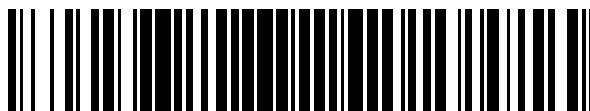


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 489**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08872504 .9**
96 Fecha de presentación: **18.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2229408**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2010**

54 Título: **Péptido derivado del receptor 3 de neurotensina y utilización en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas**

30 Prioridad:
21.12.2007 EP 07291602

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.03.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE - CNRS
3, RUE MICHEL ANGE
75794 PARIS, FR y
UNIVERSITE DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS**

72 Inventor/es:
**MAZELLA, Jean;
PETRAULT, Olivier;
BORSOTTO, Marc;
HEURTEAUX, Catherine y
WIDMANN, Catherine**

74 Agente/Representante:
Izquierdo Faces, José

ES 2 377 489 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptido derivado del receptor 3 de neurotensina y utilización en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas

5 **Campo técnico de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a un péptido derivado del receptor 3 de neurotensina (NTR3) y a su utilización en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas. La presente invención se refiere en particular a la utilización de este péptido para la fabricación de un medicamento, por ejemplo un antidepresivo.

10 [0002] La presente invención puede aplicarse en los sectores de la industria farmacéutica y particularmente en los campos de desarrollo del medicamento utilizado en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas.

15 [0003] La presente invención puede aplicarse en particular en el desarrollo de un nuevo antidepresivo. La presente invención también puede aplicarse en el tratamiento del dolor.

[0004] En la siguiente descripción, las referencias entre paréntesis (x) remiten a la lista de referencias al final de los ejemplos.

20 **Técnica anterior**

[0005] El documento WO 2004/056385 describe la secuencia peptídica del propéptido de neurotensina y describe que este último tiene afinidad por el receptor NTR3

25 [0006] El artículo WESTERGAARD UFFE ET AL: «Functional organisation of the sortilin VPS10p domain» publicado en noviembre de 2004 describe la unión de un propéptido del receptor NSTR3 con el receptor de neurotensina NSTR3.

30 [0007] Las enfermedades psiquiátricas representan un auténtico problema de Salud Pública. Los trabajos más recientes han confirmado la fuerte prevalencia de la depresión: en toda su vida, el 20% de las mujeres y el 10% de los hombres han tenido, tienen o tendrán un episodio depresivo como se describe en el documento Wong, M. & Licinio, J. «Research and treatment approaches to depression» Nat Rev Neurosci. 2, 343-351 (2001) (1). Dichas cifras son sin duda destacadas; lo son más aún cuando interesa la complicación principal de la depresión, el suicidio, que se cifra en 12000 fallecimientos al año en países como Francia, como se describe en el documento Moller HJ. «Suicide, suicidality and suicide prevention in affective disorders » Acta Psychiatr Scand 418 (supl): 73-80 (2003) (2).

35 [0008] La depresión es una enfermedad muy frecuente y a menudo incapacitante. Puede afectar hasta al 20% de la población en países industrializados. Sus orígenes son diversos y múltiples. Esta patología afecta tanto a nivel psíquico como al comportamiento y a la fisiología de los pacientes. Los tratamientos de la depresión también son múltiples y los mecanismos de acción de los medicamentos utilizados no están claramente establecidos.

40 [0009] La organización mundial de la salud (OMS) prevé que la depresión unipolar será la segunda causa de incapacidad en 2020. Al sufrimiento personal y familiar que representa la depresión se añade el importante peso social de esta patología. La depresión representa ya una de las primeras causas de baja laboral, con un coste económico que se eleva a más de 30 millardos de euros al año. A pesar del arsenal terapéutico puesto a disposición del cuerpo médico, en particular los SSRI («selective serotonin reuptake inhibitors» [inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina]) y SNRI («serotonin norepinephrine reuptake inhibitors» [inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina]), el 30% de la población depresiva no presenta tratamiento. Por otro lado, el plazo de acción de los antidepresivos es del orden de 3 a 6 semanas y los efectos secundarios son a menudo importantes.

45 [0010] De forma general, se estima que el 15% de los pacientes deprimidos fallecen por suicidio. En la mayor parte de los enfermos, la depresión se debe a la interacción entre una predisposición genética y factores medioambientales como el estrés o traumatismos emocionales como se describe en el documento Nestler E. Barrot M., DiLeone R. J., Eisch A. J., Gold S. J., Monteggia, L. M. «Neurobiology of depression» Neuron 34, 13-25 (2002) (3).

50 [0011] La enfermedad es frecuente y el mercado de los antidepresivos (AD) es inmenso (al menos 10 millardos de euros al año).

55 [0012] Sin embargo, aunque estos antidepresivos mejoran el estado de los pacientes en aproximadamente el 70% de los casos, solamente conllevan una remisión completa de la enfermedad en del 30 al 40% de ellos. Además, cerca de un tercio de los sujetos tratados resiste a los tratamientos existentes. Este registro obliga de hecho, por lo tanto, a considerar nuevos tratamientos, capaces de tener en cuenta los mecanismos de la depresión (3).

60 [0013] En el arsenal terapéutico puesto a disposición del cuerpo médico, los antidepresivos tricíclicos (TCA) con amitriptilina e imipramina fueron los primeros descubiertos, seguidos por los inhibidores de monoamina oxidasa

(IMAO), irreversibles y no selectivos como fenelzina y pargilina. Los efectos indeseables, en particular la cardiotoxicidad de los TCA (sobre todo en caso de sobredosis) y las crisis hipertensivas de los IMAO (interacciones con tiramina alimentaria, el famoso «*cheese effect*» [efecto queso o efecto tiramina]) han empujado a la investigación hacia nuevas moléculas de idéntica eficacia terapéutica pero de mejor aceptabilidad.

[0014] La noción de selectividad apareció entonces con los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (NA) o de serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT). Los ensayos clínicos de fase III demostraron para estas nuevas moléculas una eficacia equivalente a los antidepresivos de primera generación y una mejor seguridad, particularmente en caso de sobredosis.

[0015] Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (ISRN) son actualmente las moléculas más utilizadas como se describe en el documento Baghai TC, Volz HP, Moller HJ. «Drug treatment of depression in the 2000s: An overview of achievements in the last 10 years and future possibilities» *World J Biol Psychiatry*; 7: 198-222 (2006) **(4)** y en el documento Weilburg JB. «An overview of SSRI and SNRI therapies for depression» *Manag Care*; 13 (6 Supl. Depression): 25-33 (2004) **(5)**. Los AD están, por lo tanto, generalmente asociados a una facilitación de la transmisión de los sistemas monoaminérgicos.

[0016] Aunque la serotonina, la noradrenalina y la dopamina están implicadas de forma cierta, hoy en día se admite que las modificaciones de las tasas de monoaminas producidas por los AD y los procesos adaptativos que se derivan de ellas, en particular la alteración de la sensibilidad de algunos de sus receptores, no pueden explicar por sí mismos el mecanismo de acción de los antidepresivos.

[0017] De este modo, es difícil correlacionar el plazo de 3 a 6 semanas necesario para la obtención de los AD con el aumento de las tasas sinápticas de monoaminas, que intervienen desde la primera administración del producto. En casi medio siglo, el número de hipótesis sobre la patogenia de la depresión y su tratamiento no ha dejado de evolucionar.

[0018] Por ejemplo, concentraciones elevadas de glucocorticoides se asocian generalmente a un efecto negativo del humor, así como a alteraciones estructurales del hipocampo, por medio de una disminución de la síntesis de BDNF («*brain-derived neurotrophic factor*» [factor neurotrófico derivado del cerebro]), de una secreción excesiva de ácido glutámico y/o de una disminución de la captación de glucosa como se describe en el documento Manji HK, Gottesman II, Gould TD. «Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases» *Sci STKE*; 207: pe49 (2003) **(6)**.

[0019] De acuerdo con estas observaciones, los inhibidores de la síntesis de glucocorticoides y de antagonistas de los receptores de glucocorticoides ejercen efectos de tipo AD como se describe en el documento Reus VI, Wolkowitz OM. «Antiglucocorticoid drugs in the treatment of depression» *Expert Opin Investig Drugs*; 10: 1789-1796 (2001) **(7)**.

[0020] Se han desarrollado antagonistas que actúan sobre los receptores de la sustancia P, en particular NK1, o el receptor CRF («*corticotropin-releasing factor*» [factor de liberación de corticotropina]), así como antagonistas de los receptores de NMDA, con cierta eficacia (véase los documentos Griebel G, Simiand J, Steinberg R, et al. «4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1,3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor (1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders» *J Pharmacol Exp Ther*; 301: 333-345 (2002) **(8)**; Kramer MS, Cutler N, Feighner J, et al. «Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors» *Science*; 281: 1640-1645 (1998) **(9)** y Skolnick P. «Antidepressants for the new millennium» *Eur J Pharmacol*; 375: 31-40 (1999) **(10)**.

