

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 815**

21 Número de solicitud: 201232015

51 Int. Cl.:

**C07K 7/06** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**24.12.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.07.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070913**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS (CSIC) (50.0%)**

**Serrano, 117**

**28006 MADRID ES y**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DIAZ-GUERRA GONZALEZ, Margarita;**

**SANCHEZ TEJEDA, Gonzalo y**

**GOMEZ VIDAURRE, Oscar**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **PEPTIDO NEUROPROTECTOR ASI COMO SU USO EN EL TRATAMIENTO DE  
ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES Y OTRAS PATOLOGIAS DEL SNC**

57 Resumen:

La presente invención hace referencia a un péptido neuroprotector, caracterizado por comprender los 11 aminoácidos C-terminales de TrkB-T1 (residuos 466-476) (SEQ ID NO: 1) y ser capaz de interferir y/o inhibir la unión entre TrkB-T1 y sus moléculas interaccionantes en una neurona y/o célula glial. Así mismo, en la presente invención se protege el uso de dicho péptido neuroprotector para prevenir y/o tratar el daño neuronal en mamíferos causado por una enfermedad cerebrovascular o isquemia cerebral y/o por otra patología del SNC asociada a excitotoxicidad, y/o daño traumático cerebral y/o medular. También se protege una composición farmacéutica o medicamento caracterizado por comprender dicho péptido neuroprotector, así como el uso de los mismos en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares y otras patologías del SNC. Finalmente, se protege el método de obtención de dicho péptido neuroprotector.

**ES 2 479 815 A1**

**PÉPTIDO NEUROPROTECTOR ASÍ COMO SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES  
CEREBROVASCULARES Y OTRAS PATOLOGÍAS DEL SNC**

**DESCRIPCIÓN**

5

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

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

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La industria farmacéutica tiene gran interés en las patologías humanas de alta incidencia y de prevalencia creciente debido a los cambios demográficos y las mayores expectativas de vida. Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) representan la segunda causa de muerte mundial, con 6,15 millones de defunciones y un 10,8% del total (según datos recientes de la OMS del año 2011). Así mismo, la isquemia cerebral es la segunda causa de demencia tras la enfermedad de Alzheimer, y el primer motivo de incapacidad en adultos.

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

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

Entre las alternativas terapéuticas que se están tratando de desarrollar está la interferencia de las cascadas de señalización bioquímica inducidas por la ECV que conducen al daño isquémico y la muerte neuronal secundaria de la zona de penumbra. Reducir esta muerte neuronal secundaria sería extremadamente beneficioso porque permitiría atenuar el daño neurológico y el grado de discapacidad de los pacientes. El mecanismo fundamental de la muerte neuronal secundaria es la excitotoxicidad, el cual es un proceso inducido por el aumento de la concentración del neurotransmisor excitatorio glutamato en el espacio extracelular y la sobreactivación de sus receptores específicos, principalmente los de tipo N-metil-D-aspartato (NMDARs) (Olney, J.W. 1986). Por ello, la excitotoxicidad es una diana fundamental en la búsqueda de estrategias de neuroprotección. En el pasado, como primera aproximación, se utilizaron sobre todo fármacos que al unirse directamente a los NMDARs (antagonistas) o de manera indirecta (por ejemplo, inhibidores de la liberación de glutamato, antagonistas de los canales de calcio dependientes de voltaje) disminuían la sobreactivación del NMDAR. Sin embargo, estos fármacos mostraron resultados esperanzadores en modelos experimentales de isquemia pero fueron ineficaces en el tratamiento de la isquemia cerebral en humanos y, por tanto, no superaron los ensayos clínicos (Ikonomidou, C. & L. Turski. 2002). Un defecto común a la mayoría de estos fármacos es su falta de selectividad, motivada fundamentalmente por el desconocimiento de la naturaleza dual de los NMDARs, receptores que son críticos a un tiempo en procesos de supervivencia y de muerte celular (Hardingham, G.E., *et al.* 2002). Además, los NMDARs juegan también un papel preponderante en la transmisión sináptica y la comunicación neuronal del SNC, tanto durante el desarrollo como en su vida adulta, y son críticos en procesos vitales como el aprendizaje, la memoria, la plasticidad sináptica y la sinaptogénesis. Debido a ello, los fármacos desarrollados anteriormente en general bloquean tanto la activación fisiológica del NMDAR como la patológica y, por tanto, tienen efectos secundarios sobre el aprendizaje y producen somnolencia, alucinaciones o incluso coma.

65

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

Las regiones citoplásmicas C-terminales de las subunidades del NMDAR son necesarias para su reclutamiento y agrupamiento correcto en la densidad posináptica (PSD) y su funcionalidad. Son particularmente importantes los 4 aminoácidos C-terminales de las subunidades GluN2A y GluN2B, que constituyen un ligando capaz de interactuar con los dominios PDZ presentes en diversas proteínas de la PSD, como PSD-95. Esta proteína de andamiaje es muy abundante en la PSD y presenta diversos dominios de interacción proteína-proteína incluyendo 3 secuencias PDZ. Mediante la conexión entre receptores de membrana, como el NMDAR, y múltiples proteínas efectoras, como la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), PSD-95 organiza la puesta en marcha de distintas vías de señalización intracelular así como la interacción del NMDAR con el citoesqueleto neuronal. En isquemia cerebral, PSD-95 acopla la sobreactivación del NMDAR con la activación de la nNOS y la formación de NO, molécula crítica para la neurotoxicidad.

Partiendo de la hipótesis de que los NMDARs formados por subunidades GluN2B están implicados mayoritariamente en la señalización hacia la muerte neuronal, mientras que los constituidos por subunidades GluN2A facilitan la supervivencia (Liu *et al.*, 2007), se ha tratado de disociar específicamente los complejos GluN2B-PSD-95-nNOS como una forma de reducir el daño neuronal en modelos de isquemia cerebral. Para ello, se ha generado un péptido de 20 aminoácidos que contiene los últimos 9 aminoácidos del extremo C-terminal de las subunidades GluN2B fusionado al dominio de transducción de la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Aarts, M., *et al.* 2002). Esta pequeña secuencia de la proteína Tat es capaz de conferir la permeabilidad a través de la membrana plasmática y la barrera hematoencefálica (BHE) a aquellos péptidos que la comprenden (Dietz & Bahr. 2004). El péptido neuroprotector generado (Tat-NR2B9c o NA-1), al interactuar con PSD-95, es capaz de disociar el complejo GluN2B-PSD-95-nNOS y reducir el daño isquémico en modelos murinos y de primates (Aarts, M., *et al.* 2002), encontrándose en proceso de validación clínica (US 2010/0137224 A1 y Dolgin, E. 2012). Aunque prometedora, esta aproximación terapéutica no está exenta de posibles complicaciones ya que la asociación entre la sobreactivación de los NMDARs extrasinápticos, formados fundamentalmente por subunidades GluN2B, y la muerte neuronal es un tema controvertido (Papouin *et al.*, 2012) y, además, esta subunidad tiene un papel importante en los potenciales beneficiarios de esta terapia en individuos adultos: la plasticidad sináptica y la formación de la memoria (Brigman *et al.*, 2010).

En neuronas existen otros mecanismos alternativos de control de la supervivencia neuronal relacionados funcionalmente con los mecanismos regulados por el NMDAR, aunque diferentes a ellos, y que también resultan alterados en condiciones patológicas. Así, por ejemplo, las neurotrofinas, como el BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), regulan procesos fundamentales del SNC como la supervivencia neuronal, la liberación de neurotransmisores, la expresión génica o la transmisión sináptica. Mediante la unión a su receptor de alta afinidad TrkB-FL, el BDNF induce la dimerización y transfosforilación del mismo, y la activación de diversas cascadas de señalización intracelular pro-supervivencia.

El ARNm de TrkB codifica para la isoforma TrkB-FL completa, que es el receptor TrkB activo. Pero además, este ARNm codifica para varias isoformas truncadas (TrkB-T1, TrkB-T2 y TrkB-T-Shc) carentes del dominio tirosina-quinasa que participan en la modulación del receptor TrkB-FL. Particularmente, la isoforma truncada TrkB-T1 bloquea la función del receptor activo TrkB-FL mediante la competición por la unión del BDNF o la formación de heterodímeros inactivos TrkB-FL/TrkB-T1. Sin embargo, la isoforma truncada TrkB-T1 parece tener otras funciones independientes del receptor activo TrkB-FL que aún no se han definido completamente, que incluyen: el control de la morfología celular y la activación de vías de señalización intracelular propias (Fenner B.M. 2012). En concreto, la isoforma truncada TrkB-T1 comprende el mismo dominio extracelular, región transmembrana y primeros 12 aminoácidos intracelulares que la isoforma TrkB-FL completa. Sin embargo, los 11 aminoácidos C-terminales de TrkB-T1 constituyen una secuencia específica de esta isoforma truncada, que se encuentra altamente conservada en mamíferos (Shelton *et al.*, 1995) y podría tener una función biológica importante en los mismos. Por ejemplo, en astrocitos, la interacción de la secuencia de 11 aminoácidos C-terminales de la isoforma truncada TrkB-T1 con la proteína RhoGDI1 (*Rho GDP dissociation inhibitor*) media la inhibición de RhoA, una GTPasa que regula de forma  $Ca^{2+}$ -dependiente la activación de la MAPK (*mitogen-activated protein*

*kinase* p38, acoplada a la muerte neuronal en condiciones de excitotoxicidad (Ohira *et al.*, 2006). Sin embargo, la interacción de TrkB-T1 con RhoGDI1 u otras proteínas aún no ha sido investigada en neuronas.

