

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 015**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2004 PCT/CA2004/001813**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2005 WO05033311**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2004 E 04789721 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 1687427**

54 Título: **Métodos para modular respuestas neuronales**

30 Prioridad:

08.10.2003 US 509249 P

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

10.03.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
(100.0%)
NO. 103-6190 AGRONOMY ROAD VANCOUVER
BRITISH COLUMBIA, V, CA**

72 Inventor/es:

**WANG, YU, TIAN;
WANG, YUSHAN;
PHILLIPS, ANTHONY;
LIU, LIDONG y
LIU, YITAO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 605 015 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

Métodos para modular respuestas neuronales

Campo de la invención

5 La invención, en general, está en el campo de la neurología, más específicamente, la invención provee en parte, métodos y reactivos para modular apoptosis o plasticidad sináptica mediadas por NMDA.

Antecedentes de la invención

10 La transmisión sináptica es el proceso mediante el cual las neuronas se comunican por mecanismo de excitación (generación de una acción potencial) o de inhibición (inhibición de una acción potencial después de la excitación). La transmisión sináptica de excitación ocurre a menudo por medio del neurotransmisor L-glutamato y sus receptores de glutamato cognados, los cuales incluyen los receptores del subtipo glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) ácido y α -amino-3-hidroxi-5-metiliisoxazol-4-propiónico (AMPA). La plasticidad sináptica se refiere a la capacidad dependiente del uso de neuronas postsinápticas para modular su respuesta a la liberación de neurotransmisores durante la transmisión sináptica, y se considera importante en los procesos de aprendizaje y memoria.

15 La estimulación excesiva de las neuronas postsinápticas (un fenómeno conocido como "excitotoxicidad"), que puede llevar a la muerte o a apoptosis neuronal, ha sido implicada en una variedad de desordenes del sistema nervioso central (SNC). La activación del receptor de NMDA puede inducir la muerte celular programada (apoptosis) en neuronas cultivadas de hipocampo, y puede ser subyacente a la pérdida de neuronas y función neuronal en trastornos del sistema nervioso central variando desde trauma cerebral agudo y apoplejía a enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedades de Huntington, de Alzheimer y de Parkinson¹⁻⁵.

20 La activación del receptor de NMDA también puede llevar a la facilitación de la endocitosis mediada por clatrina de los receptores de AMPA, los cuales median en la transmisión sináptica rápida en sinapsis de excitación en el sistema nervioso central de mamíferos^{6,7}. La función del receptor de AMPA puede ser modificada al nivel de la probabilidad de canal abierto³⁴, conductancia de canales^{27,33}, y cinética de desensibilización⁵². La redistribución rápida de los receptores de AMPA hacia y desde el dominio postsináptico también se considera como un medio para regular la fuerza de la transmisión sináptica mediada por el receptor de AMPA^{43,45,6}. Los receptores de AMPA experimentan un ciclo constitutivo funcionalmente distinto y regulado dependiente de la clatrina entre los compartimientos intracelulares y la membrana plasmática a través de la inserción (exocitosis) e internalización (endocitosis) en la membrana de plasma mediadas por las vesículas^{22,30,20;24,41,14}. La regulación de estos procesos puede llevar a cambios rápidos en el número de receptores de AMPA expresados en la membrana postsináptica, contribuyendo con ello a la expresión de ciertas formas de plasticidad sináptica, incluyendo la potenciación del hipocampo a largo plazo (LTP)^{35,42,50} y la depresión a largo plazo (LTD) en el cerebelo y el hipocampo^{14,24,25,44}. Los receptores de AMPA pueden ser sometidos a endocitosis estimulada por diversos estímulos incluyendo factores de crecimiento, tales como el enlazamiento al agonista de insulina/IGF-1^{14,25}, enlazamiento de agonistas^{22,21,20} y protocolos de producción de LTD^{24,14,25}.

35 Resumen de la invención

La invención provee, en parte, métodos y reactivos para modular la apoptosis neuronal. La invención también provee, en parte, métodos y reactivos para modular la plasticidad sináptica.

40 En algunos aspectos, la invención provee un método para modular la apoptosis neuronal mediada por NMDA *in vitro* poniendo en contacto una célula neuronal con un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5. En aspectos alternativos, la invención se relaciona con un método para modular la apoptosis neuronal mediada por NMDA poniendo en contacto una célula neuronal con un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina. En aspectos alternativos, la invención se relaciona con un método para tratar o prevenir el daño o disfunción neurológica en un sujeto administrando una cantidad efectiva de un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA al sujeto.

45 En realizaciones alternativas, el daño neurológico puede incluir apoptosis neuronal inducida por NMDA, o puede ocurrir como resultado de la activación excesiva de los receptores de NMDA o debido a cambios en la endocitosis del receptor de AMPA, o puede ocurrir como resultado de al menos uno de un desorden seleccionado del grupo consistente de estrés, ansiedad, depresión, hipoglicemia, paro cardíaco, epilepsia, isquemia cerebral, trauma cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington; dolor neuropático; esclerosis lateral amiotrófica (ALS); síndrome de Hutchinson Gilford; diabetes; ataxia; retardo mental; demencias; trastornos asociados con el tabaco o la obesidad, presión sanguínea elevada, trastornos asociados con defectos o disfunción en el aprendizaje o memoria, trastornos psiquiátricos, autismo, esquizofrenia, síndrome X frágil o trastornos asociados con el abuso de sustancias o adicción a un fármaco (por ejemplo, nicotina, alcohol, opiáceos,

heroína, codeína, morfina, petidina, petadona, marihuana, feniclideno, psicoestimulantes, anfetaminas, cocaína, barbituratos, pentobarbitona, quinalbarbitona, benzodiazepinas, temazepan, diazepam o flunitrazepan).

- 5 En aspectos alternativos, la invención se relaciona con un método para modular la plasticidad sináptica en un sujeto administrando una cantidad efectiva de un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA a un sujeto (por ejemplo, un sujeto normal, esto es, uno que no tiene o no ha sido diagnosticado con daño o disfunción neurológica). En realizaciones alternativas, el método puede incluir adicionalmente la mejora de la plasticidad sináptica. En aspectos alternativos, la invención se relaciona con un método para tratar o prevenir el abuso de sustancias en un sujeto administrando una cantidad efectiva de un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA al sujeto.
- 10 En algunos aspectos, la invención provee un método para modular la endocitosis del receptor de AMPA *in vitro* poniendo en contacto una célula que expresa un receptor de AMPA con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de YKEGYNVYGIE, YREGYNVYG, o YKEGYNVYG, o con un anticuerpo que enlaza específicamente una secuencia de aminoácido YKEGYNVYGIE.
- 15 En algunos aspectos, la invención se relaciona con un método para modular la endocitosis del receptor de AMPA, poniendo en contacto una célula que expresa un receptor de AMPA con un compuesto modulador que comprende la secuencia de aminoácidos definida en la Tabla I o sustituciones conservadoras de la misma, fórmula I, o fórmula A, o secuencias homólogas de las mismas encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3 o GluR4 del receptor de AMPA o un fragmento o variante de los mismos, o que comprende un anticuerpo que enlaza específicamente la secuencia de aminoácidos definida en la Tabla I o sustituciones conservadoras de la misma, fórmula I o fórmula A, o secuencias homólogas de las mismas encontradas en el terminal C de las subunidades
- 20 GluR2, GluR3 o GluR4 del receptor de AMPA.
- 25 En aspectos alternativos, la invención provee un método para cribar un modulador de la endocitosis del receptor de AMPA, proveyendo un sistema que incluye un polipéptido receptor de AMPA o un fragmento biológicamente activo del mismo; un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5; proveyendo un compuesto de prueba; poniendo en contacto el sistema con el compuesto de prueba; y determinando si el compuesto de prueba modula la endocitosis del receptor de AMPA.
- 30 En aspectos alternativos, la invención provee un método para cribar un modulador de la endocitosis del receptor de AMPA, incluyendo el método proveer un polipéptido receptor de AMPA o un fragmento biológicamente activo del mismo; proveer un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5; proveer un compuesto de prueba; poner en contacto el polipéptido receptor de AMPA o un fragmento biológicamente activo del mismo con el compuesto de prueba o el inhibidor; y determinar si el compuesto de prueba modula la endocitosis del receptor de AMPA.
- 35 En aspectos alternativos, la invención se relaciona con un método para cribar un modulador de la endocitosis del receptor de AMPA, proveyendo un polipéptido receptor de AMPA o un fragmento biológicamente activo del mismo; proveyendo un compuesto de prueba; poniendo en contacto el polipéptido receptor de AMPA o un fragmento biológicamente activo del mismo con el compuesto de prueba; y determinando si el compuesto de prueba modula la endocitosis del receptor de AMPA. En realizaciones alternativas, el método puede incluir adicionalmente proveer un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA, poner en contacto el polipéptido receptor de AMPA o un fragmento biológicamente activo del mismo con el inhibidor, y determinar si el compuesto de prueba modula la endocitosis del receptor de AMPA cuando se compara con el inhibidor.
- 40 En aspectos alternativos, la invención provee un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de YKEGYNVYGIE, YREGYNVYG, o YKEGYNVYG, o una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de estas secuencias de aminoácidos, o un anticuerpo que enlaza específicamente un polipéptido consistente de la secuencia de aminoácidos YKEGYNVYGIE.
- 45 En aspectos alternativos, la invención provee un compuesto sustancialmente puro consistente de la fórmula I: $Z_1-X_1-X_2-E-G-X_3-N-V-X_4-G-Z_2$, en donde X_1 puede ser Y, S, o T; X_2 puede ser K o R; X_3 es Y, S, o T; X_4 puede ser Y, S, o T; Z_1 es H_2N ; Z_2 es $-C(O)OH$, en donde "-" es un enlace covalente, y en donde el compuesto es un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA y en donde uno cualquiera o más de X_1 , X_3 , o X_4 es un Y.
- 50 En aspectos alternativos, se describe un compuesto sustancialmente puro que incluye la fórmula A: $Z_1-X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-Z_2$, donde X_1 puede ser un aminoácido que tiene un índice hidropático de -0.3 a -4.3 o de -1.3 a -3.3 o puede ser un aminoácido neutro o ácido, o puede ser Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr, Asp, Glu; X_2 puede ser un aminoácido que tiene un índice hidropático de +1.0 a +5.0 o de +2.0 a +4.0 o puede ser un aminoácido básico o puede ser Lys, Arg, His; X_3 puede ser un aminoácido que tiene un índice hidropático de +1.0 a +5.0 o de +2.0 a +4.0 o puede ser un aminoácido ácido o puede ser Asp, Glu; X_4 puede ser un aminoácido que tiene un índice hidropático de -2.0 a +2.0 o de -1.0 a +1.0 o puede ser un aminoácido neutro o puede ser Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr; X_5
- 55 puede ser un aminoácido que tiene un índice hidropático de -0.3 a -4.3 o de -1.3 to -3.3 o puede ser o puede ser aun

