

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 300**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 08787439 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2195007**

54 Título: **Utilización de péptidos de SCO-espondina para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por los ligandos de receptores de la muerte celular**

30 Prioridad:

**24.08.2007 EP 07301323**

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

**06.03.2013**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (100.0%)  
101, RUE DE TOLBIAC  
75013 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**MEINIEL, ANNIE;  
LALLOUE, FABRICE y  
JAUBERTEAU, MARIE-ODILE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 397 300 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Utilización de péptidos de SCO-espondina para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por los ligandos de receptores de la muerte celular.

5

**Campo de la invención**

La invención se refiere a un polipéptido derivado de la TSR (unidades de tromboespondina tipo 1) de SCO-espondina para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por ligandos de receptores de la muerte celular, tales como TRAIL o FasL. Más particularmente, la invención se refiere a dicho polipéptido para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

10

**Antecedentes de la invención**

La pérdida selectiva de células neuronales mediante apoptosis es una característica habitual de las enfermedades neurodegenerativas crónicas tales como enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington (Honig L.S. et al., 2001). Aunque la necrosis se ha considerado como el tipo dominante de muerte celular en patologías agudas o subagudas inducidas por isquemia, toxinas, traumatismo e infección, cada vez más pruebas sugieren que la apoptosis contribuye significativamente a la pérdida neuronal en estos procesos.

20

Cualquiera que sea la causa subyacente, todos los sucesos apoptóticos neuronales comparten características comunes e implican un conjunto prescrito de factores que incluyen la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), que activa c-Jun e incrementa de ese modo la transcripción de diversos factores apoptóticos. Adicionalmente, se ha demostrado que la ruta de la muerte mitocondrial intrínseca, que implica Bax, Apaf-1, caspasa 9, y caspasa 3, es crítica para la apoptosis tanto en neuronas lesionadas en desarrollo y maduras. Bax, una proteína de la familia bcl-2, es de particular importancia en la apoptosis neuronal. Cuando se sobreexpresa, Bax promueve la muerte celular (Oltvai et al. 1993), y las neuronas simpáticas deficientes en Bax carentes de NGF no sufren apoptosis normal (Deckwerth et al. 1996). Otros miembros de la familia Bcl-2 son también importantes a la hora de modular la apoptosis neuronal, por ejemplo la fosforilación de Bim por JNK potencia la apoptosis dependiente de Bax. (Véase, por ejemplo, Putcha et al. 2001).

25

30

El proceso apoptótico se puede disparar por señales intrínsecas o extrínsecas (Cifone M.G. et al. 1995; Li H. et al. 1999.). El mejor ejemplo de la ruta extrínseca de apoptosis es la superfamilia de citocinas del factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF- $\alpha$ , el ligando Fas (FasL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL). Por ejemplo, se ha dado a conocer que FasL está asociado con una variedad de trastornos neurológicos tales como esclerosis lateral amiotrófica (Yi et al., 2000), enfermedad de Alzheimer (Su et al., 2003), y apoptosis neuronal tras isquemia (Rosenbaum et al., 2000). La activación de las rutas de señalización de receptores de la muerte también se ha detectado durante la enfermedad de Parkinson (Hartmann et al., 2002). La función de otros receptores de la muerte, tales como receptores de TRAIL, también expresados en neuronas, se detectó durante la degeneración neuronal que se produce en varias patologías: procesos inflamatorios tales como esclerosis múltiple (Aktas et al., 2005), modelos experimentales de neurodegeneración (Cantarella et al., 2003; Murata et al., 2006), pacientes con Alzheimer (Uberti et al., 2004) e isquemia (Martin-Villalba et al., 1999).

35

40

45

Por lo tanto, los métodos que inhiben o previenen la apoptosis neuronal serían particularmente beneficiosos para aquellos susceptibles de sufrir lesión neuronal o enfermedad neurodegenerativa.

50

Los polipéptidos utilizados se han descrito en la solicitud de patente internacional WO 99/03890, así como en Monnerie H. et al. (1998) y Meiniel et al. (2003). Hasta ahora los polipéptidos son conocidos por sus propiedades para incrementar el crecimiento neurítico (incluyendo los axones) en las neuronas de la corteza cerebral en casos en los que ya se ha producido la degeneración celular, tal como en pacientes que sufren trastornos neurodegenerativos, lesiones neuronales o traumatismos, etc.

55

Sin embargo, nunca se ha sospechado ni sugerido un papel por su capacidad para prevenir la apoptosis neuronal tal como en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales y neurodegeneraciones víricas en poblaciones en riesgo. Las poblaciones en riesgo incluyen personas que son susceptibles de sufrir tales trastornos, tales como, por ejemplo, miembros sanos de una familia en la que ya se ha producido la enfermedad de Alzheimer o en áreas en las que se podría extender un virus que induce neurodegeneración. En tales casos, existe la necesidad de un medicamento capaz de inhibir la apoptosis neuronal y prevenir consiguientemente tales enfermedades. La presente invención proporciona una solución a esta necesidad demostrando que los polipéptidos descritos son capaces de actuar sobre la apoptosis neuronal mediada por ligandos de receptores de la muerte celular (por ejemplo, TRAIL, FasL).

60

65

**Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia que consiste en:

5            -W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G- (SEC ID N°8)

para uso en un método para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por al menos un ligando de receptores de la muerte celular seleccionado de TRAIL y FasL.