Por otro lado, la reducción del soporte neurotrófico también es un componente importante en la patogénesis de numerosas patologías del SNC. En enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington o esclerosis lateral amiotrófica se han observado niveles alterados de BDNF y TrkB, y una disminución en la señalización (Dawbarn & Allen 2003). También se han observado alteraciones de la vía BDNF/TrkB en esquizofrenia, modelos de síndrome de Down o estados depresivos y de estrés (Dawbarn & Allen 2003). Recientemente, se ha demostrado que la vía BDNF/TrkB está inhibida en situaciones de excitotoxicidad e isquemia cerebral transitoria (Vidaurre O.G. *et al.*, 2012). En concreto, se ha observado la modificación en sentido opuesto de los niveles neuronales de las isoformas TrkB-FL y TrkB-T1 mediante dos mecanismos: la inversión del balance entre los ARNm de las isoformas TrkB-FL y TrkB-T1 da lugar a un aumento en la expresión de TrkB-T1, mientras que la proteólisis por calpaína de TrkB-FL reduce los niveles del receptor activo y produce una proteína truncada de tamaño similar a TrkB-T1 y que, al igual que ella, podría actuar como un dominante negativo (Vidaurre O.G. *et al.*, 2012). Además de en los modelos experimentales, el aumento de TrkB-T1 también ha podido observarse en necropsias de pacientes fallecidos a consecuencia de una ECV. Mediante el uso de vectores lentivirales que revierten el desbalance entre las isoformas de TrkB se ha conseguido prevenir parcialmente la muerte por excitotoxicidad *in vitro*, demostrando que los cambios en la expresión de TrkB son fundamentales en este proceso de muerte neuronal (Vidaurre O.G. *et al.*, 2012). Como mecanismos responsables de la muerte neuronal en excitotoxicidad e isquemia se ha propuesto un efecto dominante negativo de TrkB-T1 sobre la función de TrkB-FL, y quizá también la forma procesada de TrkB-FL, el secuestro de la neurotrofina o mecanismos propios inducidos por TrkB-T1. Estos resultados apuntan a los receptores de neurotrofinas, como el BDNF, como posibles dianas terapéuticas en numerosas patologías del SNC con un componente excitotóxico.

Actualmente sigue existiendo la necesidad de desarrollar productos neuroprotectores, como por ejemplo péptidos, para su uso en métodos de tratamiento y prevención del daño neuronal causado por patologías del SN en las que se encuentra alterada la vía de supervivencia BDNF/TrkB, como pueden ser patologías del SNC asociadas con un proceso de excitotoxicidad, las ECVs, como el ictus o la isquemia cerebral, o bien daño neuronal causado por falta de soporte neurotrófico, hipoxia, desconexión o daño mecánico como consecuencia de traumatismos cerebrales y/o medulares. Dichos métodos de tratamiento y prevención terapéuticos podrían constituir también un complemento y/o alternativa a las actuales terapias trombolíticas, las únicas existentes hoy en día para el ictus o la isquemia cerebral.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención demuestra que cuando se produce un aumento de los niveles de TrkB-T1 inducido por excitotoxicidad, los efectos negativos sobre la viabilidad neuronal están mediados al menos parcialmente por interacciones proteicas específicas establecidas por su secuencia C-terminal única de 11 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Estas interacciones han sido interferidas mediante un péptido neuroprotector permeable a la membrana plasmática que comprende la secuencia C-terminal de TrkB-T1 y previsiblemente compite con la propia TrkB-T1 por la unión a su/s proteína/s interaccionante/s. A pesar de que la excitotoxicidad sigue produciendo un desbalance entre las isoformas TrkB-FL y TrkB-T1, en la presente invención se demuestra que la administración de este péptido neuroprotector a los cultivos de neuronas corticales previene la disminución de la viabilidad neuronal producida por la alteración de la vía de supervivencia BDNF/TrkB, demostrando el efecto neuroprotector de dicho péptido. Estos resultados desvelan una nueva estrategia de neuroprotección para prevenir y/o tratar el daño neuronal causado por patologías del SN en las que se encuentra alterada la vía de supervivencia BDNF/TrkB, como pueden ser ECVs (isquemia cerebral) y otras patologías del SNC agudas (hipoglucemia, epilepsia y daño traumático cerebral y/o medular) o patologías del SNC crónicas asociadas con un proceso de excitotoxicidad (enfermedades neurodegenerativas).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a un péptido neuroprotector, a partir de ahora denominado "péptido neuroprotector objeto de la presente invención" o "péptido neuroprotector de la invención", caracterizado por que comprende los 11 aminoácidos C-terminales de TrkB-T1 (residuos 466-476) (SEQ ID NO: 1). El péptido neuroprotector de la invención ha sido diseñado para interferir y/o inhibir la unión entre TrkB-T1 y sus moléculas interaccionantes en una neurona y/o célula glial, siendo potencialmente capaz de reducir el daño neuronal en mamíferos causado por patologías del SN en las que se encuentra alterada la vía de supervivencia BDNF/TrkB, como pueden ser ECVs (isquemia cerebral) y otras patologías agudas del SNC (hipoglucemia, epilepsia y daño traumático cerebral y/o medular) o patologías crónicas del SNC asociadas con un proceso de excitotoxicidad (enfermedades neurodegenerativas).

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

La presente invención se basa en el descubrimiento del efecto neuroprotector frente al daño neuronal en mamíferos mediado por la interferencia de las interacciones proteicas entre TrkB-T1 y sus moléculas interaccionantes.

5

La expresión: “moléculas interaccionantes con TrkB-T1”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a aquellas moléculas capaces de asociarse de forma transitoria o constitutiva con la isoforma TrkB-T1 del receptor de neurotrofinas TrkB en una neurona y/o célula glial. Dentro del alcance de la presente invención, “las moléculas interaccionantes con TrkB-T1” también podrían establecer interacciones con los péptidos cuya

10

secuencia de aminoácidos sea idéntica u homóloga a las secuencias descritas en la presente invención, siempre y cuando se mantenga la citada capacidad de establecer interacciones con “las moléculas interaccionantes con TrkB-T1”. Preferentemente, el porcentaje de identidad es entre 70-95%, aún más preferentemente el porcentaje de identidad es entre 90-95%.

15

Preferentemente dicho péptido neuroprotector comprende un agente de internalización, como por ejemplo y de forma no limitante, un dominio básico de la proteína transactivadora Tat del HIV que confiere las propiedades de permeabilidad propias de esta proteína (aminoácidos 47-57) (SEQ ID NO: 3).

20

En la presente invención, el término: “agente de internalización” hace referencia a una molécula capaz de facilitar el paso de un péptido determinado a través de la barrera hematoencefálica y la membrana plasmática para permitir su acceso al interior de las neuronas y/o células gliales. Preferentemente, dicho agente de internalización es un dominio básico de la proteína transactivadora Tat del HIV que confiere las propiedades de permeabilidad propias de esta proteína (aminoácidos 47-57) (SEQ ID NO: 3).

25

En una realización particular de la presente invención, el péptido neuroprotector objeto de la presente invención comprende también un *linker* o una molécula de unión. Preferentemente, el *linker* o molécula de unión es una secuencia corta de aminoácidos prolina, treonina, serina o glicina, como por ejemplo y de forma no limitante, dos residuos aminoacídicos de prolina (P). En una realización aún más preferente de la presente invención, la secuencia de dicho péptido neuroprotector es SEQ ID NO: 2.

30

De manera alternativa, el *linker* o molécula de unión facilitará la detección del péptido producido, como por ejemplo y de forma no limitante, un epítipo de hemaglutinina HA del virus de la gripe cuya secuencia es SEQ ID NO: 7. En una realización aún más preferente de la presente invención, la secuencia de dicho péptido neuroprotector es SEQ ID NO: 8.

35

En la presente invención, el término: *linker* o “molécula de unión” hace referencia a una secuencia estructuralmente rígida que une dos elementos de un péptido quimérico, como por ejemplo la secuencia de internalización y dominio C-terminal de TrkB-T1, para concederles la máxima independencia funcional. Preferentemente dicho *linker* se selecciona de entre los siguientes: secuencia corta de aminoácidos prolina, treonina, serina o glicina. Aún más preferentemente, dicho *linker* o molécula de unión son dos residuos aminoacídicos de prolina (P). De manera alternativa, el *linker* o molécula de unión puede facilitar la detección del péptido producido, como por ejemplo y de forma no limitante, un epítipo de hemaglutinina HA del virus de la gripe cuya secuencia es SEQ ID NO: 7.

40

45

En otra realización particular de la presente invención, el péptido neuroprotector objeto de la presente invención, es un péptido quimérico y se caracteriza por comprender:

- i. la secuencia de 11 aminoácidos de un dominio básico de la proteína Tat de HIV (SEQ ID NO: 3), fusionada con
- ii. la secuencia de 11 aminoácidos del dominio C-terminal de TrkB-T1 (SEQ ID NO: 1).

50

Preferentemente, el péptido neuroprotector objeto de la presente se caracteriza por que la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 y la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 se encuentran fusionadas mediante un *linker* o una molécula de unión.