aminoácido neutro o ácido o puede ser Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr, Asp, Glu; X_6 puede ser un aminoácido que tiene un índice idiopático de -1.8 a +2.2 o de -0.8 a +1.2 o puede ser un aminoácido neutro o puede ser Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr; X_7 puede ser un aminoácido que tiene un índice idiopático de -3.5 a 0.5 o de -2.5 a -0.5 o puede ser un aminoácido no polar o puede ser Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Met; X_8 puede ser un aminoácido que tiene un índice idiopático de -0.3 a -4.3 o de -1.3 a -3.3 o puede ser o puede ser aun aminoácido neutro o ácido o puede ser Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr, Asp, Glu; X_9 puede ser un aminoácido que tiene un índice idiopático de -2.0 a +2.0 o de -1.0 a +1.0 o puede ser un aminoácido neutro o puede ser Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr; Z_1 es H_2N^- , RHN^- o, RRN^- ; Z_2 puede ser $-C(O)OH$, $-C(O)R$, $-C(O)OR$, $-C(O)NHR$, $-C(O)NRR$; R en cada aparición puede ser seleccionado independientemente de (C_1-C_6) alquilo, (C_1-C_6) alquenilo, (C_1-C_6) alquinilo, alquilo (C_1-C_6) sustituido, alquenilo (C_1-C_6) sustituido, o alquinilo (C_1-C_6) sustituido; en donde "-" es un enlace covalente, y en donde el compuesto puede ser un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA. En realizaciones alternativas, uno o más de X_1 , X_5 , o X_8 puede ser un Y.

En realizaciones alternativas, el compuesto de la fórmula I puede inhibir la endocitosis del receptor de AMPA con una afinidad que es al menos tan grande como la afinidad cuando el compuesto es un polipéptido que incluye una secuencia de YREGYNVYGIE, YKEGYNVYGIE, YREGYNVYG, o YKEGYNVYG. En realizaciones alternativas, el compuesto de la fórmula I puede incluir una calificación de similitud por encima de cero con base en las matrices de similitud PAM o Blosum. En realizaciones alternativas, el compuesto de la fórmula I puede incluir adicionalmente la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR.

En realizaciones alternativas, la invención provee el uso de cualquiera de los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico, anticuerpos o compuestos de acuerdo con la invención para tratar o prevenir el daño neurológico o abuso de sustancias en un sujeto, o para modular la apoptosis neuronal mediada por NMDA, o para modular la endocitosis del receptor de AMPA, o para modular la plasticidad sináptica en un sujeto.

En diversos aspectos descritos, el inhibidor puede incluir un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA regulada. En diversos aspectos descritos el inhibidor puede incluir un polipéptido GluR2, GluR3, o GluR4. En diversos aspectos descritos, el inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA puede incluir un péptido que incluya cualquiera de las secuencias de aminoácidos de YREGYNVYGIE, YKEGYNVYGIE, YREGYNVYG, o YKEGYNVYG o un fragmento o una variante de los mismos, o puede ser un polipéptido GluR2, GluR3, o GluR4, o puede incluir un anticuerpo que enlaza específicamente cualquiera de las secuencias de aminoácidos de YREGYNVYGIE, YKEGYNVYGIE, YREGYNVYG, y YKEGYNVYG. En diversos aspectos descritos, el inhibidor puede incluir la secuencia de aminoácidos definida en la Tabla I o sustituciones conservadora de la misma, fórmula I, fórmula A, o secuencias homólogas de las mismas encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3, o GluR4 del receptor de AMPA o un fragmento o variante del mismo, o incluir un anticuerpo que enlaza específicamente la secuencia de aminoácidos definida en la Tabla I o sustituciones conservadoras de la misma, fórmula I, o fórmula A, o secuencias homólogas de las mismas encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3, o GluR4 del receptor de AMPA. En diversos aspectos descritos, puede incluir adicionalmente la secuencia de aminoácido YGRKKRRQRRR.

El ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico o receptores de "AMPA" son receptores del canal de iones regulados por glutamato que están involucrados en la transducción de la señal postsináptica. Los receptores de AMPA naturales pueden ser heteroméricos, por ejemplo heteropentaméricos, complejos proteínicos ensamblados a partir de combinaciones de subunidades GluR 1-4. Cuando se expresan de manera transiente en células de mamíferos no neuronales, las subunidades GluR individuales pueden formar canales receptores de AMPA homoméricos funcionales, y los receptores de AMPA en estos sistemas de expresión heterólogos pueden experimentar endocitosis dependiente de la clatrina constitutiva y regulada. En algunas realizaciones, un receptor de AMPA incluye una subunidad GluR2. Las subunidades GluR pueden incluir sin limitación las secuencias descritas en los números de acceso NP_113796; NP_032191; NP_000818 para GluR1; NP_058957; NP_038568; NP_000817; P23819 para GluR2; NP_116785 para GluR3; o NP_058959 o NP_000820 para GluR4, y secuencias de nucleótidos relacionadas, por ejemplo, NM_000826. Otros polipéptidos o secuencias de nucleótidos de GluR pueden ser encontrados en bases de datos públicas, tales como en GenBank.

Un receptor de AMPA "fosforilado" incluye subunidades de polipéptidos que son modificadas postraducción sobre cualquier residuo de aminoácidos, por ejemplo, serina, treonina o tirosina, que sea capaz de ser fosforilado *in vivo*. Por ejemplo, un receptor de AMPA fosforilado puede incluir una subunidad GluR2 que es fosforilada, por ejemplo, sobre uno cualquiera o más de tirosinas 869, 873 y 876 de la secuencia descrita en el número de acceso NP_000817, o fosforilado sobre uno cualquiera o más de residuos de tirosina presentes en las secuencias correspondientes en subunidades GluR.

Un receptor de AMPA "no fosforilado" puede ser incapaz de ser fosforilado en un residuo de aminoácidos capaz de ser fosforilado *in vivo*, por ejemplo, por mutación de ese residuo a un aminoácido que no es capaz de ser fosforilado. Una mutación de una tirosina a una alanina en una secuencia de polipéptidos, por ejemplo, da como resultado una proteína que no es capaz de ser fosforilada en una posición particular en la secuencia de polipéptidos. Un polipéptido de GluR2 que posee una alanina u otro aminoácido no fosforilable en las posiciones 869, 873 y/o 876 de

la secuencia descrita en el número de acceso NP_000817, en vez de una tirosina, es un ejemplo de tal receptor de AMPA “no fosforilado”. Un receptor de AMPA no fosforilado también puede ser una proteína que es capaz de ser fosforilada *in vivo* pero no es fosforilada debido, por ejemplo, a la presencia de un inhibidor, por ejemplo, un inhibidor de quinasa; debido a un anticuerpo que interfiere con el sitio de fosforilación; debido a la actividad de una fosfatasa; o se evita su fosforilación por algunos otros medios. Un receptor de AMPA “fosforilado constitutivamente” es una proteína que posee una mutación en un residuo de aminoácidos que es capaz de ser fosforilado *in vivo*, en donde la mutación imita la fosforilación en ese residuo, y el polipéptido resultante posee la actividad biológica de un polipéptido fosforilado. En general, la mutación de un residuo fosforilable a un residuo de ácido glutámico o ácido aspártico da como resultado la fosforilación constitutiva.