10    La invención también se refiere al polipéptido como se define anteriormente para uso en un método para inhibir o prevenir la apoptosis que resulta de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

**15    Descripción detallada de la invención**

Se ha demostrado que un péptido derivado de la TSR (unidades de tromboespondina tipo 1) de la SCO-espondina inhibe la apoptosis neuronal mediada por los ligandos de receptores de la muerte celular (TRAIL, FasL...).

20    Se describe en la presente memoria el uso de un polipéptido que comprende o consiste en la siguiente secuencia

          -W-S-A1-C-S-A2-C-G- (SEC ID N°1)

en la que A1 y A2 son secuencias de aminoácidos que comprenden 1 a 5 aminoácidos,

25    para la fabricación de un medicamento para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por al menos un ligando de receptores de la muerte celular.

También se describe en la presente memoria un polipéptido que comprende o consiste en la siguiente secuencia

30            -W-S-A1-C-S-A2-C-G- (SEC ID N°1)

en la que A1 y A2 son secuencias de aminoácidos que comprenden 1 a 5 aminoácidos,

35    para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por al menos un ligando de receptores de la muerte celular.

Un primero objeto de la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia que consiste en -W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G- (SEC ID N°8), para uso en un método para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por al menos un ligando de receptores de la muerte celular seleccionado de TRAIL y FasL.

40    Se debería recordar que, en la descripción como un todo, "aminoácido" se entiende que significa tanto los aminoácidos naturales como los aminoácidos no naturales. Se entiende que "aminoácido natural" significa los aminoácidos en la forma L que se puede encontrar en proteínas naturales, es decir, alanina (A), arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), cisteína (C), glutamina (Q), ácido glutámico (E), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), lisina (K), metionina (M), fenilalanina (F), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptófano (W), tirosina (Y) y valina (V). Sin embargo, la presente invención también se refiere a los aminoácidos no naturales, es decir, los aminoácidos anteriores en su forma D, así como las formas homo de algunos aminoácidos, tales como arginina, lisina, fenilalanina y serina, y las formas nor de leucina o valina.

50    El ligando de receptores de la muerte celular según la presente invención es FasL y/o TRAIL.

Ventajosamente, la apoptosis neuronal está asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

55    La expresión "apoptosis neuronal asociada con una enfermedad" se refiere a la apoptosis neuronal que resulta de dicha enfermedad.

60    En una forma de realización particular, los trastornos neurodegenerativos incluyen, pero no se limitan a, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular espinal (SMA), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, enfermedad de priones, parálisis supranuclear progresiva, atrofia sistémica múltiple, adrenoleucodistrofia, síndrome de down y demencia frontotemporal.

En otra forma de realización, la isquemia cerebral puede ser focal o global.

65

En otra forma de realización, los traumatismos neuronales incluyen, pero no se limitan a, degeneración anterógrada, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, y denervación colinérgica.

5 En otra forma de realización, las enfermedades inflamatorias neuronales incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiples (MS), encefalomiелitis, mielopatía asociada a HTLV, y meningitis.

10 En otra forma de realización, las neurodegeneraciones víricas incluyen, pero no se limitan a, demencia asociada a HIV-1, y neurodegeneraciones asociadas con el virus de la leucemia murina de Moloney, virus de la enfermedad de Borna, y virus de Theiler.

También se describe en la presente memoria el polipéptido como se describe anteriormente, para prevenir el envejecimiento.

15 Los ejemplos de polipéptidos como se describen en la presente memoria son tales que:

- A1 de SEC ID N°1 es P;
- A1 representa el péptido que consiste en la secuencia X1-W-X2-X3 (SEC ID N°5) en la que X1, X2, X3 se escogen, independientemente entre sí, del grupo que consiste en G, S y C;
- 20 - A1 representa el péptido que consiste en la secuencia X1-W-S-X3 (SEC ID N°6) y A2 se escoge de R-S, V-S y V-T;
- así como polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia -W-S-X1-W-S-X2-C-S-A2-C-G- (SEC ID N°7), -W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G- (SEC ID N°8) (es decir, el polipéptido de la invención), -W-S-P-C-S-V-T-C-G- (SEC ID N°2), -W-S-S-C-S-V-T-C-G- (SEC ID N°3) o -W-S-Q-C-S-V-T-C-G- (SEC ID N°4).

25 Los polipéptidos de la invención se pueden producir mediante cualquier técnica conocida *per se* en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o en combinación o combinaciones.

30 Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, el experto en la materia puede producir fácilmente dichos polipéptidos, mediante técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar usando el método de fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis peptídica comercialmente disponible (tal como el obtenido de Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

35 Como alternativa, los polipéptidos para su utilización según la invención se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante, como es bien conocido en la actualidad en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos se pueden obtener como productos de expresión del ADN tras la incorporación de secuencias de ADN que codifican una proteína recombinante que comprende el polipéptido deseado en vectores de expresión, y la introducción de tales vectores en hospedantes eucariotas o procariotas adecuados que expresarán la proteína recombinante que comprende el polipéptido deseado, a partir de los cuales se pueden aislar posteriormente usando técnicas bien conocidas.

40 Los polipéptidos para uso según la invención se pueden usar en una forma aislada (por ejemplo, purificada) o contenida en un vector, tal como en una membrana o vesícula lipídica (por ejemplo un liposoma).