[0021] Diversos estudios recientes realizados en situaciones de estrés y modelos de depresión han implicado a la neurogénesis en la etiología de los trastornos depresivos mayores como se describe en los documentos Kempermann G, Kronenberg G. «Depressed new neurons: Adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression» *Biol Psychiatry*, 54: 499-503 (2003) **(11)**; Malberg JE, Schechter LE. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs» *Curr Pharm Des*; 11: 145-155 (2005) **(12)** y Duman, R. & Monteggia, L. «A neurotrophic model for stress-related mood disorders» *Biol Psychiatry*; 9: 1116-1127 (2006) **(13)**. Ha quedado demostrado que todos los tratamientos crónicos AD, incluyendo el electroshock estimulan la proliferación de las células progenitoras que dan en el origen de las neuronas de la capa granular del hipocampo.

[0022] Se sabe también que los AD modulan la expresión de diferentes factores implicados en la supervivencia y el crecimiento de las células, tales como CREB, Bcl2 o MAP-quinasas. Sin embargo, la importancia funcional de estas neuronas neoformadas en la fisiopatología de los trastornos del humor sigue siendo controvertida (véase el documento Henn FA, Vollmayr B. «Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon?» *Biol Psychiatry*, 56: 146-50 (2004) **(14)**).

[0023] El conjunto de estas indicaciones muestran que la depresión es una enfermedad compleja cuya fisiopatología es multifactorial y, por consiguiente, el tratamiento de dicha patología sigue siendo un desafío.

[0024] Desde hace más de cuarenta años, la investigación sobre la depresión y el desarrollo de medicamentos eficaces han estado dominados por la hipótesis monoaminérgica. Aunque los neurotransmisores monoaminérgicos (serotonina, noradrenalina y dopamina) están implicados de forma indiscutible, el número de hipótesis sobre la fisiopatología de la depresión y los mecanismos de acción de los AD no ha dejado de evolucionar.

[0025] Los efectos secundarios conocidos de los antidepresivos están vinculados a los modos de acción de estos. Por ejemplo, los antidepresivos pueden inducir taquicardia, un aumento de peso, un descenso de la libido, sudoración, una pérdida del apetito y alteraciones neurológicas, tales como cefaleas, accidentes cerebrovasculares (ACV) y crisis de epilepsia.

[0026] Los medicamentos AD utilizados hoy en día producen una gama de efectos indeseables, entre los cuales la sequedad bucal, visión borrosa y alteración de la función intestinal (diarrea o estreñimiento). Incluso aunque muchos efectos secundarios son pasajeros (como las náuseas), algunos parecen ser constantes al cabo del tiempo (como los efectos sexuales) y podrían afectar a la asiduidad del tratamiento a largo plazo. Ésta es la razón por la cual la investigación de nuevas moléculas que actúen sobre receptores o canales recientemente identificados en la depresión es crucial.

[0027] Algunas proteínas (receptores y canales) estuvieron implicadas en los mecanismos moleculares de la depresión. Éste es particularmente el caso del receptor 3 de neurotensina (NTSR3), denominado originalmente sortilina y del canal potásico de fondo TREK-1 cuya inactivación en ratón produce un fenotipo de resistencia a depresión (Heurteaux, Lucas, Guy, El Yacoubi, Thümmler, Peng, Noble, Blondeau, Widmann et al. «Deletion of TREK-1, a background potassium channel, results in a depression-resistant phenotype» Nature Neurosci., 9, 1134-1141 (2006) (15)). A día de hoy, no se ha identificado ninguna molécula que interactúe eficazmente con estos canales.

[0028] Por lo tanto, existe una necesidad real de nuevas moléculas utilizables para el tratamiento de trastornos psiquiátricos, particularmente de la depresión, moléculas más eficaces, mejor toleradas y que tengan una acción más rápida.

Exposición de la invención

[0029] La presente invención tiene exactamente el papel de responder a la necesidad y resolver los inconvenientes de la técnica anterior.

[0030] La maduración del NTSR3 libera un péptido, denominado propéptido, que se convierte en un ligando de este mismo tipo de receptor. De forma interesante, este propéptido también es capaz de bloquear la actividad del canal TREK-1.

[0031] En efecto, el NTSR3 se sintetiza en forma de un precursor (proNTR3-sortilina). La maduración de este precursor, realizada por la furina, libera un péptido (propéptido) de 44 aminoácidos cuya secuencia es la siguiente:

QDRLDAPPPPAAPLPRWSGPIGVSWGLRAAAAGGAFPRGGRWRR

SEC ID Nº 1

[0032] Este péptido es capaz de unirse al receptor (NTSR3) maduro. Estudios de relaciones estructura-función muestran que una parte de 17 aminoácidos de este péptido porta toda la actividad de unión al receptor. Esta parte del péptido es la siguiente:

APLPRWSGPIGVSWGLR

SEC ID Nº 2

[0033] Esta secuencia SEC ID Nº 2 corresponde a la parte subrayada del péptido grande. Es este péptido (que se ha denominado propéptido) el que se ha utilizado en los experimentos descritos a continuación.

[0034] La presente invención se refiere por lo tanto al péptido de secuencia ID Nº 2. Los «fragmentos» y «derivados» de este péptido son aquellos que el especialista en la técnica puede deducir fácilmente de las secuencias ID Nº 1 ó 2 adjuntas, por ejemplo sustituyendo aminoácidos por su(s) equivalente(s) o acortando el péptido sin que su actividad sea modificada por ello.

[0035] Estos «fragmentos» o «derivados» son tales que conservan la propiedad de ligando del receptor 3 de neurotensina (NTSR3) que posee el péptido de la presente invención. En la siguiente descripción, el péptido de la

invención se denominará «péptido» o «propéptido». Los «derivados o fragmentos» también pueden considerarse como análogos del péptido de la presente invención.

5 **[0036]** El periodo de semi-vida *in vivo* de este péptido aún no ha sido establecido, sin embargo para mejorar la estabilidad o la biodisponibilidad de este péptido, los inventores han previsto ya modificaciones en cada uno de los aminoácidos así como sobre la naturaleza de los enlaces entre cada aminoácido. Las modificaciones son, por ejemplo, las siguientes:

- 10
- sustitución de al menos un aminoácido por otro de de la misma familia (aromático, hidrófobo, básico, etc.);
 - sustitución de un aminoácido natural (aminoácido L) por el mismo aminoácido en forma D;
 - sustitución de un enlace peptídico entre dos aminoácidos por un enlace pseudo-peptídico.

15 **[0037]** Estas modificaciones generan en efecto péptidos que son resistentes al ataque proteolítico de las peptidasas y proteasas.

20 **[0038]** La presente invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido. Números de entrada al GenBank para los ARNmensajeros de la sortilina SORT 1, en el ratón: NM_019972, en el ser humano: NM_002959. Esta secuencia peptídica es por ejemplo la secuencia de referencia SEC ID N° 2 en la lista de secuencias adjunta. Puede tratarse de cualquier secuencia apropiada que codifica el péptido de la presente invención. Esta secuencia es preferiblemente utilizable para fabricar el péptido de la presente invención mediante transfección.

25 **[0039]** La presente invención también se refiere a un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Puede tratarse de cualquier vector apropiado para la transformación de una célula huésped para hacer que dicha célula fabrique, mediante una técnica de recombinación genética, el péptido de la presente invención. El vector puede obtenerse a partir de un vector seleccionado, por ejemplo, entre el grupo que comprende pIRES y pIRES2 y sus derivados, pcDNA3 y sus derivados, pGEX y sus derivados.

30 **[0040]** La presente invención también se refiere, por lo tanto, a una célula huésped que comprende un péptido de la presente invención y/o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y/o un vector de acuerdo con la presente invención. La célula huésped puede ser cualquier célula apropiada para ser transformada y fabricar dicho péptido de la invención. Puede tratarse, por ejemplo de células COS-7, HEK 293 y derivadas, N1E115 y emparentadas.

35 **[0041]** La presente invención también se refiere, por lo tanto, a un procedimiento de producción de un péptido, que comprende las siguientes etapas:

- 40
- transfectar una célula huésped con un ácido nucleico de la invención o transformar una célula huésped con un vector de la invención;
 - cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la expresión del péptido de secuencia ID N° 2; y
- 45
- recuperar dicho péptido de secuencia ID N° 2.

50 **[0042]** Las técnicas de transfección y de transformación utilizables para fabricar el péptido de la presente invención son las conocidas por el especialista en la técnica, por ejemplo las descritas en el documento Krieger DE, Erickson BW, Merrifield RB. «Affinity purification of synthetic peptides» Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos.; 73: 3160-3164 (1976) (16).