Un polipéptido de GluR CT incluye un péptido derivado de, o sustancialmente idéntico a, el terminal C de un polipéptido de GluR y que es capaz de inhibir la endocitosis del receptor de AMPA, o de modular la apoptosis neuronal o la plasticidad sináptica. Los péptidos de GluR CT incluyen, sin limitación, péptidos que incluyen las secuencias definidas en la Tabla I o sustituciones conservadoras de los mismos, fórmula I, o fórmula A, o secuencias homólogas de los mismos encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3 o GluR4 del receptor de AMPA. En algunas realizaciones, un péptido de GluR CT puede incluir otras secuencias (por ejemplo, TAT PTD) en la forma de, por ejemplo, una proteína de fusión.

Un “fragmento biológicamente activo” de un receptor de AMPA incluye una secuencia de aminoácidos encontrada en un receptor de AMPA de origen natural que es capaz de modular la apoptosis o muerte celular o plasticidad sináptica, o experimentar endocitosis, tal como se describe aquí o es conocido para los experimentados en el arte. Una “variante” de un receptor de AMPA incluye modificación, por ejemplo, por eliminación, adición o sustitución, de una secuencia de aminoácidos encontrada en un receptor de AMPA de origen natural que es capaz de modular la apoptosis o muerte celular o plasticidad sináptica, experimentar endocitosis, tal como se describe aquí o es conocido para los de experiencia normal en el arte.

Una “proteína”, “péptido” o “polipéptido” es cualquier cadena de dos o más aminoácidos, incluyendo aminoácidos o análogos de aminoácidos de origen natural o no natural, independientemente de la modificación postraduccion (por ejemplo, glicosilación o fosforilación). Una “secuencia de aminoácidos”, “polipéptido”, “péptido” o “proteína” puede incluir péptidos o proteínas que tengan enlaces anormales, entrecruzamientos y cubiertas de extremo, enlaces no peptídico o grupos modificadores alternativos. El término “grupo modificador” pretende incluir estructuras que están unidas directamente a la estructura peptídica (por ejemplo, por acoplamiento covalente), así como aquellos que están unidos indirectamente a la estructura peptídica (mediante una asociación no covalente estable o mediante un acoplamiento covalente a residuos de aminoácidos adicionales, o imitadores, análogos o derivados de los mismos, que pueden flanquear la estructura peptídica central). Por ejemplo, el grupo modificador puede estar acoplado al terminal amino o al terminal carboxilo de una estructura peptídica, o a una región peptídica o peptidomimética que flanquea el dominio central. Alternativamente, el grupo modificador puede estar acoplado a una cadena lateral de al menos un residuo de aminoácido o una estructura peptídica, o a una región peptídica o peptidomimética que flanquea el dominio central (por ejemplo, a través del grupo amino epsilon de un residuo lisilo (a través del grupo carboxilo de un residuo de ácido aspártico o un residuo de ácido glutámico, a través de un grupo hidroxilo de un residuo de tirosilo, un residuo serina o un residuo treonina, u otro grupo reactivo adecuado sobre una cadena lateral de un aminoácido). Los grupos modificadores acoplados covalentemente a la estructura peptídica pueden ser unidos por medio de y utilizando métodos bien conocidos en el arte para el enlazamiento de estructuras químicas, incluyendo, por ejemplo, enlaces amida, alquilamino, carbamato o urea. Los péptidos descritos aquí pueden incluir las secuencias definidas en la Tabla I o sustituciones conservadoras de las mismas, fórmula I, o fórmula A o secuencias homólogas de las mismas, encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3 o GluR4 del receptor de AMPA. En algunas realizaciones, los péptidos pueden incluir otras secuencias (por ejemplo, TAT PTD) en la forma de, por ejemplo, una proteína de fusión.

Una “molécula de ácido nucleico” es cualquier cadena de dos o más nucleótidos que incluyen nucleótidos o análogos de nucleótidos de origen natural o de origen no natural. Una molécula de ácido nucleico es “complementaria” a otra molécula de ácido nucleico si hibrida, bajo condiciones de alta restricción, con la segunda molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico descritas aquí incluyen aquellas moléculas que codifican las secuencias definidas en la Tabla I o sustituciones conservadoras de las mismas, fórmula I, o fórmula A, o secuencias homólogas de las mismas, encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3 o GluR4 del receptor de AMPA. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico puede incluir otras secuencias (por ejemplo, una secuencia que codifica para TAT PTD) para generar por ejemplo una proteína de fusión.

Una secuencia “sustancialmente idéntica” de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos difiere de una secuencia de referencia en solo una o más sustituciones conservadoras, tal como se discuten aquí, o en una o más sustituciones no conservadoras, eliminación o inserciones localizadas en posiciones de la secuencia que no destruye la función biológica tal como se describe aquí. Tal secuencia puede ser un entero desde 60% a 99%, o más generalmente al menos 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o tanto como 96%, 97%, 98% o 99% idénticas al nivel de aminoácidos o nucleótidos para la secuencia usada para comparación. La identidad de secuencia puede ser medida fácilmente utilizando un software de análisis de secuencia disponible públicamente (por ejemplo Sequence Analysis

- Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, o el software BLAST disponible de la National Library of Medicine, Estados Unidos de América). Ejemplos de software útil incluye los programas Pile-up y PrettyBox. Tales software comparan secuencias similares asignando grados de homología a las diversas sustituciones, eliminaciones, sustituciones y otras modificaciones. Secuencias sustancialmente idénticas pueden ser secuencias por ejemplo que son sustancialmente idénticas a las secuencias de aminoácidos definidas en la Tabla I o sustituciones conservadoras de las mismas, fórmula I, o fórmula A, o a secuencias homólogas de las mismas encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3, o GluR4 del receptor de AMPA. Una secuencia sustancialmente idéntica puede incluir adicionalmente secuencias sustancialmente idénticas a otras secuencias (por ejemplo, TAT PTD).
- 5
- 10 Un anticuerpo “enlaza específicamente” un antígeno cuando lo reconoce y se enlaza al antígeno, por ejemplo, péptido GluR CT, pero no reconoce sustancialmente ni se enlaza a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, un péptido GluR CT que no incluye tales secuencias. Tal anticuerpo tiene, por ejemplo, una afinidad por el antígeno que es 10, 100, 1000 o 10000 veces mayor que la afinidad del anticuerpo por otra molécula de referencia en una muestra.
- 15 La “muerte celular” o “apoptosis”, define una ejecución específica de muerte celular programada que puede ser disparada por varios factores.⁵⁵ La apoptosis neuronal mediada por NMDA es la muerte celular neuronal observada por activación de los receptores de NMDA.
- La “endocitosis” es el proceso mediante el cual la membrana del plasma de una célula se pliega hacia dentro, para internalizar componentes de la membrana así como otros materiales. La endocitosis del receptor es mediada típicamente por pozos y vesículas de clatrina.
- 20
- Un “inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina” incluye un compuesto que es capaz de inhibir específicamente la endocitosis mediada por clatrina, sin inhibir sustancialmente la endocitosis en general. Un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina puede incluir, por ejemplo, myr-dyn, o inhibidores tales como los descritos en Jarousse y Kelly.⁶² Un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA también puede ser un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina.
- 25
- Un “inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA” incluye un compuesto que puede ser capaz en general de inhibir específicamente la endocitosis del receptor de AMPA, sin inhibir sustancialmente la endocitosis mediada por clatrina en general, cuando se compara con un inhibidor de endocitosis mediada por clatrina. En algunas realizaciones, un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA puede incluir compuestos que no afectan los niveles basales de endocitosis del receptor de AMPA, por ejemplo compuestos que son inhibidores de la endocitosis del receptor de AMPA “regulada”. Un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA puede incluir compuestos que son sustancialmente idénticos a las secuencias de aminoácidos definidas en la Tabla I o sustituciones conservadoras de las mismas, fórmula I, o fórmula A, o a secuencias homólogas encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3 o GluR4 del receptor de AMPA. Un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA puede incluir un anticuerpo que imita las secuencias definidas en la Tabla I o sustituciones conservadoras de las mismas, fórmula I, o fórmula A, o a secuencias homólogas encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3 o GluR4 del receptor de AMPA, por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico a un anticuerpo que enlaza específicamente un péptido GluR CT.
- 30
- 35
- 40 “Plasticidad sináptica” se refiere a los cambios dependientes del uso (a largo plazo o a corto plazo) en la eficiencia de la transmisión sináptica entre células neuronales. La plasticidad sináptica se considera subyacente al proceso tras el aprendizaje y la memoria.
- Un “compuesto de prueba” es cualquier compuesto químico de origen natural o derivado artificialmente. Los compuestos de prueba pueden incluir, sin limitación, péptidos, polipéptidos, moléculas orgánicas sintetizadas, moléculas orgánicas de origen natural y moléculas de ácidos nucleicos. Un compuesto de prueba puede “competir” con un compuesto conocido, por ejemplo, un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina o un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA, tal como un péptido de GluR-CT o fragmento del mismo, por ejemplo, interfiriendo con la modulación de la apoptosis neuronal o muerte celular o plasticidad sináptica, endocitosis o fosforilación de proteína, u otra respuesta biológica. En general un compuesto de prueba puede exhibir un valor entre 10% y 200%, o más de 500%, de modulación cuando se compara con un péptido o análogo de péptido de GluR-CT, u otro compuesto de referencia. Por ejemplo, un compuesto de prueba puede exhibir al menos un entero positivo o negativo de 10% a 200% de modulación, o al menos cualquier entero positivo o negativo de 30% a 150% de modulación, o al menos cualquier entero positivo o negativo de 60% a 100% de modulación, o cualquier entero positivo o negativo de más de 100% de modulación. Un compuesto que es un modulador negativo en general hará disminuir la modulación con respecto a un compuesto conocido, mientras que un compuesto que es un modulador positivo en general incrementará la modulación con respecto a un compuesto conocido.
- 45
- 50
- 55
- Una “muestra” puede ser cualquier órgano, tejido, célula o extracto de célula aislado a partir de un sujeto, tal como una muestra aislada de un animal que tiene daño neurológico o disfunción neuronal o un trastorno neurológico. Por