45 Alternativamente, se describe en la presente memoria la utilización de un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se define anteriormente para la fabricación de un medicamento para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por al menos un ligando de receptores de la muerte celular tal como TRAIL y/o FasL. Ventajosamente, la apoptosis neuronal está asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

50 La invención también se refiere a un constructo de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención que comprende la secuencia que consiste en -W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G- (SEC ID N°8), para su utilización en un método para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por al menos un ligando de receptores de la muerte celular seleccionado de FasL y/o TRAIL. Ventajosamente, la apoptosis neuronal resulta de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

55 Se describe en la presente memoria un vector que comprende el constructo de ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente para uso en un método para inhibir o prevenir apoptosis neuronal inducida por al menos un ligando de receptores de la muerte celular seleccionado de FasL y TRAIL. Ventajosamente, la apoptosis neuronal está asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en

trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismo neuronal, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

5 Un objeto adicional de la presente descripción es el uso de un vector que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica uno de los polipéptidos descritos anteriormente, para la fabricación de un medicamento destinado a inhibir o prevenir la apoptosis neuronal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

10 Tales vectores/constructos de ácidos nucleicos pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similar, para provocar o dirigir la expresión de dicho polipéptido con la administración a un sujeto. Los vectores pueden comprender además uno o varios orígenes de replicación y/o marcadores seleccionables. La región promotora puede ser homóloga o heteróloga con respecto a la secuencia codificante, y puede proporcionar expresión ubicua, constitutiva, regulada y/o específica de tejidos en cualquier célula hospedante apropiada, incluyendo para uso *in vivo*.

15 Los ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrantes, tales como, por ejemplo, pUC, pcADN, pBR, y similares. Los ejemplos de vector vírico incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, de virus del herpes y de AAV. Tales virus recombinantes se pueden producir mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Los ejemplos típicos de células que empaquetan virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. En los documentos WO 95/14785, WO96/22378, patentes US nº 5.882.877, US nº 6.013.516, US nº 4.861.719, US nº 5.278.056 y documento WO 94/19478, por ejemplo, se pueden encontrar protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos en la replicación.

También se describe en la presente memoria un polipéptido que comprende o consiste en la siguiente secuencia

30 -W-S-A1-C-S-A2-C-G- (SEC ID N°1)

en la que A1 y A2 son secuencias de aminoácidos que comprenden 1 a 5 aminoácidos, para prevenir una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

35 De este modo, un objeto de la invención es un polipéptido que comprende la secuencia que consiste en -W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G- (SEC ID N°8), para uso en un método para prevenir una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales y neurodegeneraciones víricas.

40 Ventajosamente, dichos trastornos neurodegenerativos se seleccionan del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular espinal (SMA), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, enfermedad priónica, parálisis supranuclear progresiva, atrofia sistémica múltiple, adrenoleucodistrofia, síndrome de down y demencia frontotemporal.

45 La presente descripción también se refiere a un método para inhibir o prevenir apoptosis neuronal asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o un constructo de ácido nucleico o vector de la invención.

50 También se describe un método para prevenir una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o un constructo de ácido nucleico o vector de la invención.

55 Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una cantidad suficiente de dicho polipéptido o constructo de ácido nucleico para inhibir o prevenir la apoptosis a una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

60 Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirán por el médico dentro del alcance del juicio médico lógico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el trastorno que se prevenga y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; el tiempo de administración, la ruta de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento profiláctico; fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos

65

en las técnicas médicas. Por ejemplo, está perfectamente comprendido en la pericia de la técnica comenzar dosis del compuesto a niveles menores que los requeridos para lograr el efecto profiláctico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos se puede variar a lo largo de un amplio intervalo, desde 0,01 hasta 1,000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto susceptible de sufrir el trastorno. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferiblemente de 1 mg a alrededor de 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra normalmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

El polipéptido y constructo de ácido nucleico para uso según la invención se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

En las composiciones farmacéuticas para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de la ruta oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublinguales y bucales, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal, y formas de administración rectal.

En una forma de realización particular, los polipéptidos y constructos de ácido nucleico de la invención se administran intratecalmente.

En otra forma de realización particular, los polipéptidos y constructos de ácido nucleico para uso según la invención se suministran a través de una microbomba colocada bajo la piel o directamente en el cerebro. En tal forma de realización, los polipéptidos y constructos de ácidos nucleicos de la invención se suministran a donde son útiles en una cantidad elevada.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estos pueden ser en particular disoluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, de potasio, de calcio o de magnesio, y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que, dependiendo del caso, al añadirles agua esterilizada o disolución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe fluir en el grado en que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe de conservar frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las disoluciones que comprenden compuestos para su utilización según la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y sus mezclas, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

El inhibidor para uso según la invención se puede formular en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico y fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína, y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similar), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede producir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similar. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción

prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante el uso de composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contienen el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución previamente filtrada de forma estéril del mismo.

15 Con la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

20 Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución se debería tamponar adecuadamente si es necesario, y el diluyente líquido se debería hacer en primer lugar isotónico con disolución salina o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, se podría disolver una dosificación en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y se podría añadir a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia, o se podría inyectar en el sitio de infusión propuesto. Necesariamente se producirá cierta variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto susceptible a sufrir el trastorno. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

30 Además de los compuestos para su utilización según la invención formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma actualmente usada.