55

Aún más preferente, el péptido neuroprotector objeto de la presente invención, es un péptido quimérico que presenta la secuencia SEQ ID NO: 2 de 24 aminoácidos que consiste en:

- i. la secuencia de 11 aminoácidos de un dominio básico de la proteína Tat de HIV (SEQ ID NO: 3), fusionada con
  - ii. la secuencia de 11 aminoácidos del dominio C-terminal de TrkB-T1 (SEQ ID NO: 1),
- donde dicho *linker* o molécula de unión son dos residuos aminoacídicos de prolina (P).

60

Como “péptido quimérico” o “proteína de fusión” se entiende en la presente invención, un péptido creado a partir de la unión en un gen de fusión de dos o más genes o fragmentos de genes, que originalmente codifican para péptidos separados, pero cuya traducción resulta en un péptido individual con propiedades funcionales derivadas de cada una de los péptidos originales. Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los

65

péptidos o polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica u homologa a las secuencias descritas en la presente invención, siempre y cuando se mantenga la capacidad de establecer interacciones con "las moléculas interaccionantes con TrkB-T1". Preferentemente, el porcentaje de identidad es entre 70-95%, aún más preferentemente el porcentaje de identidad es entre 90-95%.

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

Un péptido de fusión o quimérico, como el de la presente invención, se purifica con facilidad, empleando para ello las características de las proteínas y los péptidos de unirse a una matriz cromatográfica, o de precipitar en ciertas condiciones. La purificación de un péptido de fusión es fácil mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, columnas de sefarsa-glutation las cuales son conocidas por un experto en la materia.

Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada, de ahora en adelante "secuencia nucleotídica de la invención", que codifica para el péptido de la invención, o a la secuencia nucleotídica complementaria a dicha secuencia nucleotídica. Las secuencias SEQ. ID. NO: 5 y SEQ. ID. NO: 6 describen las secuencias nucleotídicas a partir de las cuales derivan las secuencias aminoacídicas SEQ. ID. NO: 1, y SEQ. ID. NO: 3, respectivamente.

Los términos "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra.

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

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

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

Las secuencias nucleotídicas de la invención SEQ. ID. NO: 5 y SEQ.ID. NO: 6 pueden ser insertadas en un vector replicante para su clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. Ejemplos de vectores de expresión son, aunque sin limitarnos, plásmidos, cósmidos, partículas virales, es decir, vectores de ADN o ARN virales, o fagos. Las secuencias nucleotídicas de la invención pueden ser insertadas en estos vectores mediante una serie de procedimientos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, la secuencia polinucleotídica se inserta en sitios adecuados para enzimas endonucleasas de restricción mediante técnicas estándar. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a, una o más secuencia de señales, un origen de replicación, uno o más marcadores genéticos, un elemento "enhancer", un promotor y/o una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores apropiados que contengan uno o más de estos componentes comprende técnicas de ligación estándar, las cuales son conocidas por un experto en la materia.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un vector de expresión o plásmido, de ahora en adelante "vector de expresión o plásmido de la invención", que comprenden las secuencias nucleotídicas de la invención SEQ. ID. NO: 5 y SEQ.ID. NO: 6.

El vector de expresión o plásmido de la invención puede ser introducido, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante transfección o transformación, en células hospedadoras, como son, aunque sin limitarse a ellas, células vegetales, de mamífero, bacterias, levaduras o células de insecto. La introducción del vector de expresión o

plásmido de la invención en la célula hospedadora se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos físicos o biológicos para dar lugar a células transformadas o transfectadas. Dichos métodos biológicos incluyen, pero sin limitarse, el uso de vectores de ADN y ARN virales. La principal ventaja de los métodos físicos reside en que éstos no están asociados con procesos oncogénicos ni patológicos de virus. Sin embargo, los métodos físicos son menos precisos y, a menudo, resultan en inserciones de múltiples copias, integraciones aleatorias, interrupción de secuencias genéticas propias y foráneas, así como expresión impredecible. Entre los vectores virales más usados para la introducción de genes en células de mamífero, se encuentran, vectores de poxvirus, de herpes simplex, adenovirus, vectores asociados a adenovirus, etc.

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

La secuencia nucleotídica de la invención así como el vector de expresión de la invención, pueden introducirse en una célula hospedadora para su amplificación o expresión, a partir de ahora “célula hospedadora de la invención”. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende la secuencia nucleotídica de la invención o el vector de expresión de la invención.

El término “célula hospedadora” o “célula huésped”, tal y como se utilizan en la presente descripción se refiere a cualquier organismo procarionta o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN. Las células hospedadoras pueden ser células procariontas o células hospedadoras bacterianas, como por ejemplo pero sin limitarse a, *E. coli*, o pueden ser células hospedadoras eucarióticas como por ejemplo, aunque sin limitarse a, células vegetales, levaduras, o células de mamífero.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica o medicamento, de ahora en adelante “composición farmacéutica o medicamento de la invención”, que comprende un elemento seleccionado de entre los siguientes:

- a. el péptido neuroprotector de la invención,
- b. la secuencia nucleotídica de la invención,
- c. el vector de expresión o plásmido de la invención, o
- d. la célula hospedadora de la invención.

La presente invención también hace referencia al péptido neuroprotector objeto de la invención, así como a la secuencia nucleotídica, el vector de expresión o plásmido, y la célula hospedadora de la invención, para su uso en medicina. Así mismo, la presente invención también hace referencia al uso del péptido neuroprotector objeto de la invención, así como a la secuencia nucleotídica, el vector de expresión o plásmido, y/o la célula hospedadora de la invención para la preparación o fabricación de una composición farmacéutica o medicamento.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica o medicamento, a partir de ahora “composición farmacéutica o medicamento de la invención”, caracterizado por comprender el péptido de la invención, o la secuencia nucleotídica, el vector de expresión o plásmido, o la célula hospedadora de la invención.

En la presente invención, el término: “medicamento o composición farmacéutica”, tal y como se usa hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y/o los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o un medicamento caracterizado por comprender el péptido neuroprotector, y/o la secuencia nucleotídica, el vector de expresión o plásmido, y la célula hospedadora de la invención.

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

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo, es el caso del fosfato de calcio dibásico, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

- 5 El término “vehículo”, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición farmacéutica o medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la presente invención comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El “vehículo farmacológicamente aceptable” es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.
- 10 En esta memoria, el término “adyuvante” se refiere a un agente que no posea un efecto neuroprotector por sí mismo, pero que pueda interferir la señalización mediada por la isoforma TrkB-T1 del receptor de neurotrofinas incrementando la neuroprotección de la composición farmacéutica objeto de la invención.
- 15 Otro objeto de la presente invención es el uso de la composición farmacéutica para inhibir la unión entre TrkB-T1 y sus moléculas interaccionantes en una neurona y/o célula glial.
- Otro objeto de la presente invención es el uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para la prevención y/o tratamiento del daño neuronal.
- 20 La expresión: “daño neuronal”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a los procesos de degeneración y muerte neuronal producidos por patologías del SN en las que se encuentra alterada la vía de supervivencia BDNF/TrkB, como pueden ser patologías del SNC asociadas con un proceso de excitotoxicidad, las ECVs, como el ictus o la isquemia cerebral, o bien daño neuronal causado por falta de soporte neurotrófico, hipoxia, desconexión o daño mecánico como traumatismos cerebrales y/o medulares.
- 25 Una realización preferente de la presente invención, hace referencia al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para la prevención y/o tratamiento del daño neuronal causado por una patología del SNC asociada a excitotoxicidad en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida.
- 30 En la presente invención, el término: “excitotoxicidad” hace referencia al proceso patológico inducido por la activación excesiva o prolongada de los receptores para el neurotransmisor excitatorio glutamato y que conduce a una forma de muerte neuronal específica. La expresión: “enfermedades del SNC asociadas a excitotoxicidad”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a todas aquellas enfermedades del sistema nervioso en las que el proceso de excitotoxicidad participa en su patogénesis. Preferentemente, las enfermedades del SNC asociadas a excitotoxicidad se seleccionan de entre las siguientes: hipoglucemia, epilepsia, trauma agudo; enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS); trastornos neurológicos caracterizados por hiperexcitabilidad o hipersensibilización neuronal como son algunos tipos de disquinesias o el dolor neuropático, y patologías oculares, como el glaucoma, retinopatía diabética, neuropatía óptica isquémica o traumatismos del nervio óptico.
- 35 40 Otra realización preferente de la presente invención, hace referencia al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para la prevención y/o tratamiento del daño neuronal causado por una ECV en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida.
- 45 La expresión: “enfermedades cerebrovasculares (ECVs)”, tal y como se emplea en la presente invención, hace referencia a un conjunto de trastornos de la vasculatura cerebral que producen una disminución del flujo sanguíneo cerebral, ya sea de forma focal o global, y la consecuente afectación de la función cerebral de manera transitoria o permanente. Preferentemente, las ECVs se seleccionan de entre las siguientes: ictus o infarto cerebral, ataque isquémico transitorio, hemorragias intracerebrales, incluyendo la subaracnoidea y la demencia vascular.
- 50 Otra realización preferente de la presente invención, hace referencia al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para la prevención y/o tratamiento del daño neuronal causado por isquemia cerebral.
- 55 En la presente invención, el término: “isquemia cerebral” hace referencia al daño celular producido por una disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo cerebral y la consecuente disminución del aporte de oxígeno y nutrientes al tejido.
- 60 Otra realización preferente de la presente invención, hace referencia al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención para la prevención y/o tratamiento del daño neuronal causado por ictus o infarto cerebral.
- 65 En la presente invención, el término: “ictus o infarto cerebral” hace referencia a la enfermedad o accidente cerebrovascular en el que la vía de supervivencia BDNF/TrkB puede encontrarse alterada o inhibida.