ejemplo, una muestra puede incluir, sin limitación, tejido o células del hipocampo, tejido o células del cerebelo, etc., u otro tejido neuronal u otro (por ejemplo, de una biopsia o autopsia), aislado de un animal con daño, disfunción o trastorno neurológico, o de un animal normal, esto es, que no tiene daño, disfunción o trastorno neurológico. Una muestra también puede incluir, sin limitación, tejido tal como células neuronales, sangre periférica, sangre entera, concentrados de glóbulos rojos, concentrados de plaquetas, concentrados de leucocitos, proteínas de células sanguíneas, plasma sanguíneo, plasma rico en plaquetas, un concentrado de plasma, un precipitado de cualquier fraccionamiento del plasma, un sobrenadante de cualquier fraccionamiento del plasma, fracciones de proteína de plasma sanguíneo, proteínas sanguíneas purificadas o parcialmente purificadas u otros componentes, suero, semen, calostro de mamíferos, leche, orina, heces, saliva, extractos de placenta, líquido amniótico, o un crioprecipitado, un criosobrenadante, un lisado celular, un cultivo o medio de cultivo de células de mamífero, productos de fermentación, fluido ascítico, proteínas presentes en células sanguíneas, tumores sólidos aislados de un mamífero con un carcinoma neuronal, o cualquier otro espécimen, o cualquier extracto del mismo, obtenido de un paciente (humano o animal), sujeto de prueba o animal experimental. Una muestra también puede incluir, sin limitación, productos producidos en cultivo celular por células normales o células aisladas de un sujeto con daño neurológico o disfunción neuronal (por ejemplo, a través de la tecnología de ADN recombinante). Una "muestra" puede ser también una célula o línea celular creada bajo condiciones experimentales, que no es aislada directamente de un sujeto. Una muestra puede ser también libre de células, derivada artificialmente o sintetizada. En algunas realizaciones, las muestras se refieren a tejidos o células neuronales. En algunas realizaciones, la muestra puede ser de un sujeto que tiene daño neurológico o disfunción neuronal; o de un sujeto normal, esto es, no diagnosticado con o en riesgo de o del que se sospeche que tiene un daño neurológico o disfunción neuronal.

Tal como se utiliza aquí, un sujeto puede ser un humano, un primate no humano, rata, ratón, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, *Aplysia*, etc. El sujeto puede ser un paciente clínico, un voluntario para ensayo clínico, un animal experimental, etc. El sujeto puede ser objeto de sospecha de tener o estar en riesgo de tener daño neurológico o disfunción neuronal, estar diagnosticado con daño neurológico o disfunción neuronal, o ser un sujeto de control del que se ha confirmado que no tiene daño neurológico o disfunción neuronal. Los métodos diagnósticos para daño neurológico o disfunción neuronal y el delineamiento clínico para el diagnóstico de daño neurológico o disfunción neuronal son conocidos para las personas de experiencia normal en el arte.

Por "poner en contacto" se entiende someter un animal, célula, lisado, extracto, molécula derivada de una célula, o molécula sintética a un compuesto de prueba.

Por "determinar" se entiende el análisis del efecto de un compuesto de prueba sobre el sistema de prueba. Los medios para analizar pueden incluir, sin limitación, marcación con anticuerpos, ensayos de apoptosis, inmunoprecipitación, ensayos de fosforilación *in vivo* e *in vitro*, ensayos de muerte celular, ensayos de inmunofluorescencia, ELISA, análisis ultraestructural, análisis histológico, modelos animales o cualquier otro método descrito aquí o conocido por los experimentados en el arte.

"Que modula" o "modula" implica cambiar, bien sea incrementar o disminuir. El incremento o disminución puede ser un cambio de cualquier valor entre 10% y 90% o de cualquier valor entre 30% y 60%, o puede estar por encima de 100%, por encima de 200%, por encima de 300% o por encima de 500% cuando se compara con un control o muestra de referencia o compuesto.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de los dibujos y la invención y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-F. El NMDA induce la apoptosis en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata. Las neuronas de hipocampo maduras fueron tratadas con NMDA (100 μ M más glicina 10 μ M; 1 hora) y luego se regresaron a un medio normal durante 24 horas. En esta y en las siguientes figuras, todos los datos se expresan como media $\pm$ SEM y se analizaron utilizando una prueba t de Student no pareada. El tratamiento A, B con NMDA induce un incremento dependiente del tiempo en la actividad de caspasa-3. A: inmunoprecipitación western de lisado celular utilizando caspasa-3 antiescindida; B: ensayo de ELISA que detecta escisión de DEVD-pNA. C. electroforesis en gel de agarosa que muestra escalamiento de ADN significativo después de tratamiento con NMDA. D, ensayo de ELISA para muerte celular por apoptosis que mide la histonabiotinilación muestra que la apoptosis inducida por NMDA está bloqueada por el antagonista del receptor de NMDA, APV. E, F, ensayos de ELISA para muerte celular por apoptosis muestran que los inhibidores de endocitosis bloquean específicamente la apoptosis inducida por NMDA, pero no por STS en neuronas de hipocampo cultivadas.

Figuras 2A-D. Los inhibidores de endocitosis perturban la activación mediada por el receptor de NMDA de la ruta de señalización de la muerte celular sin alterar la función de receptor de NMDA. A, B, la inhibición de endocitosis tiene poco efecto sobre el influjo de Ca^{2+} a través de canales receptores de NMDA activados. El trazo superior (A) muestra un registro de las fluctuaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por la activación del receptor de NMDA por medición de los cambios radiométricos en fluorescencia con Fura-2 en una neurona individual de hipocampo. La aplicación de

NMDA repetitiva (100 μ M) en la región de la neurona bajo observación fue lograda utilizando una pipeta de eyección a presión en los puntos de tiempo indicados por los cuadrados negros inferiores (500 ms cada uno). Se aplicó sacarosa (400 mM) al baño tal como se indica por la barra negra superior. El histograma en la parte inferior (B) resume las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ a puntos de tiempo indicados a partir de tres neuronas individuales (media $\pm$ SEM). C, un péptido derivado de dinamina miristoilada inhibe la activación inducida por NMDA de la caspasa-3. D, la inhibición de la endocitosis perturba específicamente la reducción inducida por NMDA, pero no por STS en la fosforilación de Akt. Los lisados celulares tratados como se indica fueron sondeados primero con un anticuerpo específico al Akt fosforilado sobre la serina 473, la forma activa de la enzima. Las neuronas fueron entonces desprendidas y resondeadas con un anticuerpo anti-Akt. Las siembras de cuatro experimentos individuales fueron escaneadas y cuantificadas. El histograma representa la fosforilación de Akt relativa con respecto a Akt total. **, $p < 0.01$ en comparación con el grupo de control respectivo.