35 Los compuestos para uso según la invención se pueden suministrar en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de manera que el polipéptido puede penetrar en las regiones de la córnea e internas del ojo, tal como por ejemplo la cámara anterior, la cámara posterior, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el humor vítreo, la córnea, iris/lente ciliar, coroides/retina y esclera. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, un ungüento, aceite vegetal o un material encapsulante. Como alternativa, los inhibidores de la invención se pueden inyectar directamente en el vítreo, el humor acuoso, tejido o tejidos del cuerpo ciliar o células y/o músculos extraoculares por medios de electroporación.

40 La composición farmacéutica puede comprender fluido cerebroespinal sintético. Un ejemplo de fluido cerebroespinal sintético está comercialmente disponible de ALZET Osmotic Pumps (Cupertino, CA, USA).

45 Los inhibidores para uso según la invención también se pueden combinar con otros agentes antiapoptóticos para potenciar su eficacia. Tales agentes pueden incluir rosiglitazona (Jung TW. et al. 2007).

La invención se ilustrará adicionalmente a partir de las siguientes figuras y ejemplos.

#### FIGURAS:

50 Figura 1: Fotografía de células embrionarias del hipocampo en ED18 después de 3 días en cultivo. Los cultivos consisten en células poco diferenciadas organizadas en racimos (neuroesferas, flecha gruesa), y células que migran que abandonan los racimos y que comienzan a diferenciarse (flecha fina).

55 Figura 2: Histograma que representa el porcentaje de células apoptóticas fuera de los racimos en comparación con el número total de células, proporcionándose los datos solamente por un experimento realizado por triplicado. En cada ensayo, el marcaje apoptótico con el método TUNEL se contó en 4 fotos aleatorias en cada portaobjetos, y teniendo siempre al menos 1 neuroesfera. Los cultivos se trataron (casos TSR, FasL, TSR+FasL, TRAIL, TSR+TRAIL, FasL+TRAIL y TSR+FasL+TRAIL) o no se trataron (control, c) durante 7 días con una concentración de péptido de TSR de 375 µg/ml y/o 20 ng/ml de FasL y/u 80 ng/ml de TRAIL).

#### Ejemplo

65 Material y métodos:

## ES 2 397 300 T3

Cultivos de células de hipocampo de ratas fetales: Las células se obtuvieron de cerebros de rata E18. Los tejidos se retiraron en medio de disección (disolución salina balanceada de Hank, HBSS más antibióticos). Composición del medio de disección (HBSS más antibióticos):

- 5 - cloruro de potasio (KCl): 400 mg/l
- fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 60 mg/l
- bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>): 350 mg/l
- cloruro de sodio (NaCl): 8.000 mg/l
- fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 48 mg/l
- 10 - D-glucosa: 1000 mg/l
- penicilina-estreptomicina: 100 unidades/ml

Se retiraron las meninges de los cerebros de embriones, y el hipocampo se disecó en una cápsula de Petri estéril en medio HBSS más antibiótico. Tras la centrifugación, las células se resuspendieron en medio de cultivo MEM con sales de Earl suplementadas con B27, EGF, FGF-2 y antibióticos. La composición del medio de cultivo fue la siguiente:

- hidrocloreuro de L-arginina: 126 mg/ml
- L-cistina: 24 mg/l
- 20 - L-glutamina: 292 mg/l
- hidrocloreuro de L-histidina-H<sub>2</sub>O: 42 mg/l
- L-isoleucina: 52 mg/l
- L-leucina 52 mg/l
- hidrocloreuro de L-lisina: 73 mg/l
- 25 - L-metionina: 15 mg/l
- L-fenilalanina: 32 mg/l
- L-treonina: 48 mg/l
- L-triptófano: 10 mg/l
- L-tirosina: 36 mg/l
- 30 - L-valina: 46 mg/l
- cloruro de colina: 1 mg/l
- pantotenato de D-calcio: 1 mg/l
- ácido fólico: 1 mg/l
- I-inositol: 2 mg/l
- 35 - Niacinamida: 1 mg/l
- hidrocloreuro de piridoxal: 1 mg/l
- Riboflavina: 0,1 mg/l
- hidrocloreuro de tiamina: 1 mg/l
- cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O): 264 mg/l
- 40 - sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O): 200 mg/l
- cloruro de potasio (KCl): 400 mg/l
- bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>): 2200 mg/l
- cloruro de sodio (NaCl): 6800 mg/l
- fosfato de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O): 158 mg/l
- 45 - D-glucosa: 4500 mg/l
- rojo fenol: 10 mg/l
- piruvato de sodio: 110,04 mg/l
- medio B27 (Invitrogen) 50X: 2% v/v
- EGF: 20 mg/l
- 50 - FGF-2: 20 mg/l
- penicilina-estreptomicina: 100 unidades/ml

Los fragmentos de hipocampo se disociaron mecánicamente con 1 jeringuilla de 1 ml y 1 aguja de calibre 25G, y se añadieron con 1 ml de medio de cultivo y se centrifugaron entonces a 1.200 rpm durante 10 min. Entonces se retiró el sobrenadante, y el pelete celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo. Otra disociación mecánica se llevó a cabo con una jeringuilla de 1 ml y una aguja de calibre 25G. El recuento celular se determinó con un hemocitómetro Malassez, y la viabilidad de las células se evaluó contando las células que no absorbieron el azul de tripán. Entonces las células se sembraron en placas de 48 pocillos, a 40.000 células por pocillo en 500 µl de medio de cultivo, en cápsulas de cultivo precubiertas con colágeno.