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

5

En la presente invención, el término: “daño traumático o traumatismo cerebral y/o medular” hace referencia a la lesión cerebral y/o de la médula espinal causada respectivamente por un traumatismo agudo craneoencefálico y/o de columna vertebral, preferentemente la vía de supervivencia BDNF/TrkB puede encontrarse alterada o inhibida.

10

Otra realización preferente de la presente invención, hace referencia al uso de la composición farmacéutica o medicamento de la invención, caracterizado por que se emplea sólo o en combinación con otros medicamentos para terapia trombolítica o para prevenir y/o tratar el daño isquémico, como por ejemplo, y de manera no limitante un medicamento que comprenda al menos otro péptido neuroprotector, preferentemente Tat-NR2B9c o NA-1. En una realización aún más preferente, la terapia trombolítica es para prevenir y/o tratar un ictus o isquemia cerebral.

15

En la presente invención, el término: “otros medicamentos para terapia trombolítica” hace referencia a aquellos medicamentos, fundamentalmente el tPA, utilizados para el tratamiento del infarto cerebral o de corazón que tratan de romper o disolver trombos o coágulos presentes en el interior de los vasos sanguíneos para restablecer el flujo sanguíneo normal.

20

En la presente invención, el término: “otros medicamentos para prevenir y/o tratar el daño isquémico” hace referencia a cualquier sustancia capaz de prevenir, mitigar, retrasar o bloquear los procesos bioquímicos que ocurren en el sistema nervioso y originan neurodegeneración, daño o muerte neuronal como consecuencia de la reducción del flujo sanguíneo cerebral hasta unos niveles insuficientes para mantener el metabolismo y funcionamiento normales de sus células. Como por ejemplo, y de manera no limitante un medicamento que comprenda al menos otro péptido neuroprotector, preferentemente Tat-NR2B9c o NA-1.

25

En una realización preferente, la composición farmacéutica o medicamento de la invención se usa en medicina. Preferentemente, se usa en la prevención y/o tratamiento del daño neuronal. Aún más preferentemente, dicho daño neuronal es causado por una patología del SNC asociada a excitotoxicidad en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida. Alternativamente, dicho daño neuronal es causado por una ECV en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida, o bien dicho daño neuronal es causado por un traumatismo cerebral y/o medular en el que la vía de supervivencia BDNF/TrkB puede encontrarse alterada o inhibida.

30

35

En otra realización preferente, la composición farmacéutica o medicamento de la invención se emplea sólo o en combinación con otros medicamentos para terapia trombolítica o para prevenir y/o tratar el daño isquémico, como por ejemplo, y de manera no limitante un medicamento que comprenda el péptido neuroprotector Tat-NR2B9c o NA-1. Así mismo, en otra realización preferente, el péptido neuroprotector de la invención se usa sólo o en combinación con otros medicamentos como complemento o adyuvante en una terapia trombolítica o para prevenir y/o tratar el daño isquémico, como por ejemplo, y de manera no limitante un medicamento que comprenda el péptido neuroprotector Tat-NR2B9c o NA-1. La presente invención también comprende el uso de la secuencia nucleotídica de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención así como a la composición de la invención, como complemento o adyuvante en una terapia trombolítica o para prevenir y/o tratar el daño isquémico, como por ejemplo, y de manera no limitante un medicamento que comprenda el péptido neuroprotector Tat-NR2B9c o NA-1.. Aún más preferentemente, la terapia trombolítica es para prevenir y/o tratar un ictus o isquemia cerebral.

40

45

50

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un método para inhibir la unión entre TrkB-T1 y sus moléculas interaccionantes en células neuronales y/o gliales, caracterizado por que dicho método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del péptido neuroprotector de la invención, o la secuencia nucleotídica de la invención, o el vector de la invención, o la célula de la invención o la composición farmacéutica o medicamento de la invención.

55

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un método para la prevención y/o el tratamiento del daño neuronal caracterizado por comprender la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención. Aún más preferentemente, dicho daño neuronal es causado por una patología del SNC asociada a excitotoxicidad en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida. Alternativamente, dicho daño neuronal es causado por una ECV en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida, o bien dicho daño neuronal es causado por un traumatismo cerebral y/o medular, en el que la vía de supervivencia BDNF/TrkB puede encontrarse alterada o inhibida.

60

La presente invención también hace referencia a un método para la prevención y/o el tratamiento de ECVs y enfermedades del SNC asociadas a excitotoxicidad, caracterizado por comprender la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente aceptable del péptido neuroprotector de la invención, de la secuencia nucleotídica de la invención, el vector o plásmido de la invención, la célula de la invención o de la composición de la invención.

La presente invención también hace referencia a un método para la prevención y/o el tratamiento de isquemia cerebral y daño traumático cerebral o medular, caracterizado por comprender la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente aceptable del péptido neuroprotector de la invención, de la secuencia nucleotídica de la invención, el vector o plásmido de la invención, la célula de la invención o de la composición de la invención.

El término "prevención", tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar o reducir la aparición de daños neuronales cuya causa es el aumento de los niveles de TrkB-T1 que se produce cuando la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada. El término "tratamiento" supone combatir los daños neuronales causados como consecuencia del aumento de los niveles de TrkB-T1 que se produce cuando la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada, para estabilizar el estado de los individuos o prevenir daños posteriores.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de péptido de la invención, de la secuencia nucleotídica de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención o de la composición de la invención, que produzca el efecto deseado.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un método para el tratamiento trombolítico caracterizado por comprender la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención empleada sola o combinada con otros medicamentos para terapia trombolítica. Aún más preferentemente, la terapia trombolítica es para prevenir y/o tratar un ictus o isquemia cerebral.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a un método para prevenir y/o tratar el daño isquémico caracterizado por comprender la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención empleada sola o combinada con otros medicamentos para prevenir y/o tratar el daño isquémico, como por ejemplo, y de manera no limitante un medicamento que comprenda al menos otro péptido neuroprotector, preferentemente Tat-NR2B9c o NA-1.

La presente invención también hace referencia a un método para la obtención del péptido neuroprotector objeto de la invención.

El péptido neuroprotector objeto de la presente invención puede sintetizarse químicamente mediante métodos ampliamente conocidos por un experto en la materia, las ventajas de esta síntesis es que el producto obtenido presenta mayor pureza. En los métodos químicos convencionales, el péptido crece sobre un polímero insoluble. Una vez sintetizado, el péptido es liberado de la resina sobre la que se ha realizado la síntesis química y se purifica hasta conseguir un elevado grado de pureza mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), antes de proceder al análisis de su pureza mediante espectrometría de masas (MALDI/TOF).

Alternativamente, el péptido de la invención puede producirse a través de su expresión en un organismo biológico, es decir, mediante su expresión en una célula hospedadora, preferentemente a través de un método de expresión en bacterias, y más preferentemente a través de un método de expresión en bacterias con alto rendimiento (Zhou *et al.*, 2012).

Por tanto, la presente invención también hace referencia a un método para la obtención del péptido objeto de la invención mediante su expresión en células hospedadoras bacterianas. Dicho método comprende las siguientes etapas esenciales:

- i) el vector de expresión pGEX-2T (GE Healthcare, Life Sciences), que expresa la glutatión-S-transferasa (GST) se mutageniza *in vitro* para eliminar el enlace peptídico aspártico-prolina (D-P) presente en posición 177-178 de su secuencia, que es lábil en condiciones ácidas.
- ii) el vector producido (pGEX-M) se utiliza como molde para amplificar mediante PCRs sucesivas el gen GST fusionado en fase de lectura abierta con secuencias codificantes que comprenden, en este orden:
  - a. un dipéptido aspártico-prolina (D-P) con un enlace peptídico lábil en condiciones ácidas,
  - b. un aminoácido de glicina (G) utilizado como *linker*,
  - c. al menos una secuencia de transactivación de Tat (SEQ ID NO: 3),
  - d. otro aminoácido de glicina (G) utilizado también como *linker*,

- e. al menos una secuencia del epítipo de hemaglutinina HA del virus de la gripe (aminoácidos 98-106), que facilitará la detección del péptido producido (SEQ ID NO: 7),
- f. otro aminoácido de glicina (G) utilizado como *linker*,
- g. al menos una secuencia correspondiente a los 11 aminoácidos C-terminales de TrkB-T1 (SEQ ID NO: 1), y
- h. un codón para la terminación de la traducción.

iii) el producto de la PCR anterior se digiere con dos enzimas de restricción cuyas secuencias de reconocimiento se han introducido en los dos extremos del DNA amplificado y posteriormente subclonado en el vector pGEX-M sustituyendo al gen GST original.

iv) las células hospedadoras bacterianas se transforman con el vector de expresión anterior para producir la proteína de fusión formada por GST y el péptido neuroprotector de la invención, seguida de su purificación y proteólisis en condiciones ácidas, y

v) la purificación del péptido neuroprotector de la invención, por ejemplo Tat-HA-TrkB-T1 (SEQ ID NO: 8), se realiza por métodos convencionales conocidos por un experto en la materia.