55 **[0043]** De acuerdo con la invención, el procedimiento de fabricación preferido del péptido es la síntesis química, por ejemplo en fase sólida. Puede utilizarse cualquier técnica conocida por el especialista en la técnica. Por ejemplo, el péptido puede sintetizarse de acuerdo con la técnica en fase sólida del documento Krieger DE, Erickson BW, Merrifield RB. «Affinity purification of synthetic peptides» Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos.; 73: 3160-3164 (1976) (16).

60 **[0044]** La molécula de la presente invención abre una nueva vía en la implementación de una nueva clase de antidepresivos y de nuevas estrategias terapéuticas de las enfermedades psiquiátricas.

[0045] La presente invención también se refiere, por lo tanto, a la utilización de un péptido de acuerdo con la invención como medicamento.

[0046] En particular, la presente invención se refiere a la utilización de este péptido para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos psiquiátricos, por ejemplo para la fabricación de un antidepresivo y/o de un analgésico.

5 [0047] El péptido de la presente invención tal como se ha definido anteriormente, es un producto natural que constituye un nuevo tipo de antidepresivo. Éste permite evitar todos los efectos secundarios no deseables de los medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento de los trastornos psiquiátricos. Los efectos secundarios de los medicamentos utilizados en la técnica anterior provienen de su naturaleza química. Estos medicamentos de la técnica anterior son moléculas que tienen a menudo la propiedad de pasar las membranas celulares de manera pasiva, lo que conlleva interacciones no específicas con efectores intracelulares. El carácter peptídico o pseudo-peptídico del péptido de la presente invención permite evitar este problema.

10 [0048] Por otro lado, La acción directa del péptido de la presente invención sobre el canal potásico TREK-1 podría acortar mucho los plazos de acción, a menudo largos de un antidepresivo convencional (véase la técnica anterior anteriormente).

15 [0049] Además, el canal TREK-1 es sensible al estiramiento, a la osmolaridad y a la temperatura. Los inventores demostraron que TREK-1 es uno de los sensores moleculares implicados en la percepción del dolor. Se expresa mucho en las neuronas sensoriales de pequeño tamaño de los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal, está presente a la vez en las neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas y está colocalizado con TRPV1, un canal iónico no selectivo activado por capsaína e implicado en hiperalgesia térmica. Los ratones KO («*knock-out*») son más sensibles a las sensaciones de dolor y al calor. Este fenotipo se localiza en las fibras-C polimodales, que son más sensibles al calor. Los ratones KO son también más sensibles a estímulos mecánicos de umbral bajo y muestran una hiperalgesia térmica y mecánica aumentada en condiciones de inflamación. Este trabajo, publicado en el documento Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noël J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalié A, Lazdunski M. «TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception» EMBO J; 25: 2368-2376 (2006) (17) designa al canal TREK-1 como una diana muy interesante para el desarrollo de nuevos analgésicos. Por consiguiente, cualquier molécula activa sobre estos canales TREK-1 puede tener repercusiones terapéuticas importantes en el campo de la nocicepción.

20 [0050] Además el NTSR3 está implicado en la inflamación. Los inventores demostraron que el NTSR3 era responsable de los efectos de la neurotensina (NT) sobre la migración y la liberación de citoquinas inflamatorias de células microgliales (véase los documentos Martin S, Vincent JP, Mazella J. «Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia» J Neurosci. 23: 1198-1205 (2003) (18) y Martin S, Dicou E, Vincent JP, Mazella. J. «Neurotensin and the neurotensin receptor-3 in microglial cells» J Neurosci Res.; 81: 322-326 (2005) (19).

25 [0051] El péptido de la presente invención posee la propiedad de antagonizar los efectos de NT. Por consiguiente, cualquier molécula capaz de bloquear los efectos pro-inflamatorios de NT puede tener repercusiones terapéuticas importantes en el campo de la inflamación cerebral.

30 [0052] Otras ventajas podrán ser evidentes para el especialista en la técnica con la lectura de los siguientes ejemplos, que se dan, por supuesto, a título ilustrativo y no limitante en referencia a las figuras adjuntas.

35 Breve descripción de las figuras

[0053] La figura 1 representa una transferencia de Western preparada a partir de extractos de membrana de células COS-7 transfectadas con el canal TREK-1 con o sin el receptor NTSR3, inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-TREK-1 y/o los receptores NTSR3/sortilina se revelan con ayuda de un anticuerpo anti-sortilina.

40 [0054] La figura 2 representa curvas que presentan resultados experimentales de mediciones de inhibición de la actividad de canales TREK-1. En el gráfico A, en abscisas, se representa la densidad de la corriente 1 (pA/pF) y en ordenadas, la tensión aplicada (V), expresada en mV. En el inserto, los trazos que representan la amplitud de la corriente en los diferentes valores de los potenciales. Control: condiciones de referencia, AA, activación de la corriente con 10 μ M de ácido araquidónico, AA + PE, activación de la corriente con 10 μ M de ácido araquidónico en presencia de 100 nM de PE. En el gráfico B, en abscisas, se representa el porcentaje de inhibición de la corriente TREK-1 activada con 10 μ M de AA (% de inhibición medido a 0 mV) y en ordenadas, la concentración de PE, expresada en nM. En estas figuras, pA = picoAmperio y pF = picoFaradio.

45 [0055] La figura 3 representa histogramas que presentan resultados experimentales del ensayo de natación forzada realizados con tres modos de inyección diferentes y con diferentes sustancias inyectadas. Se trata, en este caso, de un ensayo de resignación. En los tres gráficos, en abscisas, el tiempo durante el cual el animal permanece inmóvil (en segundos - seg) y en ordenadas, las diferentes sustancias ensayadas.

50 [0056] La figura 4 representa histogramas que presentan resultados experimentales de ensayos también de resignación CSMT (Conditioned Suppression of Motility: «condicionamiento de supresión de movilidad») y TST (Tail

Suspension Test: «ensayo de suspensión por la cola») con diferentes sustancias inyectadas. En el gráfico de CMST, en abscisas, el número de pases de una casilla a la otra y el número de restablecimientos y en ordenadas, las diferentes sustancias ensayadas. En el gráfico de TST, en abscisas el tiempo durante el cual el animal permanece inmóvil (en segundos - seg) y en ordenadas, las diferentes sustancias ensayadas.

5 [0057] La figura 5 representa un gráfico de medición de la neurogénesis en presencia de suero fisiológico, de fluoxetina o del péptido de la presente invención inyectado durante 2 semanas. En abscisas, el número de células positivas al marcado con BrdU. En ordenadas, las sustancias ensayadas.

10 [0058] La figura 6 representa histogramas que presentan ensayos de sensibilidad al dolor (a la izquierda: ensayo de la placa caliente ("Hot plate" - a la derecha ensayo de «tail flick» (sacudida de la cola)). En los histogramas A y B, en ordenadas, el tiempo que el ratón emplea en reaccionar en segundos y en abscisas, las soluciones inyectadas en los ratones.

15 [0059] La figura 7 representa un histograma que presenta las crisis epilépticas en ratones. En el histograma, el eje de ordenadas representa el número de ratones y en abscisas las fases de la epilepsia. La medición se realiza en función de la inyección de kainato a 30 mg/kg en ratones tratados con 100 μ l de suero fisiológico o con 100 μ l de una solución 10^{-5} M de péptido («PE 10^{-5} M»).

20 [0060] La figura 8 representa un histograma de cuantificación del tamaño del infarto provocado por una isquemia focal (modelo de accidente cerebrovascular) en ratones. En el histograma, el eje de ordenadas representa el volumen del infarto y el eje de abscisas la solución inyectada: una solución de suero fisiológico («SUERO FI») o una solución de propéptido («PE 10^{-5} M»).

25 [0061] La figura 9 muestra un histograma que representa las ingestas de bebida y de alimento a 6 h y 72 h después del último tratamiento en ratones que hubieran sufrido una inyección diaria durante 15 días. En el histograma, el eje de ordenadas representa el peso en gramos y en abscisas las soluciones inyectadas: solución de suero fisiológico («SUERO FI») o una solución de propéptido a una concentración de 10^{-5} M («PE 10^{-5} M»).

30 [0062] La figura 10 muestra un histograma que representa la neurogénesis en ratones después de 4 días de tratamiento. En el histograma, el eje de ordenadas representa el número de células positivas a Bromodesoxiuridina (BrdU) y en abscisas las soluciones inyectadas: solución de suero fisiológico («SUERO FI»), una solución de propéptido a una concentración de 10^{-5} M («PE 10^{-5} M») o una solución que comprende fluoxetina a una concentración de 3 mg/kg («FLUOXETINA (3 mg/kg)»).