- 60 Preparación de cápsulas precubiertas con colágeno: Después de una incubación de 10 min. en etanol absoluto, las cápsulas de vidrio se esterilizaron calentando 2H a 120°C. Las cápsulas de vidrio esterilizadas (diámetro de 10 mm) se colocaron en pocillo de cultivo y se cubrieron con disolución de piel de ternera de colágeno 0,1 mg/ml. Después de 1 h de incubación a 37°C, se eliminó el exceso de disolución y la placa se mantuvo una noche bajo campana de cultivo a fin de dejar secar las placas. Antes del uso, las placas se lavaron dos veces con 200 µl de agua destilada estéril.
- 65



## ES 2 397 300 T3

Tratamiento de células de hipocampo de ratas embrionarias: Después de 5 días de cultivo, las células se cultivaron en medio sin factores de crecimiento (MEM con sales de Earl, B27 y antibióticos) con diferentes condiciones de tratamiento combinando el péptido de TSR (WSGWSSCSRSCG - SEC ID N°8) (375 µg/ml), FasL (20 ng/ml) y TRAIL (80 ng/ml). La composición del medio de cultivo MEM, sales de Earl, B27 y antibióticos es la siguiente:

- 5
- hidrocloreuro de L-arginina: 126 mg/ml
  - L-cistina: 24 mg/l
  - L-glutamina: 292 mg/l
  - hidrocloreuro de L-histidina-H<sub>2</sub>O: 42 mg/l
- 10
- L-isoleucina: 52 mg/l
  - L-leucina: 52 mg/l
  - hidrocloreuro de L-lisina: 73 mg/l
  - L-metionina: 15 mg/l
  - L-fenilalanina: 32 mg/l
- 15
- L-treonina: 48 mg/l
  - L-triptófano: 10 mg/l
  - L-tirosina: 36 mg/l
  - L-valina: 46 mg/l
  - cloruro de colina: 1 mg/l
- 20
- pantotenato de D-calcio: 1 mg/l
  - ácido fólico: 1 mg/l
  - 1-inositol: 2 mg/l
  - Niacinamida: 1 mg/l
  - hidrocloreuro de piridoxal: 1 mg/l
- 25
- Riboflavina: 0,1 mg/l
  - hidrocloreuro de tiamina: 1 mg/l
  - cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O): 264 mg/l
  - sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O): 200 mg/l
  - cloruro de potasio (KCl): 400 mg/l
- 30
- bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>): 2200 mg/l
  - cloruro de sodio (NaCl): 6800 mg/l
  - fosfato de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O): 158 mg/l
  - D-glucosa: 4500 mg/l
  - rojo fenol: 10 mg/l
- 35
- piruvato de sodio: 110,04 mg/l
  - B27 (composición : Invitrogen) 50X: 2% v/v
  - penicilina-estreptomicina: 100 unidades/ml

40

Detección de apoptosis en células de hipocampo tratadas en cultivos: Después de 7 días de tratamiento, se eliminó el medio de cultivo y las células se fijaron en una disolución al 4% de paraformaldehído en PBS (pH 7,6) durante 30 min. a RT, y se lavaron tres veces con PBS. Las células se permeabilizaron con 0,2% de disolución de Triton X100 en PBS a 4°C, durante 5 min., se lavaron tres veces con PBS y se mantuvieron en tampón de equilibrio (10 min., RT).

45

Tampón de equilibrio:

- cacodilato de potasio (pH 6,6 a 25°C): 200 mM
  - Tris-HCl (pH 6,6 a 25°C) : 25 mM
  - Ditiotreitól (DTT): 0,2 mM
- 50
- Seroalbúmina bovina (BSA): 0,25 mg/l
  - cloruro de cobalto: 2,5 mM

Tampón de rTdT:

- 55
- cacodilato de potasio (pH 6,6 a 25°C): 176,47 mM
  - Tris-HCl (pH 6,6 a 25°C) : 22,06 mM
  - Ditiotreitól (DTT): 0,18 mM
  - Seroalbúmina bovina (BSA): 0,22 mg/l
  - cloruro de cobalto: 2,21 mM
- 60
- Fluoresceína-12-dUTP : 4,9 mM
  - dATP : 9,8 mM
  - Tris-HCl (pH 7,6) : 0,98 mM
  - EDTA: 98 µM
  - Desoxinucleotidil terminal transferasa: 0.59 unidades/ml
- 65

Las cápsulas de vidrio que contienen cultivos se incubaron durante 60 min. a 37°C con una gota de 25 µl de tampón de rTdT seguido de la incubación con 200 µl de SSC 2X/pocillo durante 15 min. a RT en la oscuridad y tres lavados durante 5 min. con 200 µl de PBS.

5 Se llevó a cabo una contratinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a fin de determinar al mismo tiempo el número total de células y verificar el número de células apoptóticas (con fragmentación nuclear) como segunda evaluación. Las células se incubaron durante 5 min. con 1 µg/ml de DAPI y se lavaron tres veces durante 5 min. con 200 µl de PBS.

10 Las cápsulas de vidrio se montaron con Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako), y se almacenaron a 4°C en la oscuridad.

Análisis de los resultados: Los resultados se fotografiaron usando un microscopio Leica equipado con una cámara digital acoplada a un ordenador, en una cantidad de 4 fotografías tomadas en cada portaobjetos del microscopio. Cada una de estas fotografías contenía sistemáticamente 1 o varios racimos de células inmaduras, y siempre se llevaron a cabo usando el objetivo X10. El número total de células se evaluó contando manualmente el número de células teñidas con DAPI. Al mismo tiempo, se determinó el número de células apoptóticas contando el número de células positivas para TUNEL, y se correlacionó con el recuento de células teñidas con DAPI que muestran la fragmentación nuclear de células apoptóticas.