En una realización preferente, dicho método se caracteriza por que comprende las siguientes etapas:

i) amplificación mediante PCR de la secuencia de una proteína GST, previamente mutada para sustituir sus aminoácidos aspártico-prolina en posición 177-178, clonada en un vector de expresión o plásmido bajo el control del promotor para la RNA-polimerasa T7, usando dos oligonucleótidos, uno directo complementario a las secuencias codificantes de su extremo N-terminal comprendiendo un sitio único para una enzima de restricción, y otro reverso que comprende las secuencias codificantes del extremo C-terminal fusionado a secuencias que codifican el dipéptido aspártico-prolina (D-P), enlace peptídico lábil en condiciones ácidas, una glicina y las secuencias codificantes para el dominio de transducción proteica de la proteína Tat de HIV (SEQ ID NO: 3);

ii) el producto purificado de la primera PCR se somete a otra amplificación con el mismo oligonucleótido directo y otro reverso que comprende secuencias codificantes para la misma proteína Tat de HIV (SEQ ID NO: 3), una glicina y un epítipo de hemaglutinina HA (SEQ ID NO: 7) que facilitará la detección del péptido producido;

iii) el producto purificado de la segunda PCR se somete a otra amplificación con los mismos oligonucleótidos directo y otro reverso que comprende parte de las secuencias codificantes para el epítipo HA (SEQ ID NO: 7) fusionadas a secuencias codificantes para una glicina y las secuencias codificantes para los 11 aminoácidos C-terminales de TrkB-T1 (SEQ ID NO: 1) y un sitio único de reconocimiento para una enzima de restricción;

iv) digestión del producto de la tercera PCR con las dos enzimas de restricción introducidas mediante los oligonucleótidos, y subclonaje en el vector de expresión;

v) comprobación del plásmido obtenido mediante secuenciación;

vi) transformación de la cepa BL21 (DE3) pLysS de *E. coli* con el vector obtenido y aislamiento de una colonia;

vii) crecimiento bacteriano e inducción de la expresión de la proteína GST fusionada al péptido neuroprotector objeto de la presente invención;

viii) purificación de la proteína de fusión anterior;

ix) separación mediante proteólisis ácida y purificación del péptido neuroprotector objeto de la presente invención.

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

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIGURA 1. Secuencia de los péptidos Tat-T1 y Tat-Myc.** Las secuencias correspondientes a la proteína Tat de HIV, común a los dos péptidos, se muestra en negrita. La secuencia de TrkB-T1 (caja gris) corresponde a los 11 aminoácidos de su extremo C-terminal, postulados como responsables de la activación de vías de señalización intracelular propias de dicha isoforma. Se muestra también la secuencia de la proteína Myc usada en el diseño

del péptido control.

**FIGURA 2. Inmunofluorescencia mostrando la permeabilidad del péptido Tat-T1 en neuronas.** Cultivos primarios de neuronas corticales embrionarias de rata de 14 DIVs fueron incubados durante 3 h con el péptido Tat-T1 (5  $\mu$ M) marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y comparados con cultivos sin tratar. Las células fijadas y permeabilizadas se analizaron mediante inmunofluorescencia con anticuerpos para la proteína neuronal NeuN y se trataron con el agente intercalante de DNA, DAPI. Las imágenes corresponden a secciones únicas de microscopía confocal. Barra de escala: 10  $\mu$ M.

**FIGURA 3. La regulación de TrkB en excitotoxicidad no se ve modificada por Tat-T1.** Cultivos primarios de neuronas corticales de 14 DIVs fueron tratados con NMDA (100  $\mu$ M) y glicina (10  $\mu$ M) durante 1, 3 o 5 h en presencia de los péptidos Tat-Myc o Tat-T1 (5  $\mu$ M). Los extractos proteicos se analizaron por *immunoblot* con un anticuerpo que reconoce una región extracelular de TrkB presente en todas sus isoformas así como en las formas truncadas de TrkB-FL producidas por acción de la calpaína (TrkB-T).

**FIGURA 4. Efecto neuroprotector de la transducción de los péptidos Tat-T1 sobre la muerte neuronal inducida en condiciones de excitotoxicidad.** Cultivos primarios neuronales de 14 DIVs fueron incubados con Tat-Myc y Tat-T1 (5  $\mu$ M) y tratados durante 4 h con NMDA (100  $\mu$ M) y glicina (10  $\mu$ M). La viabilidad neuronal se midió por el ensayo de MTT y los resultados se presentan como valores relativos respecto a los obtenidos en los cultivos control no tratados con NMDA e incubados con el péptido control, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Se muestran valores de viabilidad media  $\pm$  s.e.m. (n=6). Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada (\* $p$ <0,05).

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

### EJEMPLO 1. Método de obtención del péptido neuroprotector Tat-T1

Para facilitar el paso de los péptidos de TrkB-T1 a través de la BHE y la membrana plasmática, difíciles de atravesar debido a su baja permeabilidad, se ha utilizado la transducción mediada por péptidos permeables a la membrana (Dietz and Bahr. 2004). Esta tecnología permite introducir de forma muy eficiente compuestos bioactivos (péptidos de pequeño tamaño, proteínas o RNAs interferentes) en casi todos los tejidos, incluyendo al cerebro, por lo que está siendo utilizada en distintas áreas de la investigación en neurociencias con fines terapéuticos. Otros métodos alternativos para la administración de moléculas con propiedades terapéuticas, como la microinyección, la electroporación o la terapia génica con vectores virales presentan problemas debido a su baja eficiencia de transferencia, y porque afectan a la integridad de la membrana neuronal y pueden inducir respuestas inmunes no deseadas.

Entre los péptidos con capacidad transductora más utilizados están los derivados del dominio básico de la proteína transactivadora de la transcripción Tat de HIV, los de la proteína homeodominio Antennapedia de *Drosophila melanogaster*, y secuencias relacionadas ricas en arginina. Entre ellos, los péptidos Tat tienen la ventaja de presentar elevada eficiencia de transducción tanto *in vitro* como *in vivo* con una secuencia peptídica corta. Mediante este tipo de aproximación ya se han podido interferir distintas vías de señalización intracelular, algunas interacciones proteína-proteína en complejos intracelulares, la activación de proteínas quinasa o el procesamiento de proteínas. Adicionalmente, los péptidos Tat son capaces de cruzar las membranas celulares incluso cuando están asociados a péptidos grandes (por ejemplo, el factor anti-apoptótico Bcl-xL, el factor neurotrófico GDNF, o la neuroglobina).

El péptido neuroprotector Tat-T1 (Fig. 1) SEQ ID NO: 2, comprende los 11 aminoácidos C-terminales de TrkB-T1 (residuos 466-476) fusionados tras un dominio básico de la proteína transactivadora Tat de HIV, suficiente para conferir sus propiedades de permeabilidad, separados por dos residuos de prolina. Además, se sintetizó un péptido control SEQ ID NO: 4 utilizando la secuencia Tat unida a aminoácidos de la proteína Myc (Tat-Myc). Estos péptidos fueron sintetizados por métodos químicos convencionales y, una vez liberados de la resina sobre la que se realiza la síntesis, fueron purificados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) antes de proceder al análisis de su pureza mediante espectrometría de masas (MALDI/TOF). Todos los péptidos utilizados presentaban un grado de pureza superior al 95%.

### EJEMPLO 2. Comprobación de la permeabilidad del péptido neuroprotector Tat-T1 en neuronas

Los cultivos primarios de neuronas corticales se prepararon a partir de embriones de rata Wistar a día E18 siguiendo protocolos establecidos. Brevemente, tras la retirada de las meninges, las cortezas cerebrales se diseccionaron y disociaron mecánicamente en 4 ml de medio de cultivo MEM [complementado con NaHCO<sub>3</sub> 28.5 mM, glucosa 22.2 mM, glutamax 0.1 mM, suero bovino fetal (FBS) 5% y suero de caballo (HS) 5%] con ayuda de una pipeta. A continuación, la suspensión celular se centrifugó 5 min a 1000 rpm a temperatura ambiente, se resuspendió en medio de cultivo y las células se sembraron a una densidad de 0.22 x 10<sup>6</sup> células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (10 µg/ml) y laminina (4 µg/ml). Estos cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad durante 14 días *in vitro* (DIVs), conservando en todo momento el medio de cultivo original condicionado por las propias células. Con objeto de inhibir el crecimiento de las células gliales, a los 7 DIVs se añadió arabinósido C (AraC, 10 µM), que bloquea el crecimiento de las células proliferativas.