Figuras 3A-B. El NMDA induce el receptor de AMPA pero no la endocitosis del receptor de NMDA, la cual es bloqueada por el péptido de dinamina miristoilada permeable a la membrana (Myr-Dyn) así como un péptido derivado de la cola c de GluR2 (R2-CT). A, ensayo de receptor de superficie celular basado en ELISA para el receptor de NMDA y el receptor de AMPA. El tratamiento con NMDA indujo una reducción significativa en el receptor de AMPA de la superficie celular pero no del receptor NMDA, y la internalización del receptor de AMPA fue evitada por el pretratamiento de las neuronas con el péptido inhibidor de dinamina permeable a membrana miristoilado (Myr-Dyr; 10 μ M), pero no por el control impermeable a membrana, Dyn (** denota $p < 0.01$ en comparación con control; $n = 36-72$ pozos de tres experimentos separados para cada grupo). B, la internalización del receptor de AMPA inducida por NMDA es bloqueada por R2-CT, un péptido que bloquea regularmente la endocitosis del receptor de AMPA regulada.

Figuras 4A-B. Bloqueo de la endocitosis del receptor de AMPA con R2-CT evita la apoptosis inducida por NMDA pero no por STS en neuronas de hipocampo cultivadas. A, ensayo de ELISA para muerte celular por apoptosis mostrando que R2-CT bloquea la apoptosis inducida por NMDA pero no por STS. B, recuento celular para apoptosis de células teñidas PI después de fijación, mostrando que R2-CT bloquea la apoptosis inducida por NMDA.

Figuras 5A-B. Construcción de mutantes de GluR2 por eliminación interna o truncamiento del terminal carboxilo e identificación de una señal basada en tirosina (GluR2-3Y). A. Secuencias de mutantes CT por eliminación interna o truncamiento de la subunidad GluR2 de longitud completa marcada con HA y no marcada. B. Cuantificación de AMPARs expresado en superficie celular que contiene el GluR2, o diversos constructos mutantes, que fueron transfectados de manera transiente en células HEK293 y ensayados por ELISA en celda colorimétrica ($n = 6$). Los niveles de expresión de los constructos después de la transfección transiente en células HEK293 fueron determinadas por ensayos con ELISA en celda utilizando un anticuerpo anti-HA para constructos marcados con HA, o un anticuerpo de la subunidad anti-GluR2 para el constructo no marcado con HA, bajo condiciones permeabilizadas. El nivel de expresión fue normalizado al nivel de expresión del constructo tipo silvestre correspondiente (esto es, HA-GluR2 o GluR2). Todos los mutantes fueron expresados a un nivel similar a las contrapartes tipo silvestre. Al eliminar la señal basada en tirosina se evita la disminución inducida por insulina del AMPARs de superficie celular (barras rellenas) sin afectar el nivel del receptor basal. Al eliminar los dominios de enlazamiento a NSF se afecta la expresión del receptor basal pero no reducido por insulina, y que a diferencia de las neuronas, las señales de endocitosis tanto de AP2 como basadas en PICK1 son no funcionales en células HEK. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figuras 6A-B. Efectos de las mutaciones en GluR2 CT sobre la endocitosis y la expresión en superficie celular de los receptores de AMPA. A. Cuantificación de los cambios en endocitosis constitutiva (basal) y regulada (insulina) de GluR2 y sus diversos mutantes utilizando un ensayo colorimétrico de ELISA con células premarcadas después de la internalización de los receptores al cabo de 30 minutos (% de endocitosis de AMPAR = $100\% - \text{receptores de superficie celular remanentes} / \text{número total de receptores}$; $n = 6$). Control: Internalización medida en células a 4 E C sin exposición a 37 E C (bajo estas condiciones, ambas endocitosis constitutiva y regulada se bloquean). B. Receptores de AMPA en superficie celular en células HEK293 que expresan de manera transiente GluR2 y sus diversos mutantes fueron cuantificados utilizando ensayos de receptor en superficie celular basados en ELISA en celda colorimétrica ($n = 6$). Las comparaciones estadísticas se hicieron entre las condiciones basal y tratada con insulina, excepto cuando se indica mediante líneas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figura 7A-D. La insulina incrementa la fosforilación de los residuos de tirosina dentro de la región terminal carboxilo (CT) de GluR2. A. Fosforilación de tirosina *in vitro* del GluR2 CT. Proteínas de fusión GST del GluR1 CT (GST-GluR1CT), el GluR2 CT (GST-GluR2CT), residuos 869, 876 (YKEGYNVYG) del GluR2 CT (GST-GluR23Y), que contiene un aglomerado de tres residuos de tirosina (Y869, Y873, y Y876) y el mismo contenido de aminoácidos del gel GluR2 CT con sus residuos de tirosina reemplazados por alaninas (GST-GluR23A), junto con el esqueleto de GST (GST) como control, fueron incubados en la ausencia (-) o presencia (+) de pp 60 c-Src recombinante. Los productos de fosforilación fueron sometidos a inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (panel superior). La tinción con Ponceau S de la misma mancha mostró que una cantidad similar de proteína de fusión de GST fue utilizada en cada una de las reacciones (panel inferior). B. Niveles de expresión de HA-GluR2 y HA-GluR23Y-3A (donde las tirosinas 869, 873 y 876 fueron mutadas a alaninas) 48 horas después de la transfección

transiente en células HEK293 fueron determinados mediante un ensayo de ELISA en celda utilizando células permeabilizadas. C. Las células HEK293 transfectadas de manera transiente con HA-GluR1, HA-GluR2 o HA-GluR23Y-3A, junto con un vector vacío (transfección falsa) como control. Cuarenta y ocho horas después, las células fueron tratadas con o sin insulina 0.5 μ M durante 10 minutos. Los lisados fueron sometidos entonces a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HA bajo condiciones de desnaturalización y se realizó la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-fosfotirosina (mancha superior; IB:PY). La misma mancha fue desprendida y reinmunoprecipitada con el anticuerpo anti-HA para asegurar una eficiencia de inmunoprecipitación similar en todos los experimentos individuales (mancha inferior; IB:HA). D. Mutación de las tirosinas individuales del péptido Glu23Y-CT a alaninas.

Figuras 8A-B. El aglomerado de tirosina en el GluR2 CT es requerido para la endocitosis del receptor de AMPA regulada, pero no constitutiva, en células HEK293. A. Los ensayos de endocitosis del receptor por ELISA colorimétrica en célula fueron llevados a cabo con estimulación (insulina) o sin estimulación (control) (véase Figura 2) sobre células HEK293 transfectadas de manera transiente con la subunidad HA-GluR2 tipo silvestre o HA-GluR23Y-3A, en la cual los residuos de tirosina Y869, Y873 y Y876 fueron mutados en alaninas. B. Resultados del ensayo del receptor de superficie celular por ELISA colorimétrica en células de células HEK293 transfectadas y tratadas como en (A). Los resultados fueron obtenidos a partir de 6 experimentos para cada grupo individual. ** $p < 0.01$

Figuras 9A-D. La insulina estimula la fosforilación de tirosina de GluR2 y la depresión de larga duración de la transmisión sináptica mediada por el receptor de AMPA. A. Homogenizados de tejido de secciones de hipocampo tratadas con insulina (basal) o sin insulina (INS; 0.5 μ M, 10 min) fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-GluR1 o GluR2 bajo condiciones de desnaturalización (IP: GluR1 o GluR2). Los inmunoprecipitados fueron inmunoprecipitados entonces utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (IB:PY). La mancha fue desprendida secuencialmente y resondeada con anticuerpos anti-GluR2 (IB: GluR2) y anti-GluR1 (IB: GluR1). B. Cuantificación densitométrica expresada como la relación de GluR2 fosforilado a GluR2 total de tres experimentos separados se resume en el histograma a la derecha. ** $p < 0.01$ C. Las EPSCs fueron registradas en neuronas CA1 de secciones de hipocampo utilizando registros para célula completa bajo el modo de voltaje-pinza a un potencial de sostenimiento de -60 mV. Las EPSCs normalizados (EPSCt/EPSC0) son representados gráficamente a partir de neuronas registradas con pipetas que contenían solución intracelular estándar (control, n=7) o solución intracelular suplementada con GSTY869KEGY873NVY876G (GluR23Y; n=5) o GST-A869KEGA873NVA876G (GluR3A; n=6). El tiempo cero se define como el punto del tiempo en el cual las amplitudes de EPSCs fueron estabilizadas (típicamente 5-10 minutos después del inicio del registro de la célula entera), y a t = 10 minutos, se aplicó insulina (0.5 μ M) en el baño como se indica con la barra negra horizontal. D. A la izquierda se muestran EPSCs representativas promediadas a partir de cuatro registros individuales antes (basal) o 10 minutos después de la aplicación de insulina (INS).

Figuras 10A-E. La fosforilación de tirosina de la subunidad GluR2 es requerida para la depresión a largo plazo de CA1 hipocampo inducida por LFS (LTD). A. Los homogenizados de control o las secciones de hipocampo tratadas con LFS fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-GluR1 o GluR2 y sondeadas secuencialmente con anti-fosfotirosina (PY), anti-GluR1 (GluR1) y anti-GluR2 anticuerpos (GluR2) como se describe aquí. La línea marcada como M contiene estándares de peso molecular. B. Los resultados de tres experimentos individuales se resumen en la gráfica de barras. ** $p < 0.01$ C. Se muestran respuestas representativas a la izquierda. D. Las gráficas a la derecha, y en E representan EPSCs (EPSCt/EPSC0) normalizados a partir de neuronas registradas como se describe con pipetas que contenían solución intracelular estándar (control, n=7) o solución intracelular suplementada con GluR23Y (B; n=6), GluR23A (B; n=7) o GluR2834-843 (C; n=5). El LFS fue administrado durante el período de tiempo indicado por la barra negra horizontal.