20 Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante el software Statview 6 y Systat 10. Los valores de la apoptosis se compararon usando ANOVA de una vía. Los valores correspondieron a la media ± media del error estándar (SEM).

Resultados:

25 A los 3 días, los cultivos consistieron en racimos de células no diferenciadas, consideradas como "neuroesferas", y también células que migran (Figura 1).

30 Después del tratamiento durante 7 días, la apoptosis en células del hipocampo disminuyó mediante el tratamiento con el péptido de TSR inducido por la ruta de receptores de la muerte celular, como se muestra en la Figura 1. El efecto neuroprotector fue dominante cuando la apoptosis se indujo por TRAIL.

35 El péptido de TSR no tuvo ningún efecto sobre la apoptosis basal (Figura 2). El número de células apoptóticas aumentó en presencia de FasL en comparación con los cultivos de control (Figura 2). Comparado con el cultivo con FasL, el número de células apoptóticas disminuyó en presencia del péptido de TSR, demostrando un efecto protector del péptido de TSR frente a la apoptosis inducida por FasL (Figura 2). Además, el número de células apoptóticas es más importante que en presencia de FasL (Figura 2). En comparación con el cultivo con TRAIL, el número de células apoptóticas disminuyó en presencia del péptido de TSR hasta un nivel comparable a las células de control. El péptido de TSR tiene un efecto protector sobre la apoptosis inducida por TRAIL (Figura 2). Finalmente, el péptido de TSR restaura el nivel basal de apoptosis (Figura 2).

Conclusiones:

45 Los resultados muestran que el péptido de TSR inhibe la apoptosis inducida por los receptores de la muerte celular (Fas, TRAIL-R) cuando se añadió en el medio de cultivo de células de hipocampo embrionarias.

REFERENCIAS:

50 Aktas O, Smorodchenko A, Brocke S, Infante-Duarte C, Topphoff US, Vogt J, Prozorovski T, Meier S, Osmanova V, Pohl E, Bechmann I, Nitsch R, Zipp F. Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron*. 5 de mayo de 2005;46(3):421-32.

55 Cantarella G, Uberti D, Carsana T, Lombardo G, Bernardini R, Memo M. Neutralization of TRAIL death pathway protects human neuronal cell line from beta-amyloid toxicity. *Cell Death Differ*. Enero de 2003; 10(1):134-41.

Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM Jr, Snider WD, Korsmeyer SJ. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*. Sep. de 1996;17(3):401-11.

60 Ethell DW, Buhler LA. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J Clin Immunol*. Nov de 2003; 23(6):439-46. Review.

Hartmann A, Mouatt-Prigent A, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC. FADD: A link between TNF family receptors and caspases in Parkinson's disease. *Neurology*. Ene. de 2002; 22;58(2):308-10.

- Honig L.S. y R.N. Rosenberg, Apoptosis and neurologic disease. *Am. J. Med.* 108 (2000), p. 317-330; L.J. Martin, Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). *Int. J. Mol. Med.* 7 (2001), p. 455-478.
- 5 Jung TW, Lee JY, Shim WS, Kang ES, Kim SK, Ahn CW, Lee HC, Cha BS. Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP+ induced cytotoxicity via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production *J. Neurol. Sci.* 2007; 253:53-60.
- 10 Li H. y J. Yuan, Deciphering the pathways of life and death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999), p. 261-266.).
- Lovell MA, Geiger H, Van Zant GE, Lynn BC, Markesbery WR. *Neurobiol Aging.* Julio de 2006; 27(7):909-17. Isolation of neural precursor cells from Alzheimer's disease and aged control postmortem brain.
- 15 M.G. Cifone, P. Roncaioli, R. De Maria, G. Camarda, A. Santoni, G. Ruberti y R. Testi, Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *EMBO J.* 14 (1995), p. 5859-5868
- 20 Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatin KM. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci.* 15 de mayo de 1999; 19(10):3809-17.
- 25 Meinie A, Meinie R, Goncalves-Mendes N, Creveaux I, Didier R, Dastugue B. The thrombospondin type I repeat (TSR) and neuronal differentiation: roles of SCO-spondin oligopeptides on neuronal cell types and cell lines. *Int Rev Cytol.* 2003;230:1-39.
- Monnerie H, Dastugue B, Meinie A. Effect of synthetic peptides derived from SCO-spondin conserved domains on chick cortical and spinal-cord neurons in cell cultures. *Cell Tissue Research* 1998 293, 407-418.
- 30 Murata T, Tsuboi M, Hikita K, Kaneda N. Protective effects of neurotrophic factors on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of murine adrenal chromaffin cell line tsAM5D. *J Biol Chem.* 11 de agosto de 2006; 281(32):22503-16.
- 35 Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 27 de agosto de 1993; 74(4):609-19.
- Putchu GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, Johnson EM. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron.* Marzo de 2001; 29(3):615-28.
- 40 Rosenbaum DM, Gupta G, D'Amore J, Singh M, Weidenheim K, Zhang H, Kessler JA. Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 15 de septiembre de 2000; 61(6):686-92.
- 45 Steindler DA, Pincus DW. Stem cells and neurogenesis in the adult human brain. *Lancet.* 23 de marzo de 2002;359(9311): 1047-54. Review.
- Tseng HC, Ruegg SJ, Maronski M, Messam CA, Grinspan JB, Dichter MA. Injuring neurons induces neuronal differentiation in a population of hippocampal precursor cells in culture. [*Neurobiol Dis.* 2006]
- 50 Uberti D, Cantarella G, Facchetti F, Cafici A, Grasso G, Bernardini R, Memo M. TRAIL is expressed in the brain cells of Alzheimer's disease patients. *Neuroreport.* 22 de marzo de 2004; 15(4):579-81.
- 55 Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, Bordessoule D, Couratier P, Wijdenes J, Preud'homme JL, Jauberteau MO. *In vitro* induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 22 de septiembre de 2000; 109(2):211-20.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM)  
 MEINIEL, Annie  
 JAUBERTEAU, Marie-odile  
 LALLOUE, Fabrice
- 10 <120> Un polipéptido para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por los ligandos de receptores de la muerte celular  
 <130> D25830
- 15 <150> EP07301323.7  
 <151> 24-08-2007  
 <160>8  
 <170> PatentIn version 3.3
- 20 <210> 1  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
 <223> Péptido derivado de TSR (unidades de trombospondina tipo 1) de sco-espondina
- 30 <220>  
 <221 > CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a 5 aminoácidos
- 35 <220>  
 <221 > CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a 5 aminoácidos
- <400> 1  
 Trp Ser Xaa Cys Ser Xaa Cys Gly  
 1 5
- 40 <210>2  
 <211>9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>  
 <223> Péptido derivado de TSR (unidades de trombospondina tipo 1) de SCO-espondina
- <400> 2  
 Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly  
 1 5
- 50 <210>3  
 <211>9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
 <223> Péptido derivado de TSR (unidades de trombospondina tipo 1) de SCO-espondina
- <400> 3  
 Trp Ser Ser Cys Ser Val Thr Cys Gly  
 1 5
- 60