A continuación, para confirmar la permeabilidad a la membrana plasmática neuronal del péptido neuroprotector Tat-T1, éste fue conjugado por métodos convencionales con el compuesto fluorescente FITC (Tat-T1-FITC) y añadido durante 3 h a los cultivos de 14 DIVs (5 µM) (Fig. 2). En paralelo, se procesaron cultivos iguales que no fueron tratados con péptido (control). Terminada la incubación, las células se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS (NaCl 136 mM, KCl 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, pH 7.4) durante 30 min a 37°C. Para conseguir su permeabilización y bloqueo, las células se incubaron seguidamente durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de BSA (albúmina de suero bovino) al 1%, Tritón X-100 0.5% en PBS. La incubación con el anticuerpo monoclonal específico para la proteína neuronal NeuN (US Biologicals) se realizó durante 18 h a 4°C en BSA al 1%, Tritón X-100 0.5% en PBS y la inmunoreactividad fue detectada con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor-546 (Molecular Probes, Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) incubados durante 2 h a temperatura ambiente y diluidos de igual manera. Los núcleos celulares se tiñeron con el agente intercalante de DNA, DAPI. Los cubreobjetos se montaron con medio de montaje *Prolong Gold* (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) sobre los portaobjetos. Las imágenes de microscopía confocal se adquirieron con un microscopio confocal invertido *Leica TCS SP5 Laser Confocal Microscope* (Leica Microsystems HD, Wetzlar, Alemania) con un objetivo plan-apocromático de inmersión de 63 aumentos, utilizando cada uno de los canales de forma separada. Las imágenes que se muestran son secciones individuales de 0.5-1 µm de grosor y fueron procesadas con los programas de adquisición y análisis de imagen (Zen2009), *Adobe Photoshop versión 7.0* (Adobe Systems Inc, CA, EEUU) e *ImageJ* (NIH).

Se observó que, en estas condiciones, Tat-T1-FITC es capaz de introducirse en las neuronas presentes en los cultivos primarios marcadas por el anticuerpo neuroespecífico NeuN (Fig. 2).

### **EJEMPLO 3. Análisis de la alteración del balance TrkB-FL/TrkB-T1 inducida por la sobreactivación del NMDAR en presencia del péptido neuroprotector Tat-T1**

A continuación se analizó si la alteración del balance TrkB-FL/TrkB-T1 inducida por la sobreactivación del NMDAR (Vidaurre O.G. et al, 2012) era modificaba en algún modo por la presencia del péptido Tat-T1 (Fig. 3). Los cultivos primarios preparados como anteriormente y crecidos en placa fueron tratados con los co-agonistas del NMDAR, NMDA (100 µM) y glicina (10µM) para inducir el proceso de excitotoxicidad *in vitro* durante tiempos variables (1-5 h). Los cultivos fueron incubados previamente con los péptidos Tat-Myc o Tat-T1 (5 µM) durante 30 min y permanecieron en el medio de cultivo durante el tratamiento con los agonistas del NMDAR.

La lisis de los cultivos primarios se realizó en tampón RIPA (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM, deoxicolato sódico 1%, NP-40 1%, SDS 0,1%) con inhibidores de proteasas (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, Indianapolis, IN, EEUU) durante 30 min a 4°C. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14000 rpm durante 30 min a 4°C y la concentración proteica se cuantificó mediante el reactivo BCA (Pierce, Rockford, IL, EEUU). Cantidades equivalentes de proteína (40 µg) preparadas en tampón de carga para electroforesis se desnaturalizaron durante 5 min a 99°C. Las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de SDS-PAGE al 10%, según el método de Laemmli, y como marcadores de peso molecular se utilizaron proteínas preteñidas (BlenchMark<sup>TM</sup>). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en forma sumergida a una intensidad de corriente de 400 mA (150 V) durante 1 h y las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau al 1%, preparado en ácido acético al 1%, para verificar la eficiencia de la transferencia.

Una vez eliminada la tinción con rojo Ponceau, las membranas se lavaron con TBS-T (Tris-Cl 20 mM, pH 7.5, NaCl 137 mM, Tween-20 0.05%) y se bloquearon a temperatura ambiente durante 30 min con solución de bloqueo (leche de vaca desnatada en polvo 5% preparada en TBS-T). A continuación, los niveles de las distintas isoformas de TrkB fueron analizados mediante incubación en solución de bloqueo con un anticuerpo policlonal (anti-panTrkB, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) que reconoce una región extracelular común a todas ellas y también presente en el producto resultante del procesamiento de TrkB-FL por calpaína. La inmunodetección se realizó utilizando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y el reactivo de bioluminiscencia de Perkin-Elmer.

Comparados con las células no tratadas con NMDA, la inducción del proceso de excitotoxicidad dio lugar a una reducción en los niveles de TrkB-FL y un aumento de las formas truncadas (TrkB-T, esta banda corresponde a TrkB-T1, más otras formas truncadas de TrkB), de manera muy similar en los cultivos pre-tratados con el péptido

Tat-Myc o Tat-T1. Por tanto, la presencia del péptido neuroprotector Tat-T1 no impide el aumento en los niveles de la isoforma TrkB-T1 inducida por las condiciones de excitotoxicidad y su mecanismo de acción debe afectar a etapas posteriores del proceso neurotóxico.

5 **EJEMPLO 4. Análisis de interferencia de la asociación de TrkB-T1 con la proteína RhoGDI1 mediante el péptido neuroprotector Tat-T1 en neuronas.**

Seguidamente se analizó si la interacción de TrkB-T1 con la proteína RhoGDI1, descrita anteriormente en astrocitos, tiene también lugar en neuronas en condiciones basales y, caso de existir, dicha interacción es bloqueada por el péptido Tat-T1. Para ello, los cultivos primarios de neuronas corticales de 14 DIVs preparados en medio MEM con suero como se indicó anteriormente fueron incubados con los péptidos Tat-Myc o Tat-T1 (5  $\mu$ M) durante 6 h, antes de proceder a la inmunoprecipitación de la proteína Rho-GDI con sus anticuerpos específicos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) y el análisis de las proteínas inmunoprecipitadas mediante *immunoblot*. Lisados proteicos totales (aproximadamente 600  $\mu$ g; LT), preparados como anteriormente, fueron incubados en agitación a 4°C durante 18 h con 2  $\mu$ l del anticuerpo RhoGDI y 20  $\mu$ l de proteína A-Sepharosa al 50% en PBS. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 30 s a 12000 rpm y, tras recoger el sobrenadante (SBTE), se procedió al lavado de los inmunocomplejos seis veces con tampón RIPA. Finalmente, se procedió a la desnaturalización de los complejos inmunoprecipitados (IP) en tampón de carga, su fraccionamiento en geles SDS-PAGE y análisis mediante *immunoblot* como se indicó anteriormente. Los anticuerpos utilizados en el *immunoblot* fueron el mismo anticuerpo RhoGDI utilizado en la inmunoprecipitación, y un anticuerpo policlonal específico para la isoforma TrkB-T1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) que reconoce los 11 aminoácidos C-terminales específicos para esta isoforma.

El mismo experimento se realizó en cultivos primarios crecidos como se indicó anteriormente pero usando el medio Neurobasal (NB; Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) con suplemento B-27 y libre de suero. En estas condiciones se obtienen cultivos neuronales prácticamente puros, siendo el porcentaje de células gliales mucho menor que el obtenido en los cultivos mixtos preparados en medio MEM.

30 **EJEMPLO 5. Análisis del efecto neuroprotector de la transducción de los péptidos Tat-T1 sobre la muerte neuronal inducida en condiciones de excitotoxicidad.**

Investigamos seguidamente si, aún produciéndose el incremento en los niveles de TrkB-T1, la interferencia mediante el péptido Tat-T1 de sus interacciones proteicas específicas era capaz de reducir la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad (Fig. 5). Para ello se realizaron seis experimentos independientes en los que cultivos primarios neuronales preparados como se indicó en medio MEM con suero fueron pre-incubados durante 30 min con los péptidos Tat-Myc y Tat-T1 (5  $\mu$ M), y tratados a continuación con NMDA (100  $\mu$ M) y glicina (10  $\mu$ M) durante 5 h para inducir el proceso de excitotoxicidad.

La viabilidad neuronal se estableció por el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio MTT [D, 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio], añadiendo este compuesto (0.5 mg/ml) al medio de cultivo e incubando las células durante 2 h a 37 °C. El MTT es reducido debido a la actividad mitocondrial de las células con metabolismo activo, formando cristales de formazán que son solubilizados mediante dimetilsulfóxido (DMSO). La cuantificación de las sales de formazán producidas se realiza mediante espectrometría a 570 nm. La contribución a la absorbancia de las células gliales existentes en los cultivos mixtos se estableció por exposición de cultivos paralelos durante 24 h a NMDA 400  $\mu$ M y glicina 10  $\mu$ M. En estas condiciones se induce la muerte neuronal prácticamente por completo, sin afectar a la viabilidad de las células gliales. Posteriormente, para calcular la viabilidad de las neuronas sometidas o no a distintos tratamientos, dicho valor fue sustraído de todas las medidas realizadas. Para cada uno de los seis experimentos independientes, las medidas de viabilidad fueron realizadas en triplicado.

