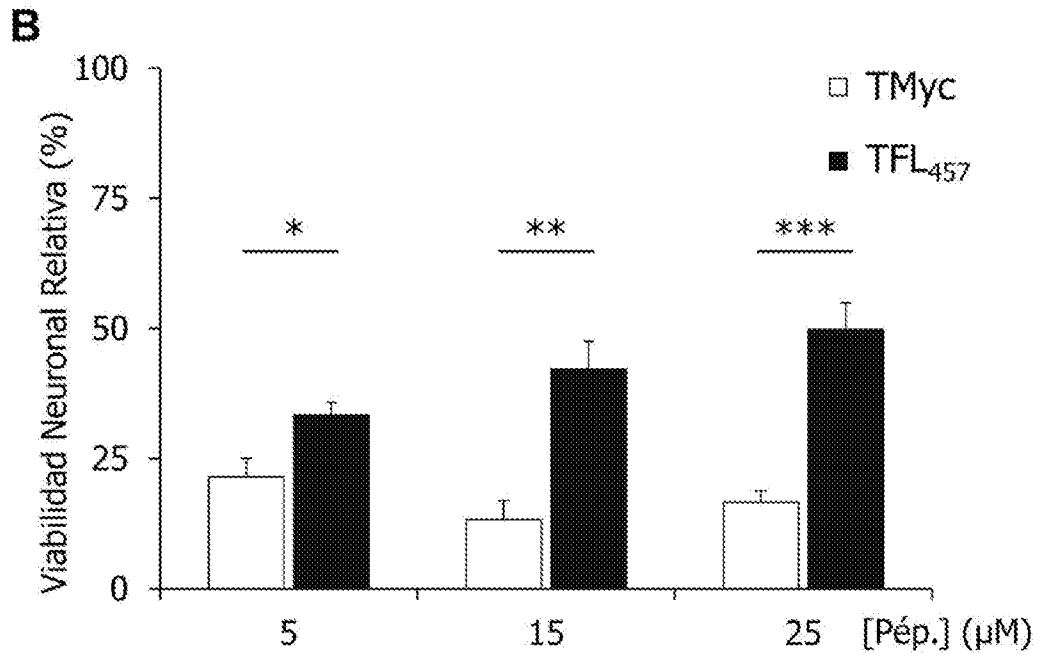
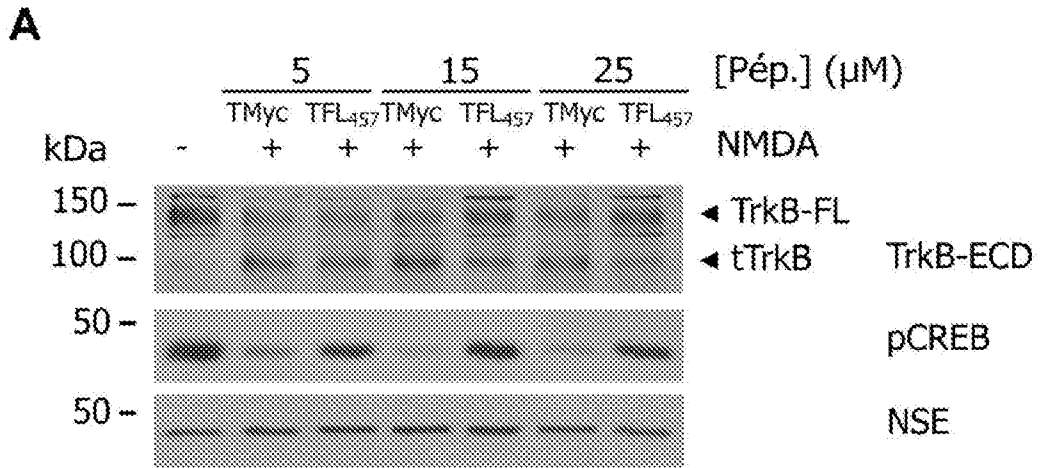