<210>4  
<211>9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> Péptido derivado de TSR (unidades de trombospondina tipo 1) de SCO-espondina  
  
<400> 4  
          **Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Gly**  
          1  5  
10 <210> 5  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> secuencia A1  
<220>  
20 <221 > CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
<222> (1)..(1)  
<223> Aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, S y C  
  
<220>  
25 <221 > CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
<222> (3)..(4)  
<223> Aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, S y C  
  
<400> 5  
          **Xaa Trp Xaa Xaa**  
          1  
30 <210>6  
<211>4  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia A1  
<220>  
40 <221 > CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
<222> (1)..(1)  
<223> aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, S y C  
  
<220>  
45 <221 > CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
<222> (4)..(4)  
<223> aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, S y C  
  
<400> 6  
          **Xaa Trp Ser Xaa**  
          1  
50 <210>7  
<211> 11  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Péptido derivado de TSR (unidades de trombospondina tipo 1) de SCO-espondina  
60 <220>  
<221 > CARACTERÍSTICAS DIVERSAS

ES 2 397 300 T3

<222> (3)..(3)  
<223> aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, S y C

<220>  
5 <221 > CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
<222> (6)..(6)  
<223> aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, S y C

<220>  
10 <221 > CARACTERÍSTICAS DIVERSAS  
<222> (9)..(9)  
<223> Secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a 5 aminoácidos

<400> 7

Trp Ser Xaa Trp Ser Xaa Cys Ser Xaa Cys Gly  
1 5 10

15

<210>8

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de TSR (unidades de trombospondina tipo 1) de sco-espondina

<400> 8

Trp Ser Gly Trp Ser Ser Cys Ser Arg Ser Cys Gly  
1 5 10

25

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido que comprende la secuencia que consiste en

5            -W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G- (SEC ID N°8),

para su utilización en un método para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal mediada por al menos un ligando de receptores de la muerte celular seleccionado de TRAIL y FasL.

10    2. Polipéptido para su utilización según la reivindicación 1, en el que dicha apoptosis neuronal resulta de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

15    3. Polipéptido para su utilización según la reivindicación 2, en el que dichos trastornos neurodegenerativos se seleccionan de entre el grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular espinal (SMA), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, enfermedad priónica, parálisis supranuclear progresiva, atrofia sistémica múltiple, adrenoleucodistrofia, síndrome de down y demencia frontotemporal.