Los resultados se representan como valores relativos respecto a los obtenidos en los cultivos control tratados con Tat-Myc pero no NMDA. Como puede observarse, los datos obtenidos muestran que los cultivos tratados con Tat-T1 presentan a una mayor viabilidad neuronal respecto a los incubados con el péptido control. Así, la viabilidad de los cultivos tratados 4 h con NMDA en presencia de Tat-Myc es del  $23 \pm 7\%$ , mientras que estos valores alcanzaron el  $42 \pm 9\%$  en los cultivos tratados con Tat-T1, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

55 **EJEMPLO 6. Validación *in vivo* de los resultados obtenidos**

Los resultados anteriores obtenidos con el péptido Tat-T1 se han validado *in vivo* utilizando un modelo en ratón de isquemia cerebral inducida por fototrombosis. El método consiste en la inducción fotoquímica de una trombosis intravascular por administración intraperitoneal (10 mg/kg) de un compuesto de contraste fotosensible (Rosa de Bengala) y la irradiación con luz fría (600 lms, 3000 K) de la región cortical, a través de la superficie pial y el cráneo. El Rosa Bengala es un fotosensibilizante muy potente que induce un daño endotelial y la formación de plaquetas, produciendo una trombosis y coagulación microvascular masiva en el tejido expuesto. De esta forma se imita la oclusión vascular y la formación de agregados plaquetarios producida durante la isquemia

cerebral. La isquemia por fototrombosis es un modelo de isquemia permanente que tiene la ventaja de ser menos invasivo y más sencillo de abordar que otras técnicas por oclusión de la arteria cerebral media (ACM). Se utilizaron ratones machos adultos Swiss (Harlan) con un ámbito de peso de 35-40 g, que son anestesiados con isoflurano mediante mascarilla facial. Durante todo el proceso experimental se controla la temperatura corporal. El haz de luz se hace incidir en el hemisferio derecho a 3 mm a la derecha y 2 mm posterior a Bregma por un período de 20 min (hemisferio ipsilateral, I), utilizándose como control las regiones equivalentes del hemisferio contralateral (C). A los 30 min de inducido el daño, los péptidos neuroprotectores y control (10 mg/kg) se inyectan de manera intravenosa y los animales son sacrificados a las 24 h. A continuación, los cerebros se cortan en rodajas coronales de 1 mm de grosor que son teñidas con una solución al 2% de cloruro de trifeníltetrazolio (TTC; Merck Bioscience, Darmstadt, Alemania) que permite comprobar la magnitud del infarto, cuyo volumen se cuantifica a continuación.

En conjunto, los resultados anteriores demuestran un efecto protector del péptido Tat-T1 sobre la excitotoxicidad *in vitro* e *in vivo* mediante la interferencia de la función de la proteína TrkB-T1 y desvelan una nueva estrategia de neuroprotección para el ictus y otras patologías agudas y crónicas del SNC en las que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada.

### LISTA DE SECUENCIAS

**SEQ ID NO: 1:** Identifica la secuencia aminoacídica C-terminal de 11 aminoácidos de la isoforma truncada TrkB-T1 del receptor de neurotrofinas TrkB (aminoácidos 466-476, FVLFHFKIPLDG). El origen de la secuencia puede ser: humano, rata, ratón, caballo, toro, gallo.

**SEQ ID NO: 2:** Identifica una secuencia artificial de 24 aminoácidos correspondiente con el péptido neuroprotector Tat-TrkB-T1 que comprende la secuencia de un dominio básico de la proteína Tat de HIV (SEQ ID NO: 3) de 11 aminoácidos, y los 11 aminoácidos C-terminales de la isoforma TrkB-T1 de TrkB (SEQ ID NO: 1), separadas por un *linker* formado por dos residuos de prolina (YGRKKRRQRRRPPFVLFHFKIPLDG).

**SEQ ID NO: 3:** Identifica 11 aminoácidos de un dominio básico de la proteína transactivadora Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) que confiere las propiedades de permeabilidad propias de esta proteína (aminoácidos 47-57, YGRKKRRQRRR).

**SEQ ID NO: 4:** Identifica una secuencia artificial correspondiente con 25 aminoácidos de un dominio básico de la proteína Tat de HIV (SEQ ID No 3) fusionada con los aminoácidos 408-421 del factor de transcripción c-Myc (YGRKKRRQRRRAEEQKLISEEDLLR).

**SEQ ID NO: 5:** Identifica una secuencia nucleotídica (DNA codificante) de 33 nucleótidos que codifica para los 11 aminoácidos del extremo C-terminal de la isoforma truncada TrkB-T1 del receptor de neurotrofinas TrkB (aminoácidos 466-476, FVLFHFKIPLDG; SEQ ID NO: 1) de humano, rata, ratón, caballo, toro o gallo. Dicha secuencia es la siguiente: (TTYGTNYTNT TYCAYAARAT HCCNYTNGAY GGN), donde y=c/t, n=cualquier base, r=a/g, y h=a/c/t.

**SEQ ID NO: 6:** Identifica una secuencia nucleotídica (DNA codificante) de 33 nucleótidos que codifica para 11 aminoácidos de un dominio básico de la proteína transactivadora Tat de HIV que confiere las propiedades de permeabilidad propias de esta proteína (aminoácidos 47-57, YGRKKRRQRRR; SEQ ID No: 3). Dicha secuencia es la siguiente: (TAYGGNMGNA ARAARMGNMG NCARMGNMGN MGN), donde y=c/t, n=cualquier base, m=a/c, y r=a/g.

**SEQ ID NO: 7:** Identifica la secuencia aminoacídica del epítipo de hemaglutinina HA del virus de la gripe (aminoácidos 98-106, YPYDVPDYA), que facilitará la detección del péptido producido.

**SEQ ID NO: 8:** Identifica una secuencia de 35 aminoácidos del péptido neuroprotector Tat-HA-TrkB-T1 producido en células hospedadoras bacterianas tras la hidrólisis ácida de la proteína de fusión, que comprende la secuencia de un dominio básico de la proteína Tat de HIV (SEQ ID NO: 3) de 11 aminoácidos, y los 11 aminoácidos C-terminales de la isoforma TrkB-T1 de TrkB (SEQ ID NO: 1), separadas por un *linker* formado por el epítipo de hemaglutinina HA del virus de la gripe (PGYGRKKRRQRRRGYPYDVPDYAG FVLFHFKIPLDG).

**BIBLIOGRAFÍA**

- 5 Aarts, M., Y. Liu, L. Liu, S. Besshoh, M. Arundine, J.W. Gurd, Y.T. Wang, M.W. Salter and M. Tymianski. 2002. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298: 846-50.
- Brigman J.L., T. Wright, G. Talani, S. Prasad-Mulcare, S. Jinde, G.K. Seabold, P. Mathur, M.I. Davis, R. Bock, R.M. Gustin, R.J. Colbran, V.A. Alvarez, K. Nakazawa, E. Delpire, D.M. Lovinger, and A. Holmes. 2010. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J Neurosci.* 30:4590-600.
- 10 Chen, H.S. & S.A. Lipton. 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97: 1611-1626.
- Choi, D.W., J.Y. Koh and S. Peters. 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8: 185-196.
- Dawbarn, D., & S. J. Allen. 2003. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29:211-30.
- 15 Dietz, G.P. & M. Bahr. 2004. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci* 27: 85-131.
- Dolgin, E. 2012. To serve and neuroprotect. *Nat Med* 13: 1003-1006 Fenner B.M. 2012. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 23:15-24.
- 20 Hardingham, G.E., Y. Fukunaga and H. Bading, H. 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5: 405-414.
- Ikonomidou, C. & L. Turski. 2002. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1: 383-6.
- Liu Y., T.P. Wong, M. Aarts, A. Rooyackers, L. Liu, T.W. Lai, D.C. Wu, J. Lu, M. Tymianski, A.M. Craig, and Y.T. Wang. 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27:2846–2857.
- 25 Ohira, K., K.J. Homma, H. Hirai, S. Nakamura, and M. Hayashi. 2006. TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342:867-74.
- Olney, J.W. 1986. Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv Exp Med Biol* 203: 631-45.
- Papouin, T., L. Ladepeche, et al. 2012. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell* 150: 633-46.
- 30 Shelton, D.L., J. Sutherland, J. Gripp, T. Camerato, M.P. Armanini, H.S. Phillips, K. Carroll, S.D. Spencer and A.D. Levinson. 1995. Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* 15: 477-491.
- Vidaurre O.G., S. Gascón, R. Deogracias, M. Sobrado, E. Cuadrado, J. Montaner, A. Rodríguez-Peña and M. Díaz-Guerra. 2012. Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell Death Dis* 3:e256.
- 35 Zhou, H., A. Zhang, Y. Zhang & D. Zhu. 2012. Cloning, expression, and purification of a recombinant Tat-HA-NR2B9c peptide. *Protein Expr Purif* 85: 239-245.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido neuroprotector caracterizado por comprender la secuencia SEQ ID NO: 1, capaz de impedir la unión entre TrkB-T1 y sus moléculas interaccionantes en células neuronales y/o gliales.
2. El péptido neuroprotector según la reivindicación 1, caracterizado por comprender un agente de internalización.
- 10 3. El péptido neuroprotector según la reivindicación 2, caracterizado por que el agente de internalización es la secuencia SEQ ID NO: 3.
4. El péptido neuroprotector según las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que comprende un *linker* o una molécula de unión.
- 15 5. El péptido neuroprotector según la reivindicación 4, caracterizado por que la secuencia de dicho péptido es SEQ ID NO: 2.
- 20 6. El péptido neuroprotector según la reivindicación 4, caracterizado por que la secuencia de dicho péptido es SEQ ID NO: 9.
7. Una secuencia nucleotídica que codifica para el péptido neuroprotector descrito en las reivindicaciones 1-6.
- 25 8. Un vector de expresión o plásmido caracterizado por comprender al menos una secuencia nucleotídica descrita en la reivindicación 7.
9. Una célula hospedadora caracterizada por expresar el vector de expresión descrito en la reivindicación 8.
- 30 10. Una composición farmacéutica o medicamento caracterizado por comprender el péptido neuroprotector descrito en las reivindicaciones 1-6, o la secuencia nucleotídica descrita en la reivindicación 7, o el vector de expresión o plásmido descrito en la reivindicación 8, o la célula hospedadora descrita en la reivindicación 9.
- 35 11. Uso del péptido neuroprotector descrito en las reivindicaciones 1-6 en la fabricación de una composición farmacéutica o medicamento.
- 40 12. Uso según la reivindicación 11, caracterizado por que la composición farmacéutica o medicamento es para la prevención y/o tratamiento del daño neuronal.
13. Uso según la reivindicación 12, caracterizado por que el daño neuronal es causado por una patología del SNC asociada a excitotoxicidad en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida.
- 45 14. Uso según la reivindicación 12, caracterizado por que el daño neuronal es causado por una enfermedad cerebrovascular en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida.
- 50 15. Uso según la reivindicación 12, caracterizado por que el daño neuronal es causado por un traumatismo cerebral y/o medular en el que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida.
16. Uso según la reivindicación 11, caracterizado por que la composición farmacéutica o medicamento se emplea sólo o en combinación con otros medicamentos para terapia trombolítica o para prevenir y/o tratar el daño isquémico.
- 55 17. La composición farmacéutica descrita en la reivindicación 10, para su uso en medicina.
18. La composición farmacéutica según la reivindicación 17, caracterizado para su uso en la prevención y/o tratamiento del daño neuronal.
- 60 19. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, caracterizado por que el daño neuronal es causado por una patología del SNC asociada a excitotoxicidad en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida.