35 EJEMPLOS

[0063] Los inventores emprendieron experimentos de electrofisiología para demostrar la inhibición de la actividad de los canales TREK-1 por el propéptido de la presente invención y diferentes ensayos llamados de comportamiento que pretenden validar la propiedad antidepressiva del propéptido. En efecto, el equipo del Dr. C. Heurteaux demostró que la invalidación en ratón del gen del canal TREK-1 (TREK-1^{-/-} o KO-TREK-1) otorgaba a los animales un fenotipo de resistencia a la depresión medida a través de ensayos de comportamiento reconocidos como vinculados a la depresión (15). Por consiguiente, cualquier molécula capaz de inhibir los canales TREK-1 o de reproducir un comportamiento de tipo TREK-1^{-/-}, puede considerarse como potencialmente antidepressiva.

45 [0064] Los inventores también realizaron experimentos de colocalización entre TREK-1 y sortilina en cortes de tronco del encéfalo de ratón.

50 Ejemplo 1: Ensayos sobre TREK-1

[0065] El equipo de Catherine Heurteaux ha demostrado que el canal potásico TREK-1 podía ser una diana para el tratamiento de la depresión y que los antagonistas de esta canal podían tener la propiedad de ser potentes antidepressivos.

55 [0066] El TREK-1 está regulado por los neurotransmisores que modulan el nivel de AMPc mediante receptores que activan la vía de las proteínas Gq como, el receptor 5-HT (serotonina). La eliminación de TREK-1 da como resultado un fenotipo anti-depresión con un aumento efectivo de la neurotransmisión 5-HT. Los ratones KO-TREK-1 desarrollan un comportamiento similar a la de ratones sin tratamiento previo tratados con los antidepressivos convencionales (15). Estos datos sugieren que los bloqueantes del canal TREK-1, que no existen hoy en día, pueden llevar a una nueva generación de antidepressivos. Por lo tanto, es importante identificar todo lo que puede afectar al tráfico, el direccionamiento y la función del canal TREK-1. Se trata de descubrir socios que modulen estas propiedades.

65 [0067] Los inventores de la presente invención demuestran en este caso que un buen candidato es el receptor-3 de neurotensina, el NTSR3 también llamado sortilina. Esta proteína multifuncional (NTSR3/sortilina) puede desempeñar, en efecto, el papel de receptor o de co-receptor y posee varios ligandos tales como neurotensina,

lipoproteína lipasa y el propéptido liberado durante la maduración del precursor de NTSR3/sortilina. Este propéptido es un antagonista específico de los efectos de la neurotensinas. El NTSR3/sortilina también desempeña un papel en el direccionamiento de otras proteínas a la superficie celular.

5 **[0068]** Con el objetivo de ver si el NTSR3/sortilina desempeña un papel en el tráfico del canal TREK-1, los inventores emprendieron experimentos que pretenden investigar la existencia de interacciones entre las dos proteínas. Para ello, realizaron transfecciones en las células COS-7 con las dos proteínas NTSR3/sortilina y TREK-1.

10 **[0069]** Los resultados muestran que la inmunoprecipitación de los extractos celulares con un anticuerpo anti-TREK-1 co-precipita el NTSR3/sortilina (figura 1 adjunta). Además los inventores demostraron una interacción funcional entre TREK-1 y NTSR3/sortilina por medio de experimentos de electrofisiología: la activación de TREK-1 con ácido araquidónico es bloqueada por el propéptido, un inhibidor específico y selectivo de NTSR3/sortilina (figura 2).

15 **[0070]** Para obtener el gel representado en la figura 1, las células COS-7 transfectadas con TREK-1 y NTSR3/sortilina se lisaron. El sobrenadante se incubó con un anticuerpo anti-TREK-1 (IP: α -TREK-1) en presencia de proteína-A sefarosa durante 16 horas a 4°C.

20 **[0071]** Las proteínas precipitadas de este modo se depositan sobre un gel SDS-PAGE y a continuación se transfieren sobre nitrocelulosa. La proteína NTSR3/sortilina se detecta con ayuda de un anticuerpo anti-NTSR3/sortilina.

Ejemplo 2: Acción del propéptido sobre la actividad del canal TREK-1

25 **[0072]** Todos los experimentos de medición del efecto del propéptido se realizaron en células COS-7 (línea celular obtenida de fibroblastos de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*). Estas células se siembran a una densidad de 20.000 células/placa de 35 mm de diámetro, 24 horas antes de ser transfectadas mediante el método de DEAE-dextrano con 1 μ g de plásmido pIRES-EGFP-TREK-1. Las mediciones de corriente se realizan de 48 a 72 horas después de la transfección.

30 **[0073]** Cultivo de las células COS-7. Las células COS-7 (referencia ATCC: CRL-1651) se cultivan en un medio DMEM (Gibco)/ suero fetal de ternero al 10% (SFT, ICN), a 37°C en presencia del 5% de CO₂.

35 **[0074]** Transfección con DEAE dextrano. El día 1, las células COS-7 se siembran a 20.000 células por placa de 35 mm de diámetro que contiene 2 ml de medio de cultivo. El día 2, el medio se elimina y las células se recubren con 200 μ l de PBS (Gibco) que contiene 1 μ g de plásmido pIRES-EGFP-TREK-1 y 100 μ g de DEAE-dextrano (Sigma) y a continuación se colocan a 37°C/5% de CO₂. Después de 30 minutos de incubación, se añaden 2 ml de un medio DMEM/NuSuero al 10%/cloroquina 80 μ M. Después de 3 horas, el medio se sustituye por 2 ml de DMEM/SFT al 10% y las células se incubaron de 48 a 72 horas antes de medirlas mediante métodos electrofisiológicos

40 **[0075]** Mediciones electrofisiológicas: todas las mediciones se realizan a temperatura ambiente, es decir a 21 - 22°C. Las células que han sido transfectadas con el plásmido se localizan gracias a la fluorescencia emitida por la EGFP después de excitación a 480 nm.

45 **[0076]** La técnica de *patch clamp* (pinzamiento) en célula completa se utilizó para medir la actividad de los canales TREK-1. El instrumental utilizado es el RK 400 *patch-clamp amplifier* (Axon Instruments, Estados Unidos). Las pipetas de pinzamiento de resistencia 1,3 a 8 M Ω se preparan a partir de capilares de vidrio de borosilicato y se llenan con una solución de KCl 155 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 5 mM, HEPES 10 mM/KOH pH 7,2.

50 **[0077]** El medio de cultivo celular se sustituye por una solución de NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 3 mM, CaCl₂ 1mM, 10 HEPES/NaOH pH 7,4 que contiene 10 mM de cloruro de Tetraetilamonio, 3 mM de 4-Aminopiridina. Las células se perfunden de forma continua con esta solución. El potencial de reposo de la membrana de la célula medida se fija a -80 mV.

55 **[0078]** Las variaciones de voltaje se obtienen mediante subida continua (de - 100 a + 50 mV) o mediante salto de potencial de 10 mV (de -100 a + 40 mV, 1,5 segundos por salto).

60 **[0079]** Los datos obtenidos se analizaron con el programa Pclamp. Las corrientes descritas en la figura 2B adjunta se obtuvieron a 0 mV, los resultados expresados son las medias \pm la desviación estándar. El valor de Cl₅₀ se obtuvo trazando los datos experimentales con ayuda de una función sigmoidea.

[0080] La actividad del canal se mide a continuación mediante la técnica de «*patch-clamp*» (pinzamiento) en configuración de célula completa como se describe a continuación.

[0081] En condiciones basales, es decir en ausencia de activación con ácido araquidónico (conocido por ser un activador potente del canal TREK-1), 100 μ M de propéptido inhiben el 25% de la actividad del canal medida a 0 mV (31 pA/pF frente a 23 pA/pF).

5 **[0082]** En las condiciones en las que el canal se activa con 10 μ M de ácido araquidónico (31 pA/pF frente a 130 pA/pF), 100 μ M de propéptido inhiben el 67% de la actividad del canal medida a 0 mV (130 pA/pF frente a 56 pA/pF).

10 **[0083]** En las mismas condiciones experimentales, se realizó una curva de respuesta a la dosis de la inhibición de la actividad de los canales TREK-1 medida a 0 mV y se representa en la figura 2B adjunta. Esta indica una concentración de semi-efecto (CI_{50}) de 70,7 nM.