Figuras 11A-B. El péptido GluR2 CT previene la endocitosis y la apoptosis neuronal del receptor de AMPA inducida por isquemia en un modelo de cultivo neuronal de apoplejía. A. Un ensayo colorimétrico (célula-ELISA) muestra que el OGD facilita la endocitosis del receptor de AMPA, haciendo disminuir por lo tanto su expresión sobre la superficie de la membrana de plasma y la preincubación del péptido de GluR2-CT redujo el descenso inducido por OGD en la expresión del receptor de AMPA en superficie celular (n=6; * : $P < 0.05$, prueba de Student, en comparación con control). B. Ensayo de apoptosis cuantitativo 24 horas después de OGD utilizando el kit Cell Death Detection ELISA plus (Roche, Cat# 1 774 425) demuestra que OGD produce muerte neuronal que se evita grandemente mediante un pretratamiento de neuronas con GluR2-CT. (n=6; ** : $P < 0.01$, prueba t de Student, en comparación con OGD).

Figuras 12A-D. Aplicación sistémica del péptido Tat-GluR2_{3Y} bloquea la expresión de la sensibilización en comportamiento al fármaco de abuso d-anfetamina en un modelo animal de adicción a fármacos. El péptido GluR2-3Y o GluR2-3A fue fusionado a un dominio de transducción Tat (Tat-GluR2-3Y o GluR2-3A) para facilitar la permeabilidad de la membrana. La administración intravenosa (IV; 1.5 nM/g) o la microinyección directa en el nucleus accumbens (NAc) con el péptido de interferencia GluR2-3Y, pero no por el péptido de control GluR2-3A, bloquea la sensibilización de comportamiento inducida por D-anfetamina (D-Amph) de estereotipia. A. Las calificaciones de estereotipia establecidas a diversos puntos del tiempo muestran un bloqueo de una sensibilización después de la inyección intravenosa de Tat-GluR2-3Y. Los puntos representan marcadores de estereotipia medios

(+ S.E.M) para cada grupo de ratas probadas durante la sesión de 2 horas. Las ratas tratadas con solución salina crónica sirvieron como sujetos de control. B. El resumen de los cambios en los marcadores de estereotipia a través de las 2 horas de sesión de prueba convertidos al área bajo la curva (AUC) para grupos individuales representados en la gráfica A. C. Microinyección intracraneana de GluR2-3Y en las NAc también bloquea la sensibilización inducida por D-Amph. D. La microinyección intracraneana del péptido GluR2-3Y en el área tegumental ventral (VTA) no bloquea la sensibilización en comportamiento inducida por D-Amph. (* = $p < 0.05$, con respecto al grupo de anfetamina aguda).

Figura 13. El Tat-GluR2-3Y bloquea la endocitosis de AMPAR inducida por NMDA. Las neuronas corticales de Wistar *in vitro* en el día 12-13 fueron pretratadas durante 60 minutos bien con solución salina o con Tat-GluR2-3Y o Tat-GluR2-3A 1 μ M seguido por un tratamiento con NMDA 50 μ M durante 30 minutos. El porcentaje de expresión de AMPAR medido por ELISA celular fue definido como la cantidad de expresión en superficie (no permeabilizada) dividido por la expresión total (permeabilizada). Los datos son representativos de 1 o 4 experimentos separados, cada uno con 4 mediciones replicadas y se expresan como media $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer.

Figura 14. El Tat-GluR2-3Y atenúa la apoptosis neuronal en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa. Las neuronas corticales Wistar *in vitro* en los días 12-13 fueron pretratadas bien con Tat-GluR2-3Y o solución salina durante 60 minutos, seguida por 60 minutos de OGD o incubación a 37°C (control). A las 24 horas, la apoptosis fue cuantificada utilizando un ELISA direccionado a nucleosomas libres. Los datos fueron normalizados con respecto al control y expresados como media $\pm$ SEM de 3 experimentos repetidos. * Grupo OGD fue significativamente diferente de todos los otros grupos $p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer.

Figura 15. Curva de tolerancia a la dosis frente a dosis seriada de Tat-GluR2-3Y. Dos ratas Sprague-Dawley macho adultas recibieron dosis seriadas de Tat-GluR2-3Y y se monitorizaron los parámetros vitales básicos. Dosis de hasta 6 nmoles/g evocaron poca respuesta en los parámetros monitorizados; sin embargo, dosis más altas dieron como resultado un descenso grande en la presión arterial media y un incremento concurrente en la tasa de respiración. Ambos animales no mostraron signos de comportamiento alterado después de salir de la anestesia.

Figura 16. La oclusión arterial cerebral media transiente dio como resultado una apoptosis incrementada. Dos ratas Sprague-Dawley macho adultos fueron sometidos a 90 minutos de oclusión MCA o a cirugía sin oclusión de MCA (sham). A las 24 horas, las ratas fueron sacrificadas, y se tiñeron con TUNEL en secciones de cerebro de 12 μ M. El número de núcleos positivos a TUNEL fue contado para tres campos visuales y presentado como media $\pm$ SEM (B). * $p < 0.01$, prueba t de Student.

Figuras 17A-B. El efecto del Tat-GluR2-3Y sobre la apoptosis en un modelo de ratas de isquemia focal transiente. Ratas Sprague-Dawley macho adultas fueron pretratadas durante 1 hora bien sea con solución salina, o 3 nmol/g de Tat-GluR2-3Y o Tat-GluR2-3A y luego sometidas a 60 minutos de oclusión MCA. Las ratas recibieron un examen neurológico antes del sacrificio a las 24 horas (A). Secciones de la corona del cerebro de 12 μ m fueron teñidas con TUNEL y el número de células positivas a TUNEL fue contado para cada sección (B). Los datos son normalizados con respecto a un control de cirugía simulada se expresan como valores medios $\pm$ SEM. El péptido redujo la apoptosis en 55% con respecto al control.

Figuras 18 A-B. Experimentos de control para confirmar que GluR2-3Y no tiene efectos no específicos sobre comportamientos aprendidos reforzados por estímulos de recompensa con alimento o fármaco. Estos experimentos también demuestran que este péptido de interferencia no perturba las funciones motoras sensoriales o de memoria relacionadas con el rendimiento del comportamiento operativo en dos diferentes programaciones de refuerzo. A. Las ratas mantenidas en una programación restringida de alimentación fueron entrenadas para presionar una palanca para obtener pellas de alimento (45 mg) en una programación de relación fija 2 (FR2) durante sesiones de prueba de 2 horas. Las ratas recibieron inyecciones IV de solución salina, GluR2-3A, o GluR2-3Y, en un orden contrabalanceado, 60 minutos antes de la sesión de prueba. No hubo diferencias significativas en el número total de respuestas para la recompensa con alimento, entre las tres condiciones. B. Las ratas fueron entrenadas primero para autoadministración d-anfetamina (0.2 mg/infusión) a través de un catéter yugular en una programación FR2 de refuerzo. Una vez que la respuesta en las sesiones de prueba de 3 horas se había estabilizado, las ratas fueron entrenadas entonces sobre una Programación de Proporción Progresiva en las cuales se requirieron más respuestas para obtener cada refuerzo sucesivo. La proporción en la cual las ratas fallaron en ejecutar el número apropiado de respuestas en un período de 1 hora se denomina el punto de ruptura y esta prueba es una medida sensible del valor de recompensa no condicional y un estímulo de recompensa específico. Una vez que se establecen los valores del punto de ruptura, las ratas recibieron inyecciones IV de solución salina, GluR2-3A, o GluR2-3Y, en un orden contrabalanceado, 60 minutos antes de la sesión de prueba. No hubo diferencias significativas en las mediciones del punto de ruptura para recompensa con fármaco, entre las tres condiciones.

Figura 19. El péptido GluR2-3Y bloquea la ansiedad inducida por estrés en un modelo de estrés en rata. Las ratas (n=2) fueron inyectadas bien con GluR2-3Y 10 nM/g o un volumen igual de vehículo ACSF (IP). Permanecieron 30 minutos en un habitáculo oscuro después de la inyección. Después de esto fueron colocadas en una plataforma

elevada durante 30 minutos como prueba de estrés. Después de esos 30 minutos fueron colocadas en laberinto elevado plus durante 5 minutos. Las ratas inyectadas con GluR2-3Y gastaron más tiempo en los brazos abiertos que las ratas ACSF. Las ratas ACSF gastaron más de su tiempo en las esquinas de los brazos cerrados o retrocedieron hacia las paredes. Así, el péptido GluR23Y bloquea la ansiedad inducida por estrés. Estos resultados sugieren fuertemente que la endocitosis de AMPAR facilitada y por lo tanto la expresión de LTD juega un papel indispensable en la expresión de comportamientos inducidos por estrés y que el bloqueador de LTD tal como el GluR23Y puede ser utilizado en procedimientos terapéuticos para tratar desordenes cerebrales relacionados con el estrés.