- 5 20. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, caracterizado por que el daño neuronal es causado por una enfermedad cerebrovascular en la que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida.
21. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, caracterizado por que el daño neuronal es causado por un traumatismo cerebral y/o medular en el que la vía de supervivencia BDNF/TrkB se encuentra alterada o inhibida.
- 10 22. La composición farmacéutica según la reivindicación 17, caracterizado por que la composición farmacéutica o medicamento se emplea sólo o en combinación con otros medicamentos para terapia trombolítica o para prevenir y/o tratar el daño isquémico.

YGRKKRRQRRRPP<sup>466</sup>FVLFH<sup>476</sup>KIPLDG **Tat-T1**  
YGRKKRRQRRRAEEQKLISEED **Tat-Myc**

FIGURA 1

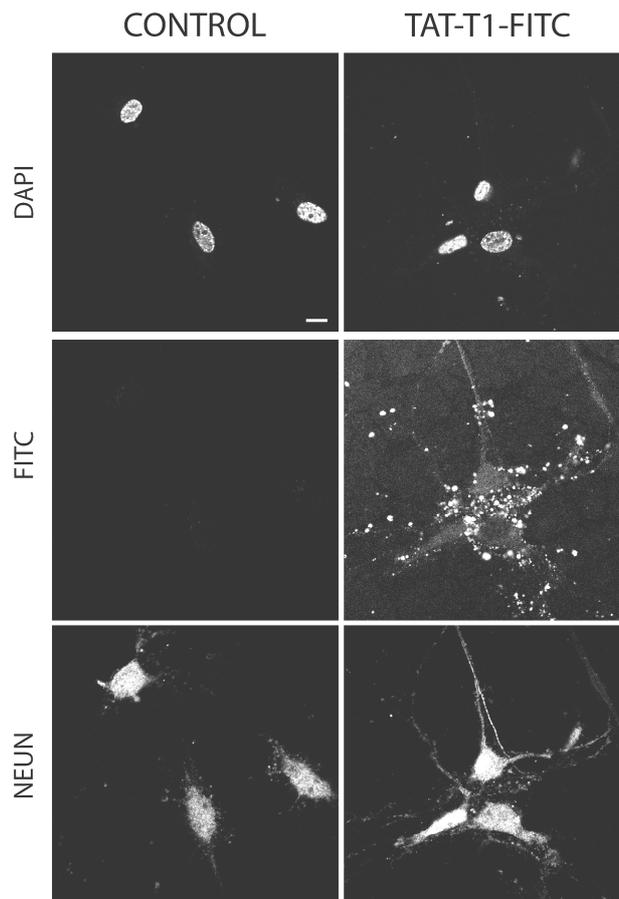


FIGURA 2

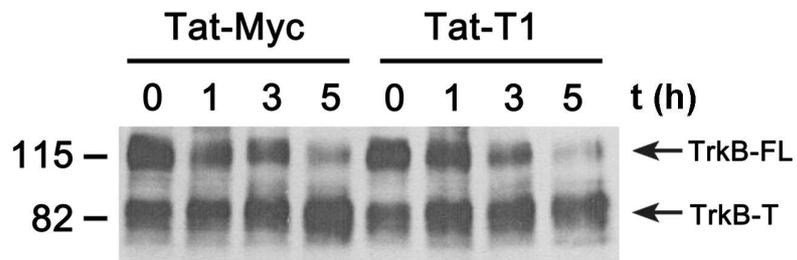


FIGURA 3

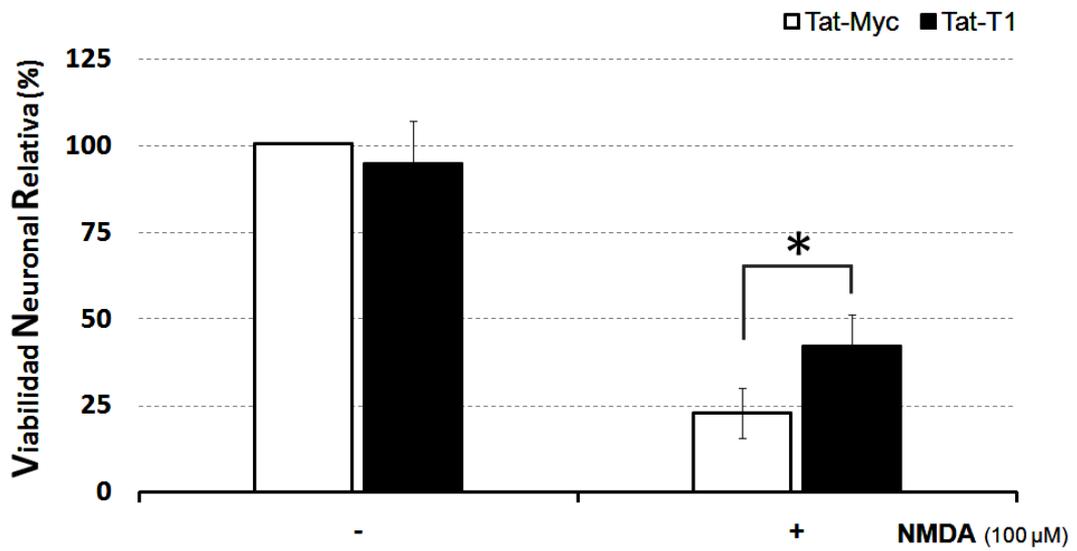


FIGURA 4

# ES 2 479 815 A1

## Listado de Secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> PEPTIDO NEUROPROTECTOR ASI COMO SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES Y OTRAS PATOLOGIAS DEL SNC

<130> 5120182 MARGARITA DIAZ GUERRA

<160> 8

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..11

<223> /mol\_type="protein"

/note="Aminoacidos en posicion 466-476 del extremo C-terminal de la isoforma truncada TrkB-T1 del receptor de neurotrofinas TrkB humano"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 1

Phe Val Leu Phe His Lys Ile Pro Leu Asp Gly  
1 5 10

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..24

<223> /mol\_type="protein"

/note="Peptido neuroprotector Tat-TrkB-T1"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Phe Val Leu  
1 5 10 15

Phe His Lys Ile Pro Leu Asp Gly  
20

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..11

<223> /mol\_type="protein"

/note="Aminoacidos 47-57 del dominio basico de la proteina transactivadora Tat del virus de la inmunodeficiencia humana"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 3

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

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

ES 2 479 815 A1

<220>  
 <221> SOURCE  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="protein"  
 /note="SEQ ID NO 3 fusionada con los aminoacidos 408-421 del factor de transcripcion c-Myc"  
 /organism="Artificial sequence"

<400> 4  
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Glu Glu Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Arg  
 20 25

<210> 5  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..33  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia nucleotidica que codifica para SEQ ID No 1 "  
 /organism="Artificial sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..33  
 <223> /note="donde y es c o t ; n es a , c , t , o g ; r es a o g ; h es a , c , o t"

<400> 5  
 ttygtnytnt tycayaarat hccnytn gay ggn 33

<210> 6  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..33  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia nucleotidica que codifica para SEQ ID NO 3 "  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..33  
 <223> /note="donde y es c o t ; n es a , c , t , o g ; r es a o g ; h es a , c , o t"

<400> 6  
 tayggnm gna araarmgnmg ncar mgnmgn mgn 33

<210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <221> SOURCE  
 <222> 1..9  
 <223> /mol\_type="protein"  
 /note="Aminoacidos 98-106 del epitopo de hemaglutinina HA del virus de la gripe "  
 /organism="Artificial sequence"

ES 2 479 815 A1

<400> 7  
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
1 5

<210> 8  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> SOURCE  
<222> 1..35  
<223> /mol\_type="protein"  
/note="Peptido neuroprotector Tat-HA-TrkB-T1 "  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 8  
Pro Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Tyr Pro  
1 5 10 15  
Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Phe Val Leu Phe His Lys Ile Pro  
20 25 30  
Leu Asp Gly  
35