Ejemplo 3: Ensayos de comportamiento

15 **[0084]** Los inventores realizaron tres tipos de experimentos de comportamiento considerados como convencionales para determinar la actividad antidepresiva de una sustancia (Nestler E.J., Gould E., Manji H., Buncan M., Duman R. S., Greshenfeld H. K., Hen, R. et al. «Preclinical models: status of basic research in depression» Biol Psychiatry. 15, 503-528 (2002) **(20)** y Cryan, J. & Holmes, A. «The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety» Nat Rev Drug Discov. 4, 775-790 (2005) **(21)**). Los efectos del propéptido de la presente invención se compararon con los de la solución salina en la que se disuelve y con los de la fluoxetina, un antidepresivo de los más utilizados en clínica. La cepa de ratones utilizada es la cepa C57Black/J. También se midieron ratones TREK-1^{-/-} en estos diferentes ensayos.

20 **[0085]** El propéptido se disuelve en una solución salina al 0,9% de NaCl a las concentraciones deseadas: 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M y 10⁻⁸ M. Se inyectan diferentes volúmenes en función de la técnica utilizada:

- 25
- intra cerebroventricular: 5 μ l
 - intravenosa: 100 μ l
 - 30 - intraperitoneal: 100 μ l

[0086] Para las inyecciones ICV se utiliza una jeringa Hamilton (Fisher Bioblock) (marca comercial) de 10 μ l, y en el caso de las inyecciones IV o IP es una aguja 0,45 x 12 mm la que se utiliza.

35 A. Ensayo de natación forzada (o *Forced Swimming Test*, FST) (Cryan & Holmes, 2005 (21))

[0087] El experimento consiste, 30 minutos después de la inyección de la sustancia a ensayar, en sumergir al ratón durante 6 minutos en un recipiente de 15 cm de diámetro, de 30 cm de altura que contiene 11 cm de agua a 22°C y medir el tiempo de inmovilidad durante los 4 últimos minutos. Los ratones tratados con antidepresivos tienen tiempos de inmovilidad inferiores a los de los ratones de control. Los inventores ensayaron diferentes vías de inyección del péptido y de la solución salina: intracerebroventricular (ICV), intravenosa (IV) o intraperitoneal (IP). Se utilizaron solamente inyecciones IP para administrar fluoxetina. Se realizó un control con una inyección de suero fisiológico.

40 **[0088]** Los resultados de estos ensayos se representan en la figura 3 adjunta: Ensayos FST, los valores \pm DE se comparan estadísticamente con la condición de control (suero fisiológico) *** $p < 0,001$, (ensayo «ANOVA» con 2 factores = ensayo de análisis de varianzas seguido de un ensayo *post-hoc*).

45 **[0089]** Sea cual sea la vía de administración, los efectos del propéptido de la presente invención son comparables a los provocados por la fluoxetina. Los ratones tratados con el propéptido tienen un comportamiento idéntico a los ratones KO-TREK-1.

50 **[0090]** En los dos ensayos siguientes, el propéptido de la presente invención se administró por vía IV a razón de 100 μ l a 1 μ M por animal.

55 B. Ensayo de la suspensión por la cola (o «Tail Suspension Test», TST) (véase los documentos Cryan, J. & Holmes, A. (2005) **(21)** y Ripoll, N., David, D., Dailly, E., Hascoet, M. & Bourin, M. «Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension» Behav Brain Res. 143(2): 193-200 (2003) **(22)**.)

60 **[0091]** El experimento consiste, 30 minutos después de la inyección de la sustancia ensayada al ratón, en suspender al ratón por la cola con ayuda de una cinta adhesiva y en medir el tiempo de inmovilidad durante 6 minutos.

65 **[0092]** Como se indica en el gráfico de la figura 4 adjunta (TST), los ratones tratados con antidepresivos tienen tiempos de inmovilidad reducidos con respecto a los ratones de control.

[0093] En este experimento también, los efectos del propéptido de la presente invención son comparables a los provocados por la fluoxetina, y los ratones tratados con el propéptido tienen un comportamiento idéntico a los ratones TREK-1^{-/-} (figura 4, TST)).

5 [0094] El propéptido se disuelve en una solución salina al 0,9% de NaCl a las concentraciones deseadas: 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M y 10⁻⁸ M. Se inyectan diferentes volúmenes en función de la técnica utilizada:

- intracerebroventricular: 5 µl
- intravenosa: 100 µl
- 10 - intraperitoneal: 100 µl

[0095] Para las inyecciones ICV se utilizó una jeringa Hamilton (Fisher Bioblock) (marca comercial) de 10 µl, y en el caso de las inyecciones IV o IP es una aguja de 0,45 x 12 mm la que se utiliza.

15 **C. Ensayo de supresión de movilidad condicionada (o «Conditioned Motility Suppression Test», CMST)** (véase el documento Daugé, V., Sebret, A., Beslot, F., Matsui, T., & Roques B. «Behavioral profile of CCK2 receptor-deficient mice» *Neuropsychopharmacol*; 25: 690-698 (2001) (23).

[0096] El experimento consiste en condicionar, el día 1, el ratón y, el día 2, medir los efectos de las sustancias.

20 [0097] Día 1, cada ratón se coloca en una caja en la que el suelo es una rejilla metálica unida a un estimulador eléctrico. El condicionamiento consiste en generar 30 secuencias constituidas por un choque eléctrico (200 ms a 1,8 mA) seguido de 12 segundos de latencia (tiempo total de condicionamiento: 6 minutos). Los ratones se devuelven a continuación a la jaula y se les deja recuperarse durante 24 horas.

25 [0098] Día 2, a los ratones se les inyectan las diferentes sustancias ensayadas y a continuación después de 30 minutos, se vuelven a colocar en la caja que sirvió para el condicionamiento y el la que el suelo se ha dividido en 6 casillas idénticas. No se suministra ningún choque eléctrico.

30 [0099] La medición se realiza contando de forma manual durante 6 minutos el número de veces en el que cada ratón cambia de casilla o se endereza.

[0100] Los ratones sometidos a choques no tratados (suero fisiológico) prácticamente no se mueven («freezing»), los ratones sometidos a choques tratados recuperan una movilidad importante con respecto a estos últimos: 5 veces superior con fluoxetina (a razón de una inyección de 3 mg/kg) y 7 veces superior con el propéptido de la presente invención.

[0101] Los resultados experimentales de este ensayo se representan en la figura 4 adjunta. Los ratones TREK-1^{-/-} tienen una movilidad 6 veces superior al control (CSMT en la figura 4).

40 [0102] El conjunto de estos resultados experimentales demuestran claramente que el propéptido de la presente invención posee propiedades de antidepresivo al menos tan eficaces como las de la fluoxetina o incluso superiores en el caso del ensayo de «condicionamiento de supresión de movilidad».

45 [0103] Además, el hecho de que el propéptido de la presente invención actúe tanto por vías intravenosa o intraperitoneal como por vía intracisternal indica que pasa fácilmente la barrera hemato-meníngea (BHE) para ejercer sus efectos. Esta propiedad abre la posibilidad de tratamientos crónicos y fácilmente transponibles para ensayos clínicos.

50 **Ejemplo 4: Efectos del propéptido sobre la neurogénesis**

[0104] Se sabe que los tratamientos con los antidepresivos aumentan la neurogénesis en el hipocampo (Santarelli, L., Saxe, M, Gross, C, Surget, A, Battaglia, F, Dulawa, S, Weisstaub, N, Lee, J, Duman, R, Arancio, O, Belzung, C, Hen, R et al «Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants» *Science*, 301: 805-809 (2003) (24). Esta proliferación celular se mide mediante el aumento de células «progenitoras» que incorporan un marcador, 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) y se transforman en neuronas maduras. La detección de BrdU se realiza mediante inmunohistoquímica.

[0105] El día 1, a los animales se les inyectaron por vía IP 300 µl de una solución acuosa de 10 mM de BrdU, y a continuación son devueltos a la jaula.

60 [0106] El día 2, los animales son sacrificados y a continuación los tejidos se fijan gracias a la perfusión intracardiaca de una solución fría del 4% de paraformaldehído. Los cerebros se extirpan y a continuación se congelan a -20°C.

[0107] Se preparan cortes seriados de 40 μm , para recubrir la totalidad de la estructura del hipocampo, con ayuda de un vibratomo (Leica). Se conserva un corte de cada seis para medir la incorporación de BrdU con ayuda de un anticuerpo anti-BrdU monoclonal de ratón (Becton Dickinson). Este anticuerpo primario se revela gracias a un anticuerpo secundario acoplado a biotina y a avidina-peroxidasa. La actividad peroxidasa se visualiza mediante hidrólisis de DAB. Las células marcadas de este modo se cuentan en cada corte.

[0108] Para cada grupo, solución salina, propéptido o fluoxetina, los números de células marcadas con BrdU de cada corte se suman y se multiplican por seis para considerar el conjunto de la estructura. Cada grupo está constituido por 3 ratones, los resultados expresados son la media de los tres animales.