Descripción detallada de la invención

La invención provee, en parte, métodos y reactivos para modular la apoptosis neuronal mediada por NMDA. La invención también provee, en parte, métodos y reactivos para modular la plasticidad sináptica. Por ejemplo, los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser utilizados como agentes neuroprotectores que son capaces de modular la endocitosis del receptor de AMPA. En algunas realizaciones, tales compuestos pueden modular la endocitosis del receptor de AMPA y bloquear la apoptosis neuronal sin afectar la función del receptor de NMDA, y por lo tanto pueden eludir los efectos negativos del bloqueo de la función del receptor de NMDA.

Se describen aquí realizaciones alternativas y ejemplos de la invención.

Ensayos

Pueden llevarse a cabo diversos ensayos, tal como se describe aquí o es conocido por una persona de experiencia normal en el arte, para determinar la actividad moduladora de un compuesto de acuerdo con la invención. Por ejemplo, la modulación de la plasticidad sináptica, la endocitosis del receptor de AMPA, la apoptosis neuronal inducida por NMDA o la fosforilación del receptor de AMPA, pueden ser probados como se describe aquí o como es conocido para una persona de experiencia normal en el arte. En algunas realizaciones, los ensayos pueden ser llevados a cabo para probar los compuestos en cuanto a su capacidad para inhibir la endocitosis del receptor de AMPA. Tales ensayos incluyen sin limitación ensayos basados en ácidos nucleicos, polipéptidos, moléculas pequeñas, etc., tales como inmunoensayos, ensayos de hibridación, ensayos de enlazamiento de moléculas pequeñas, ensayos de enlazamiento de péptidos, ensayos de enlazamiento de anticuerpos, ensayos de competición, ensayos de endocitosis, ensayos de fosforilación, ensayos de apoptosis y muerte celular, histoquímica, ensayos en modelos animales e *in vitro*, etc.

Los polipéptidos del receptor de AMPA pueden ser provistos en células neuronales o no neuronales, o en lisados celulares. Las células y líneas celulares pueden ser obtenidas a partir de fuentes convencionales, por ejemplo, ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos de América. Modelos animales adecuados para trastornos neurológicos pueden ser obtenidos, por ejemplo, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, Estados Unidos de América o de otras fuentes. Modelos animales adecuados incluyen modelos para apoplejía⁸⁷⁻⁹⁴, adicción a fármacos^{101-106,112}, esquizofrenia¹⁰⁷⁻¹¹¹, enfermedad de Huntington¹¹², epilepsia¹¹⁵, neurocomplicación de sida¹¹⁶, retardo mental (por ejemplo, retardo X frágil, síndrome de Rett)^{117,118}, y esclerosis múltiple^{119,120}.

Los ensayos pueden ser llevados a cabo utilizando moléculas detectablemente marcadas, esto es, cualquier medio para marcar e identificar la presencia de una molécula, por ejemplo, una sonda o cebador de oligonucleótidos como un gen o fragmento del mismo, un péptido, o una molécula de ADNc. Los métodos para marcar de manera detectable una molécula son bien conocidos en el arte e incluyen, sin limitación, marcación radioactiva (por ejemplo, con un isótopo tal como ³²P o ³⁵S) y marcación no radioactiva tal como, por ejemplo, marcación enzimática (por ejemplo, utilizando peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina), marcación quimioluminiscente, marcación fluorescente (por ejemplo utilizando fluoresceína), marcación bioluminiscente o detección de anticuerpos de un ligando unido a la sonda. También se incluye en esta definición una molécula que está marcada de manera detectable a través de un medio indirecto, por ejemplo, una molécula que está enlazada con una primera unidad estructural (tal como biotina) que, a su vez, está enlazada a una segunda unidad estructural que puede ser observada o probada (tal como estreptavidina marcada con fluoresceína). Los marcadores también incluyen digoxigenina, luciferasas y aecuatorina.

Trastornos y condiciones

Cualquier trastorno o condición que incluye disfunción neural, por ejemplo debido a daños neurológicos o sensibilización al comportamiento debido a la activación excesiva de los receptores de NMDA o debido a cambios en la endocitosis del receptor de AMPA pueden ser tratados, prevenidos o estudiados de acuerdo con los métodos y compuestos de la invención. Por lo tanto, los trastornos asociados con otras condiciones que varían desde hipoglicemia, hipoxia y paro cardíaco hasta epilepsias se consideran trastornos con daño neurológico de acuerdo con la invención. Los trastornos de acuerdo con la invención incluyen sin limitación isquemia cerebral, que se presenta por ejemplo después de una apoplejía (apoplejía isquémica debida por ejemplo a una enfermedad aterotrombótica de por ejemplo, arterias extracraneanas o a émbolos de infarto cardíaco o lacunar) o trauma

5 cerebral (por ejemplo, hemorragia intracerebral o hemorragia subaracnoide); lesiones en la cabeza; trastornos neurodegenerativos en los cuales las neuronas comprometidas se hacen sensibles a daño excitotóxico; enfermedad de Alzheimer, Parkinson o Huntington; epilepsia, dolor neuropático; esclerosis lateral amiotrófica (ALS); síndrome de Hutchinson Gilford; diabetes; ataxia; retardo mental; o demencias. Los factores de riesgo principal para apoplejía incluyen tabaco, diabetes, obesidad y presión sanguínea elevada. De acuerdo con lo anterior, los sujetos que tienen cualquiera de estas condiciones o comportamientos pueden considerarse como poseedores de un trastorno de acuerdo con la invención.

10 Los trastornos de acuerdo con la invención también incluyen aquellos trastornos asociados con defectos o disfunción en el aprendizaje o la memoria; trastornos psiquiátricos, tales como autismo, esquizofrenia o síndrome X frágil; o trastornos asociados con abuso de sustancias o adicción a fármacos, incluyendo nicotina, alcohol, opiáceos tales como heroína, codeína y morfina, incluyendo derivados tales como petidina y metadona, nicotina, marihuana, fenclideno, psicoestimulantes tales como anfetaminas y cocaína, barbituratos tales como pentobarbitona y quinalbarbitona, y benzodiacepinas tales como temazepam, diazepam y flunitrazepam.

Anticuerpos

15 Los compuestos de la invención pueden ser usados para preparar anticuerpos para péptidos de GluR2-CT o análogos de los mismos, por ejemplo, las secuencias definidas en la Tabla I o sustituciones conservadoras de las mismas, fórmula I, o fórmula A, o a secuencias homólogas encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3 o GluR4 del receptor de AMPA, utilizando técnicas estándar de preparación como, por ejemplo, las descritas en Harlow y Lane⁵⁶, o conocidas por los experimentados en el arte. Los anticuerpos pueden ser diseñados para
20 minimizar la respuesta inmune adversa del huésped, por ejemplo utilizando anticuerpos quiméricos que contienen un dominio de enlazamiento a una especie y la porción Fc de otra especie, o utilizando anticuerpos hechos a partir de hibridomas de las especies apropiadas. Los anticuerpos pueden ser elevados, por ejemplo contra un péptido o GluR-CT fosforilado que está fosforilado en una o más tirosinas o serinas o treoninas. Los anticuerpos también pueden ser elevados, por ejemplo, contra un péptido GluR-CT fosforilado constitutivamente que reemplaza las
25 tirosinas o serinas o treoninas con glutamatos y aspartatos. Pueden elevarse anticuerpos anti-idiotípicos, por ejemplo, contra un anticuerpo que se enlaza específicamente a un péptido de GluR CT o análogo del mismo.

Polipéptidos y compuestos de prueba

30 En un aspecto, los compuestos descritos aquí incluyen péptidos GluR2, GluR3 o GluR4 y análogos y variantes de los mismos, incluyendo, por ejemplo, los péptidos descritos aquí que están fosforilados o no fosforilados en una cualquiera de las tres tirosinas, incluyendo polipéptidos que están fosforilados constitutivamente, o que están no fosforilados, así como homólogos y fragmentos de los mismos. Por ejemplo, los compuestos descritos aquí incluyen péptidos que incluyen las secuencias definidas en la Tabla I o análogos o variantes de la misma.