FIG. 5

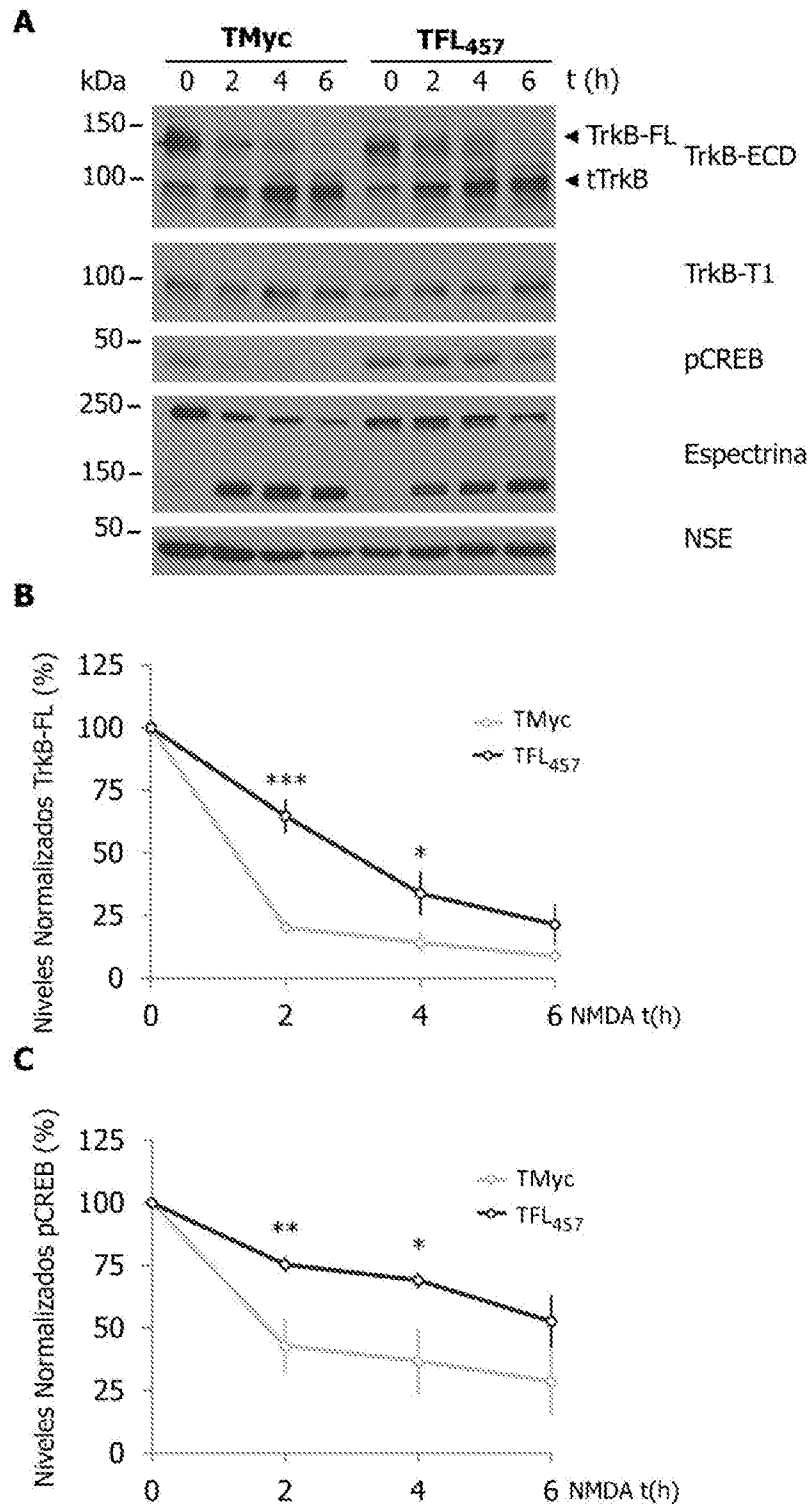


FIG. 6

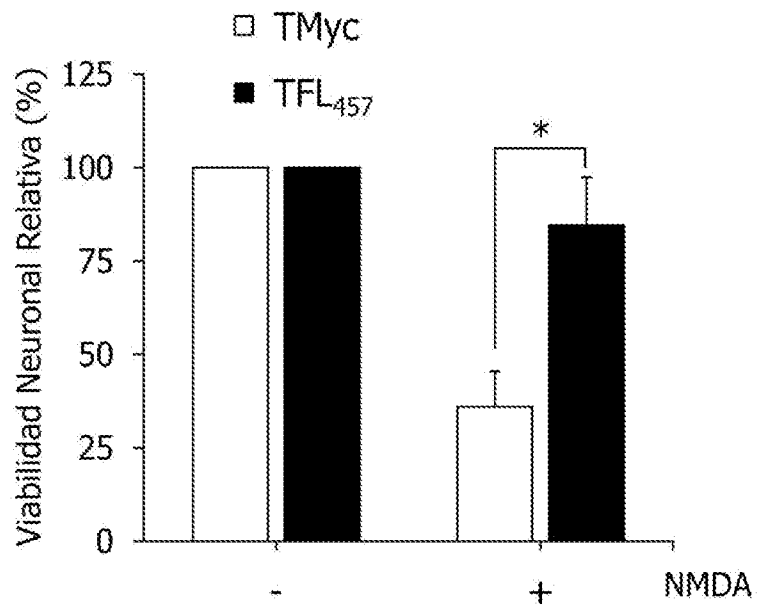


FIG. 7

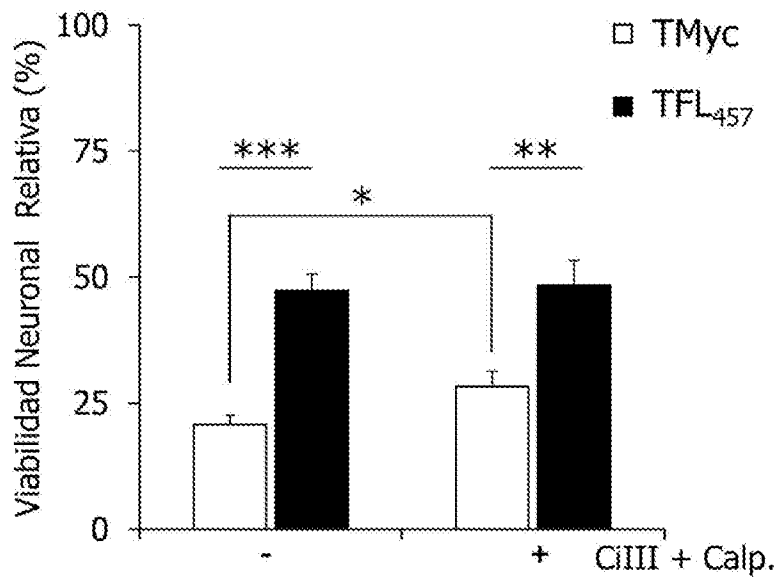


FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2015/070744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N, C07K, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, GOOGLE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 20100137224 A1 (TYMIANSKI, M.) 03.06.2010, the whole document.	1-21
A	WO 2014102426 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID) 03.07.2014, the whole document.	1-21
A	VIDAURRE, O.G. et al. "Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity". CELL DEATH AND DISEASE. 19.01.2012. Vol. 3, artículo e256; the whole document.	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
30/12/2015

Date of mailing of the international search report
(07/01/2016)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. Novoa Sanjurjo

Telephone No. 91 3498466

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2015/070744

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2010137224 A1	03.06.2010	US2015190459 A1 US2012302504 A1 US8648043 B2 US2009281037 A1 US8071548 B2 US2009131321 A1 US7846897 B2 US2005059597 A1 US7510824 B2 US2003050243 A1 US7595297 B2 CA2273622 A1 CA2273622 C	09.07.2015 29.11.2012 11.02.2014 12.11.2009 06.12.2011 21.05.2009 07.12.2010 17.03.2005 31.03.2009 13.03.2003 29.09.2009 02.12.2000 20.03.2012
----- WO2014102426 A1 -----	----- 03.07.2014 -----	----- ES2479815 A1 ES2479815 B1 -----	----- 24.07.2014 06.05.2015 -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070744