[0109] Los resultados obtenidos se representan en el histograma de la figura 5 adjunta. Este gráfico indica la medición de la neurogénesis. El suero fisiológico («SUERO FI») y el propéptido 10 μM («PE 10^{-5} M») se inyectaron durante 2 semanas, la fluoxetina también se administró mediante el agua bebida, solución a 80 mg/l durante 2 semanas, periodo que se ha demostrado necesario para obtener una eficacia de fluoxetina. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

[0110] Estos resultados demuestran claramente que el propéptido induce una neurogénesis importante comparable a la inducida por la fluoxetina. No hay ninguna diferencia significativa entre las mediciones obtenidas con el propéptido y las obtenidas con la fluoxetina (Ensayo ANOVA con un factor seguido por ensayo *post-hoc*).

Ejemplo 5: Efectos del propéptido sobre el dolor

[0111] El péptido de la invención inhibe la actividad de los canales TREK-1. Los principales efectos secundarios previsibles son aquellos inducidos por el bloqueo de la actividad de los canales TREK-1. En efecto, los trabajos del equipo de C. Heurteaux (Heurteaux C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C. et al «TREK-1, a K(+) channel involved in neuroprotection and general anesthesia» EMBO J, 23: 2684-2695 (2004) (25) y Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noël J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. «TREK-1, a K+ channel involved in polymodal pain perception» EMBO J; 25 : 2368-2376 (2006)) (17) mostraron que los ratones invalidados para el canal TREK-1 (TREK-1^{-/-}) eran:

- más sensibles al dolor que los ratones silvestres (Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noël J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. «TREK-1, a K+ channel involved in polymodal pain perception» EMBO J; 25: 2368-2376 (2006)) (17).
- los efectos neuroprotectores de los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido alfa linolénico, en el caso de una isquemia cerebral, desaparecían en los ratones KO, y
- que las crisis de epilepsia inducidas por una inyección de kainato eran mucho más graves y conducían mucho más a menudo a la muerte en los ratones TREK-1^{-/-} (Heurteaux C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C. et al «TREK-1, a K(+) channel involved in neuroprotection and general anesthesia» EMBO J, 23 : 2684-2695 (2004)) (25).

[0112] La sensibilidad al dolor se midió con dos ensayos: el ensayo de la placa caliente y el ensayo de sacudida de la cola «tail flick».

1. La placa caliente (hot plate).

[0113] Este ensayo consiste en medir el tiempo que emplea un ratón para lamerse las patas traseras cuando se posa sobre una placa mantenida a una temperatura dada. Se utilizaron dos temperaturas: 50 y 56°C.

[0114] Los ratones utilizados eran ratones C57BL6/J. Cada grupo estaba constituido por 10 ratones.

[0115] El primer grupo de ratones «sin tratamiento previo» no ha recibido ninguna inyección, el segundo grupo de ratones recibió una inyección intravenosa de 100 μl de suero fisiológico («SUERO FI»), finalmente el tercer grupo recibió una inyección de 100 μl de solución que comprende el péptido de la invención a una concentración de 10^{-6} M («PE 10^{-6} M»).

[0116] A continuación se realizó una medición de la sensibilidad al calor en los tres grupos de ratones y se realizó una comparación de los resultados obtenidos.

[0117] Las mediciones se realizaron 30 minutos después de la inyección.

[0118] Los resultados se presentan en la figura 6A.

[0119] Estos resultados demuestran claramente que no hay ninguna diferencia estadística entre los tres grupos de animales a 50°C: sin tratamiento previo: $19,4 \pm 1,6$ segundo, con inyección de suero fisiológico: $21,3 \pm 2,1$ segundo y con inyección de PE: $21,1 \pm 1,5$ segundos. A 56°C, sin tratamiento previo: $5,3 \pm 1,6$ segundos, con inyección de suero fisiológico: $3,8 \pm 0,7$ segundos y con inyección de PE: $4,6 \pm 0,9$ segundos.

[0120] La medición de la diferencia estadística se realizó utilizando el ensayo ANOVA con un factor seguido del ensayo *post-hoc*.

[0121] Este ejemplo demuestra claramente que el péptido de la invención no induce hiperalgesia.

2. 2. Sacudida de la cola «tail flick»

[0122] Este ensayo consiste en sumergir la cola de un ratón en un baño a 48°C y en medir el tiempo que tarda en retirarla del baño. Antes de cualquier inyección, se realizó un ensayo de habituación en los ratones. Éste consiste en sumergir la cola de cada animal dos veces en el baño para tener grupos homogéneos antes de cualquier tratamiento (obtención de un tiempo de reacción inferior a 12 segundos). Y a continuación se inyectaron 100 µl de suero fisiológico («SUERO FI») o 100 µl de péptido de secuencia ID N° 2 a una concentración de 10^{-6} M («PE 10^{-6} M») en los ratones.

[0123] Los ratones utilizados eran ratones C57BL6/J. Cada grupo estaba constituido por 10 ratones.

[0124] Las mediciones se realizaron 30 minutos después de la inyección. Los resultados presentados en la figura 6B indican que no hay ninguna diferencia significativa entre los dos grupos de ratones: suero fisiológico: $7,0 \pm 0,6$ segundos y PE: $8,3 \pm 0,7$ segundos.

[0125] La evaluación de la diferencia se realizó utilizando el test t de Student. Este test confirmó que no había ninguna diferencia significativa entre los dos grupos.

[0126] El ensayo de la placa caliente y de sacudida de la cola «tail flick» demuestran claramente que la inyección del péptido de secuencia ID N° 2 no induce hiperalgesia.

Ejemplo 6: Efectos del propéptido sobre epilepsia

[0127] En este experimento, los ratones utilizados eran C57BL6/J a razón de 10 ratones por grupo experimental: un grupo «Suero fisiológico», que recibió una inyección intraperitoneal de 100 µl de suero fisiológico y un grupo «PE 10^{-5} M», en el que los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 100 µl de una solución que comprende el péptido de la invención a una concentración de 10^{-5} M. En cada uno de los grupos experimentales, las crisis epilépticas se indujeron mediante inyección intraperitoneal de 100 µl de kainato a razón de 30 mg/kg. La observación de la fase de la crisis de epilepsia se realizó 90 minutos después de la inyección de Kainato. Esta observación se realizó mediante la observación del comportamiento de los ratones.

[0128] Las diferentes fases de la crisis epiléptica se exponen en el documento Tsirka S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., Strickland, S. «Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator», Nature, 377: 340-344 (1995) (26).

[0129] Se definen 6 fases para describir la intensidad de la crisis epiléptica:

- Fase 1: inmovilidad
- Fase 2: movimientos de la cabeza y de la nuca
- Fase 3: actividad clónica unilateral
- Fase 4: actividad clónica bilateral
- Fase 5: convulsiones generalizadas
- Fase 6: muerte del animal

[0130] Los resultados presentados en la figura 7 muestran que el péptido de la invención no solamente no agrava las crisis inducidas por kainato sino que, por el contrario, puede tener un efecto beneficioso ya que solamente 2 animales a los que se les inyectó el péptido alcanzaron la fase 5 frente a 5 en el grupo de «Suero fisiológico». Además el único animal muerto estaba en el grupo de «Suero fisiológico».

[0131] El análisis estadístico se realizó mediante un ensayo ANOVA con 2 factores seguido del ensayo *post-hoc*.

[0132] Este ejemplo demuestra claramente que el propéptido no induce crisis epilépticas y que, por el contrario, presenta un efecto protector frente a la epilepsia.

Ejemplo 7: Efectos del propéptido sobre los riesgos de accidente cerebrovascular (ACV)

[0133] El modelo utilizado para inducir un ACV es el de la isquemia focal, que consiste en la oclusión mediante un filamento de la arteria cerebral media (Heurteaux C, Laigle, C., Blondeau, N., Jarretou, G., Lazdunski, M. «Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia» Neuroscience, 137: 241-251 (2006) (27). El tamaño de los infartos provocados mediante esta isquemia focal se midió después de la tinción con violeta de cresilo de los cortes de cerebro. La medición del infarto se realiza trazando el contorno de la zona infartada mediante un sistema de análisis de imágenes (Olympus DP Soft) según el método descrito en el documento Heurteaux *et al*, 2006 (27). Los cerebros de ratón C57BL6/J (a razón de 10 ratones por grupo experimental) son tratados durante una semana con una inyección intraperitoneal diaria de 100 μ l de una solución que comprende el péptido de secuencia ID N° 2 a una concentración de 10^{-5} M (grupo «PE 10^{-5} M»), c con una solución de suero fisiológico (grupo «SUERO FI»). Los valores se compararon entre los dos grupos.