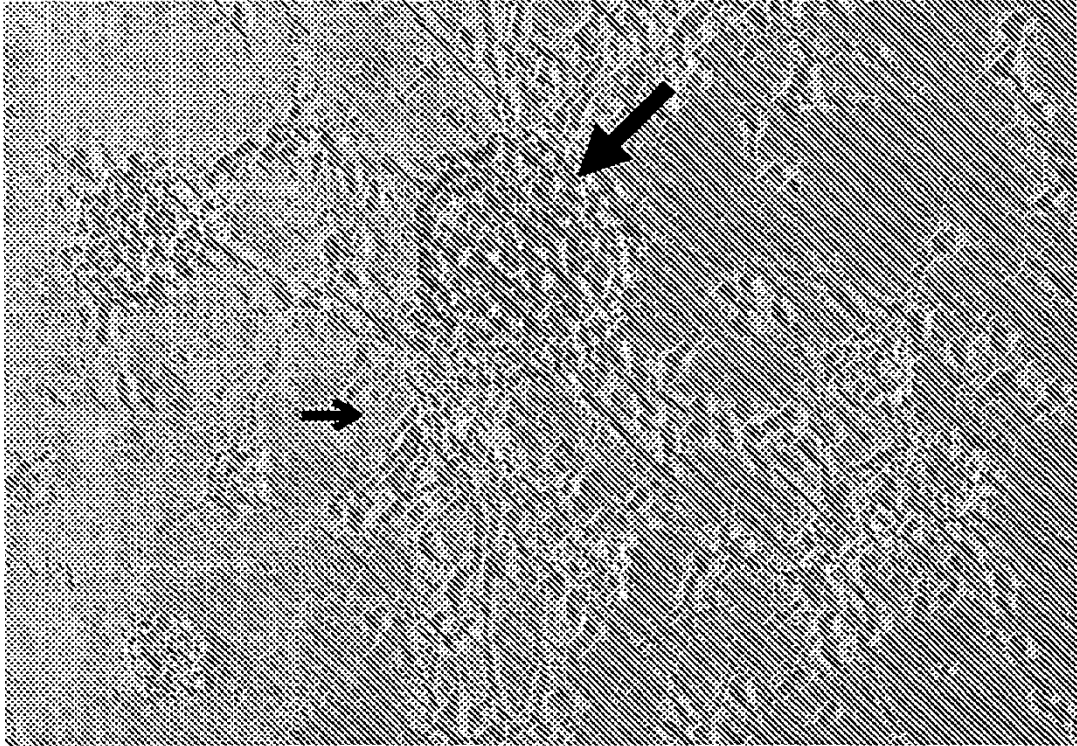
20    4. Constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su utilización en un método para inhibir o prevenir la apoptosis neuronal que resulta de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales, y neurodegeneraciones víricas.

25    5. Polipéptido que comprende la secuencia que consiste en

              -W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G- (SEC ID N°8),

30    para la utilización en un método para prevenir una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, isquemia cerebral, traumatismos neuronales, enfermedades inflamatorias neuronales y neurodegeneraciones víricas.

35    6. Polipéptido para la utilización según la reivindicación 5, en el que dichos trastornos neurodegenerativos se seleccionan de entre el grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular espinal (SMA), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, enfermedad priónica, parálisis supranuclear progresiva, atrofia sistémica múltiple, adrenoleucodistrofia, síndrome de down y demencia frontotemporal.



**FIGURA 1**



Efecto in vitro del péptido TSR sobre la apoptosis de células del hipocampo embrionarias (E18)

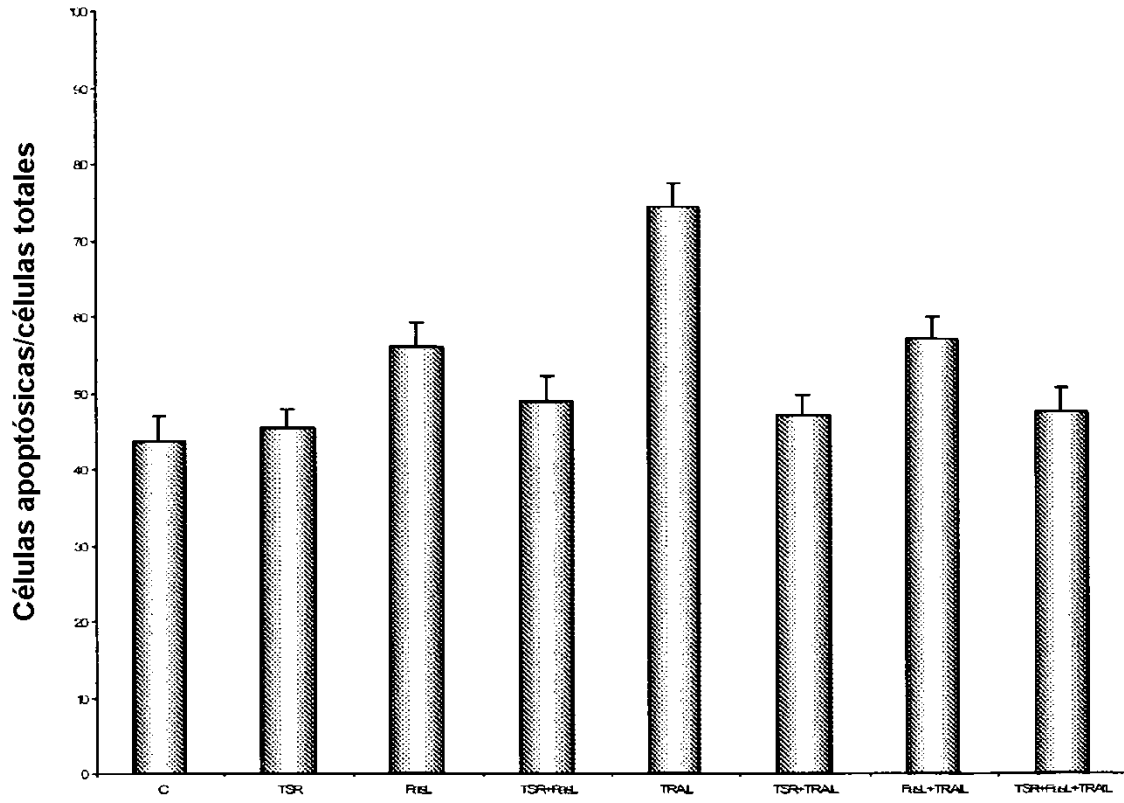


FIGURA 2