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/12 (2006.01)

C07K14/71 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61P9/10 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070744

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, GOOGLE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 20100137224 A1 (TYMIANSKI, M.) 03.06.2010, todo el documento.	1-21
A	WO 2014102426 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID) 03.07.2014, todo el documento.	1-21
A	VIDAURRE, O.G. et al. "Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity". CELL DEATH AND DISEASE. 19.01.2012. Vol. 3, artículo e256; todo el documento.	1-21

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
30/12/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
07 de Enero de 2016 (07/01/2016)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

Nº de teléfono 91 3498466

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070744

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2010137224 A1	03.06.2010	US2015190459 A1 US2012302504 A1 US8648043 B2 US2009281037 A1 US8071548 B2 US2009131321 A1 US7846897 B2 US2005059597 A1 US7510824 B2 US2003050243 A1 US7595297 B2 CA2273622 A1 CA2273622 C	09.07.2015 29.11.2012 11.02.2014 12.11.2009 06.12.2011 21.05.2009 07.12.2010 17.03.2005 31.03.2009 13.03.2003 29.09.2009 02.12.2000 20.03.2012
----- WO2014102426 A1 -----	----- 03.07.2014 -----	----- ES2479815 A1 ES2479815 B1 -----	----- 24.07.2014 06.05.2015 -----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N9/12 (2006.01)

C07K14/71 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61P9/10 (2006.01)