[0134] Los resultados presentados en la figura 8 demuestran claramente que no hay ninguna diferencia significativa entre los dos grupos de animales.

[0135] La evaluación de la diferencia se realizó utilizando el test *t* de Student. Este test confirmó que no había ninguna diferencia significativa entre los dos grupos.

[0136] Este ejemplo demuestra claramente que el péptido no tiene ningún efecto significativo sobre el tamaño de los infartos provocados por una isquemia focal. Este ejemplo demuestra, por lo tanto, claramente que el péptido de secuencia ID N° 2 no induce un aumento de los daños neuronales y no aumenta el riesgo de accidente cerebrovascular.

Ejemplo 8: Efectos del propéptido sobre la ingesta de alimento

[0137] La ingesta de alimento y de bebida también se midió. Se utilizaron dos grupos experimentales de ratones C57BL6/J (n=10 por grupo): el primer grupo recibiendo una inyección intraperitoneal diaria durante 15 días de 100 μ l de suero fisiológico («SUERO FI»), el segundo grupo recibiendo una inyección intraperitoneal diaria durante 15 días de 100 μ l de una solución que comprende el péptido de secuencia ID N° 2 a una concentración de 10^{-5} M («PE 10^{-5} M»).

[0138] Estas mediciones se realizaron 6 y 72 horas después del fin del tratamiento crónico. No había ninguna diferencia significativa entre los animales tratados y los no tratados tanto para la toma de alimento como para la de bebida (figura 9).

[0139] La evaluación de la diferencia se realizó utilizando el test *t* de Student. Este test confirmó que no había ninguna diferencia significativa sobre la ingesta de alimento y de bebida entre los dos grupos.

[0140] Este ejemplo demuestra claramente que el péptido de secuencia ID N° 2 no tiene ningún efecto significativo sobre la ingesta de alimento de los animales.

Ejemplo 9: Medición del plazo de acción del propéptido

[0141] Al contrario que muchos antidepresivos, utilizados habitualmente hoy en día, la eficacia de acción del péptido de la invención es muy rápida. En efecto, uno de los medios experimentales para demostrar la eficacia de los antidepresivos es medir la neurogénesis (Santarelli, L.; Saxe, M, Gross, C, Surget, A, Battaglia, F, Dulawa, S, Weisstaub, N, Lee, J, Duman, R, Arancio, O, Belzung, C, Hen, R et al «Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants» Science, 301: 805-809 (2003) (24). En efecto, los antidepresivos tales como la fluoxetina, inducen una neurogénesis al cabo de aproximadamente dos semanas. Esta neurogénesis es un elemento clave en el mecanismo de acción de los antidepresivos. En clínica, se ha demostrado que la depresión está asociada a una atrofia de las células piramidales del hipocampo Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., Vannier, M. W. «Hippocampal atrophy in recurrent major depression» Proc Natl Acad Sci Estados Unidos, 93: 3908-3913 (1996) (28) y a una fuerte disminución de la neurogénesis en el giro dentado (Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., Fuchs, E. «Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress» Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos, 95: 3168-3171 (1998)) (29).

[0142] El protocolo experimental es el descrito en la sección material y métodos (Suplemento) de la publicación Santarelli et al, «Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants» Science, 301: 805-809 (2003) (24) a excepción del periodo de tratamiento, que es de cuatro días.

[0143] Los resultados de la figura 10 adjunta indican una gran rapidez de acción del péptido en la inducción de la neurogénesis. Hay un aumento significativo de la neurogénesis con el péptido («PE 10^{-5} M»). La neurogénesis inducida por la fluoxetina («FLUOXETINA, 3 mg/kg ») es idéntica a la inducida por la inyección de suero fisiológico («SUERO FI») durante este periodo de 4 días.

[0144] La evaluación del aumento se realizó utilizando el ensayo ANOVA de un factor, seguido del ensayo *post-hoc*). Este ensayo confirmó que, con respecto al tratamiento «Suero Fi», había un aumento significativo de la neurogénesis inducida por el péptido de la invención pero no por fluoxetina.

5 **[0145]** Los ejemplos demuestran, por lo tanto, claramente que el péptido de la invención puede utilizarse para tratar enfermedades psiquiátricas, fenómenos inflamatorios y/o dolorosos. Además, el péptido de la invención no induce los efectos secundarios conocidos de los antidepresivos del estado de la técnica y tiene un plazo de acción inferior a los antidepresivos del estado de la técnica, es decir una mayor rapidez de acción.

10 Lista de referencias

[0146]

15 (1) Wong, M. & Licinio, J. Research and treatment approaches to (1) Wong, M. & Licinio, J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.*, 2, 343-351 (2001).

(2) Moller HJ. Suicide, suicidality and suicide prevention in affective disorders. *Acta Psychiatr Scand*; 418 (suppl): 73-80 (2003).

20 (3) Nestler E, Barrot M., DiLeone R. J., Eisch A. J., Gold S. J., Monteggia, L. M. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25 (2002).

(4) Baghai TC, Volz HP, Moller HJ. Drug treatment of depression in the 2000s: An overview of achievements in the last 10 years and future possibilities. *World J Biol Psychiatry*, 7: 198-222 (2006).

25 (5) Weilburg JB. An overview of SSRI and SNRI therapies for depression. *Manag Care. Jun*; 13 (6 Suppl Depression): 25-33 (2004).

30 (6) Manji HK, Gottesman II, Gould TD. Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases. *Sci STKE*; 207: pe49 (2003).

(7) Reus VI, Wolkowitz OM. Antiglucocorticoid drugs in the treatment of depression. *Expert Opin Investig Drugs*; 10: 1789-1796 (2001).

35 (8) Griebel G, Simiand J, Steinberg R, et al. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1,3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *J Pharmacol Exp Ther*; 301: 333-345 (2002).

40 (9) Kramer MS, Cutler N, Feighner J, et al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*; 281: 1640-1645 (1998).

(10) Skolnick P. Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol*; 375: 31-40 (1999).

45 (11) Kempermann G, Kronenberg G. Depressed new neurons. Adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Bio/ Psychiatry*; 54: 499-503 (2003).

(12) Malberg JE, Schechter LE. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs. *Curr Pharm Des*; 11: 145-155 (2005).

50 (13) Duman, R. & Monteggia, L. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*; 9, 1116-1127 (2006).

55 (14) Henn FA, Vollmayr B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biol Psychiatry*; 56: 146-150 (2004).

(15) Heurteaux, Lucas, Guy, El Yacoubi, Thümmel, Peng, Noble, Blondeau, Widmann et al., Deletion of TREK-1, a background potassium channel, results in a depression-resistant phenotype, *Nature Neurosci.*, 9, 1134-1141 (2006).

60 (16) Krieger DE, Erickson BW, Merrifield RB. Affinity purification of synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos.*; 73: 3160-3164 (1976).

65 (17) Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noël J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.*; 25: 2368-2376 (2006).

- (18) Martin S, Vincent JP, Mazella J. Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci.*; 3: 1198-1205 (2003).
- 5 (19) Martin S, Dicou E, Vincent JP, Mazella J. Neurotensin and the neurotensin receptor-3 in microglial cells. *J Neurosci Res.*; 81: 322-326 (2005).
- (20) Nestler E.J., Gould E., Manji H., Bunacan M., Duman R. S., Greshenfeld H. K., Hen, R. et al. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry.* 15, 503-528 (2002).
- 10 (21) Cryan, J. & Holmes, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov.* 4, 775-790 (2005).
- (22) Ripoll, N., David, D., Dailly, E., Hascoet, M. & Bourin, M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension. *Behav Brain Res.* 143:193-200. 143, 193-200 (2003).
- 15 (23) Daugé, V., Sebret, A., Beslot, F., Matsui, T., & Roques B. Behavioral profile of CCK2 receptor-deficient mice. *Neuropsychopharmacol.* 25, 690-698 (2001).
- 20 (24) Santarelli, L., Saxe, M, Gross, C, Surget, A, Battaglia, F, Dulawa, S, Weisstaub, N, Lee, J, Duman, R, Arancio, O, Belzung, C, Hen, R et al, Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants, *Science*, 301: 805-809 (2003).
- 25 (25) Heurteaux C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C. et al, TREK-1, a K(+) channel involved in neuroprotection and general anesthesia, *EMBO J*, 23: 2684-2695 (2004).
- (26) Tsirka S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., Strickland, S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator, *Nature*, 377: 340-344 (1995).
- 30 (27) Heurteaux C, Laigle, C., Blondeau, N., Jarretou, G., Lazdunski, M. Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia, *Neuroscience*, 137: 241-251 (2006).
- 35 (28) Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., Vannier, M. W. Hippocampal atrophy in recurrent major depression, *Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos.* 93 3908-3913 (1996)
- 40 (29) Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., Fuchs, E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress, *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos*, 95: 3168-3171 (1998).

LISTA DE SECUENCIAS

[0147]

- 5 <110> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
 Universidad de Niza Sophia-Antipolis
 MAZELLA, Jean
 HEURTEAUX, Catherine
 BORSOTTO, Marc
 10 PETRAULT, Olivier
 WIDMANN, Catherine
- <120> PÉPTIDO DERIVADO DE NSTR3 Y UTILIZACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
 PSIQUIÁTRICAS
 15
- <130> 103065/EP
- <150> EP 07291602.6
 <151> 21-12-2007
- 20 <160> 2
- <170> Patentín versión 3.3
- 25 <210> 1
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 30 <400> 1
- Gln Asp Arg Leu Asp Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Leu Pro Arg
 1 5 10 15
- 35 Trp Ser Gly Pro Ile Gly Val Ser Trp Gly Leu Arg Ala Ala Ala Ala
 20 25 30
- 40 Gly Gly Ala Phe Pro Arg Gly Gly Arg Trp Arg Arg
 35 40
- 45 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 50 <400> 2
- Ala Pro Leu Pro Arg Trp Ser Gly Pro Ile Gly Val Ser Trp Gly Leu
 1 5 10 15
- 55 Arg

REIVINDICACIONES

1. Péptido de secuencia ID N° 2.
- 5 2. Secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2.
- 10 4. Célula huésped que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y/o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 y/o un vector de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Procedimiento de producción de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
 - 15 - transfectar una célula huésped con un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 o transformar una célula huésped con un vector de acuerdo con la reivindicación 3;
 - cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la expresión del péptido de acuerdo con la reivindicación 1; y
 - 20 - recuperar dicho péptido o fragmento o derivado de este péptido.
6. Utilización de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos psiquiátricos, de fenómenos inflamatorios y/o dolorosos.
- 25 7. Utilización de acuerdo con la reivindicación 6, para la fabricación de un antidepresivo.

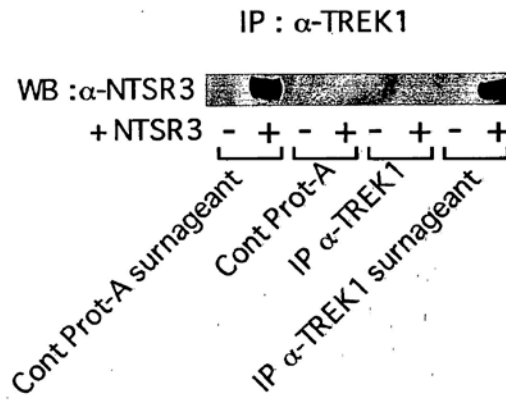


Figura 1

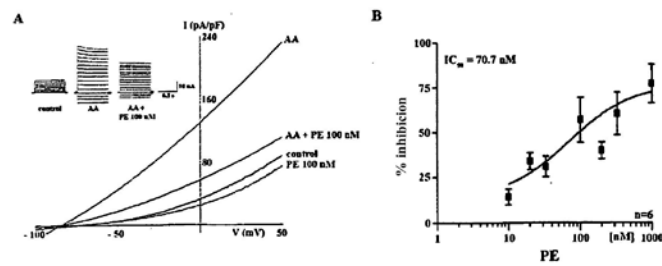


Figura 2

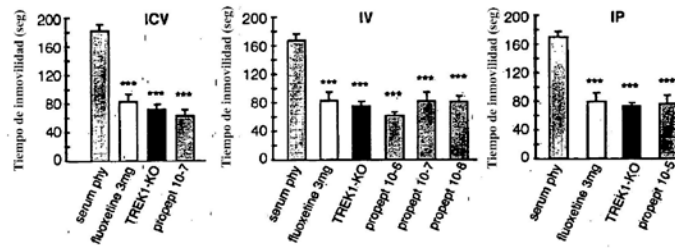


Figura 3

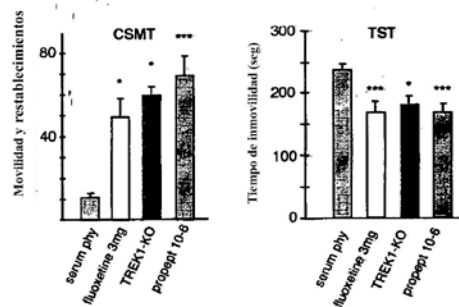


Figura 4

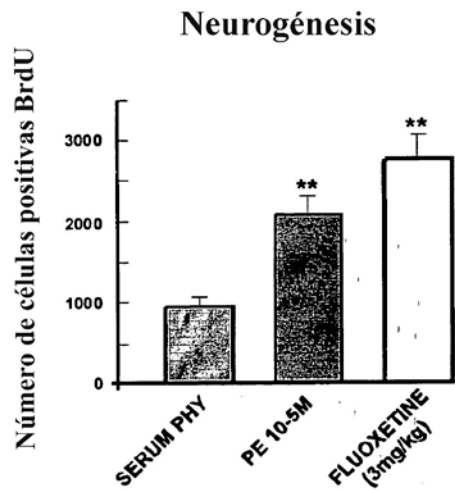


Figura 5

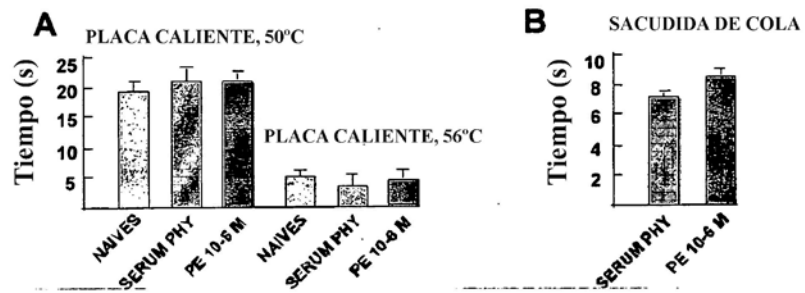


Figura 6

EPILEPSIA

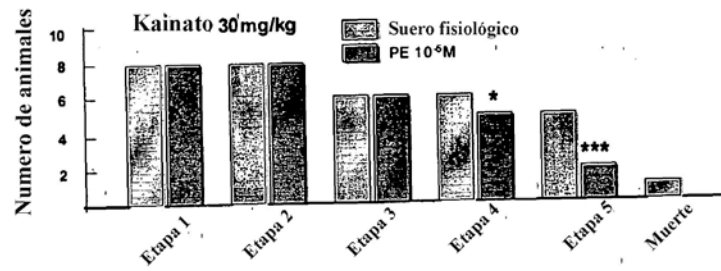


Figura 7

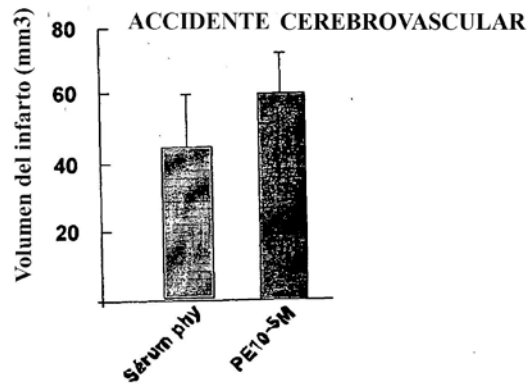


Figura 8

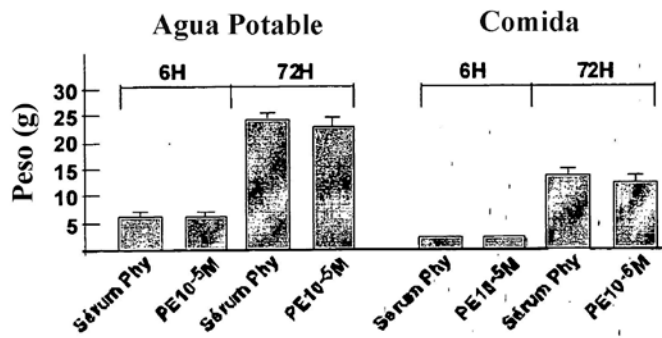


Figura 9

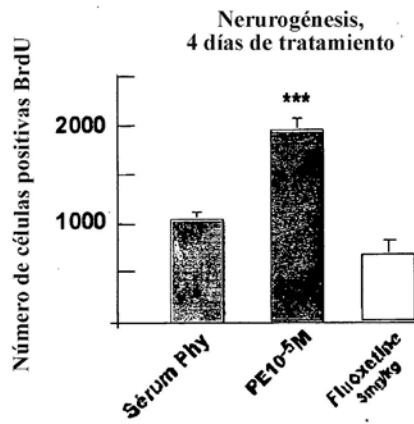


Figura 10