Tabla I

35	YKEGYNVYG	YKEGYNVDG	YKEGYNVEG	YKEGYNVSG	YKEGYNVTG
	YKEGDNVYG	YKEGDNVDG	YKEGDNVEG	YKEGDNVSG	YKEGDNVTG
	YKEGENVYG	YKEGENVDG	YKEGENVEG	YKEGENVSG	YKEGENVTG
	YKEGSNVYG	YKEGSNVDG	YKEGSNVEG	YKEGSNVSG	YKEGSNVTG
	YKEGTNVYG	YKEGTNVDG	YKEGTNVEG	YKEGTNVSG	YKEGTNVTG
40	DKEGYNVYG	DKEGYNVDG	DKEGYNVEG	DKEGYNVSG	DKEGYNVTG
	DKEGDNVYG	DKEGDNVDG	DKEGDNVEG	DKEGDNVSG	DKEGDNVTG
	DKEGENVYG	DKEGENVDG	DKEGENVEG	DKEGENVSG	DKEGENVTG
	DKEGSNVYG	DKEGSNVDG	DKEGSNVEG	DKEGSNVSG	DKEGSNVTG
	DKEGTNVYG	DKEGTNVDG	DKEGTNVEG	DKEGTNVSG	DKEGTNVTG
45	EKEGYNVYG	EKEGYNVDG	EKEGYNVEG	EKEGYNVSG	EKEGYNVTG
	EKEGDNVYG	EKEGDNVDG	EKEGDNVEG	EKEGDNVSG	EKEGDNVTG
	EKEGENVYG	EKEGENVDG	EKEGENVEG	EKEGENVSG	EKEGENVTG
	EKEGSNVYG	EKEGSNVDG	EKEGSNVEG	EKEGSNVSG	EKEGSNVTG
	EKEGTNVYG	EKEGTNVDG	EKEGTNVEG	EKEGTNVSG	EKEGTNVTG
50	SKEGYNVYG	SKEGYNVDG	SKEGYNVEG	SKEGYNVSG	SKEGYNVTG
	SKEGDNVYG	SKEGDNVDG	SKEGDNVEG	SKEGDNVSG	SKEGDNVTG
	SKEGENVYG	SKEGENVDG	SKEGENVEG	SKEGENVSG	SKEGENVTG
	SKEGSNVYG	SKEGSNVDG	SKEGSNVEG	SKEGSNVSG	SKEGSNVTG
	SKEGTNVYG	SKEGTNVDG	SKEGTNVEG	SKEGTNVSG	SKEGTNVTG
55	TKEGYNVYG	TKEGYNVDG	TKEGYNVEG	TKEGYNVSG	TKEGYNVTG
	TKEGDNVYG	TKEGDNVDG	TKEGDNVEG	TKEGDNVSG	TKEGDNVTG
	TKEGENVYG	TKEGENVDG	TKEGENVEG	TKEGENVSG	TKEGENVTG
	TKEGSNVYG	TKEGSNVDG	TKEGSNVEG	TKEGSNVSG	TKEGSNVTG
	TKEGTNVYG	TKEGTNVDG	TKEGTNVEG	TKEGTNVSG	TKEGTNVTG

[illegible]

EREGSNVYGIE EREGSNVDGIE EREGSNVEGIE EREGSNVSGIE EREGSNVTGIE
 EREGTNVYGIE EREGTNVDGIE EREGTNVEGIE EREGTNVSGIE EREGTNVTGIE
 SREGYNVYGIE SREGYNVDGIE SREGYNVEGIE SREGYNVSGIE SREGYNVTGIE
 SREGDNVYGIE SREGDNVDGIE SREGDNVEGIE SREGDNVSGIE SREGDNVTGIE
 5 SREGENVYGIE SREGENVDGIE SREGENVEGIE SREGENVSGIE SREGENVTGIE
 SREGSNVYGIE SREGSNVDGIE SREGSNVEGIE SREGSNVSGIE SREGSNVTGIE
 SREGTNVYGIE SREGTNVDGIE SREGTNVEGIE SREGTNVSGIE SREGTNVTGIE
 TREGYNVYGIE TREGYNVDGIE TREGYNVEGIE TREGYNVSGIE TREGYNVTGIE
 TREGDNVYGIE TREGDNVDGIE TREGDNVEGIE TREGDNVSGIE TREGDNVTGIE
 10 TREGENVYGIE TREGENVDGIE TREGENVEGIE TREGENVSGIE TREGENVTGIE
 TREGSNVYGIE TREGSNVDGIE TREGSNVEGIE TREGSNVSGIE TREGSNVTGIE
 TREGTNVYGIE TREGTNVDGIE TREGTNVEGIE TREGTNVSGIE TREGTNVTGIE

En algunas realizaciones, los compuestos de acuerdo con la invención no tienen, o tienen en un menor grado, los efectos colaterales negativos asociados con el uso de otros agentes neuroprotectores. Por ejemplo, los compuestos de acuerdo con la invención, pueden exhibir cualquier valor de entre 10% a 100% de reducción en psicotomimesis, depresión respiratoria, desregulación cardiovascular, o cualquier otro efecto colateral adverso cuando se comparan con un antagonista receptor de NMDA o bloqueador de liberación de glutamato (tal como Selfotel, Gavestinel, Aptinagel, Memantina, etc.^{75-78,95-99}).

En algunas realizaciones, los compuestos de acuerdo con la invención son eficaces de manera similar o más eficaces que los agentes neuroprotectores existentes tales como los antagonistas del receptor de NMDA (por ejemplo, Gavestinel o Aptinagel) u otros agentes neuroprotectores (por ejemplo, antagonista R del péptido opioide Kappa tal como Cervene; inhibidores de NOS tal como Lubelozol; bloqueadores del canal de Na⁺ tales como Lubeluzol; estabilizadores de la membrana celular tales como Citicolina; antagonistas del canal de Ca²⁺; anticuerpos anti-ICAM tales como Enlimornab; moduladores del receptor de GABA_A tales como clometiazol; inhibidores de la liberación de glutamato tales como Riluzol)^{79-84,100}. Por ejemplo, los compuestos de acuerdo con la invención pueden exhibir cualquier valor de entre 0% a 100% o mayor que 100% de eficacia cuando se comparan con otros agentes neuroprotectores.

En realizaciones alternativas, uno o más de los compuestos descritos aquí pueden ser excluidos específicamente de uno o más aspectos de la invención.

Los compuestos pueden ser preparados, por ejemplo, reemplazando, eliminando o insertando un residuo de aminoácido en cualquier posición del péptido GluR, o análogo de péptido, por ejemplo, una secuencia de péptido de GluR2-CT tal como se define en la Tabla I, fórmula I, o fórmula A, o en secuencias homólogas encontradas en el terminal C de las subunidades GluR2, GluR3 o GluR4 del receptor de AMPA, tal como se describe aquí, con otros residuos de aminoácidos conservadores, esto es, residuos que tienen propiedades físicas, biológicas o químicas similares, y cribando en cuanto a la capacidad del compuesto para inhibir la endocitosis del receptor de AMPA. Se describen compuestos que incluyen anticuerpos que se enlazan específicamente a un polipéptido de GluR, por ejemplo un péptido de GluR2-CT, el cual puede ser fosforilado, no fosforilado, no fosforilable o fosforilado constitutivamente. También se describen compuestos que incluyen anticuerpos que se enlazan a anticuerpos que enlazan específicamente péptidos GluR CT.

Es bien conocido en el arte que pueden hacerse algunas modificaciones y cambios en la estructura de un polipéptido sin alterar sustancialmente la función biológica de ese péptido, para obtener un polipéptido biológicamente equivalente. Por ejemplo, los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser adaptados o modificados para administración oral de tal manera que son resistentes a la digestión por los ácidos estomacales. Los polipéptidos de la presente invención también se extienden a péptidos biológicamente equivalentes que difieren de una porción de la secuencia de los polipéptidos de la presente invención mediante sustituciones de aminoácidos conservadores tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3. Tal como se utiliza aquí, el término "sustituciones de aminoácidos conservadoras" o "sustituciones conservadoras" se refieren a la sustitución de un aminoácido por otro en una localización dada en un péptido de GluR CT (por ejemplo, tal como los definidos en la Tabla I, fórmula I, o fórmula A, o en secuencias homólogas encontradas en el terminal C de la subunidades GluR2, GluR3 o GluR4, del receptor de AMPA), cuando la sustitución puede hacerse sin pérdida sustancial de la función relevante. Al hacer tales cambios, la sustitución de residuos de aminoácidos similares puede hacerse sobre la base de una similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral, por ejemplo, su tamaño, carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad y similares, y tales sustituciones pueden ser probadas en cuanto a su efecto sobre la función del péptido mediante pruebas de rutina.

Tal como se utiliza aquí, el término "aminoácidos" significa aquellos L-aminoácidos encontrados comúnmente en proteínas de origen natural, D-aminoácidos tales como aminoácidos cuando han sido modificados. De acuerdo con lo anterior, los aminoácidos pueden incluir, por ejemplo: ácido 2-aminoadípico; ácido 3-aminoadípico; beta-alanina; ácido beta-aminopropiónico; ácido 2-aminobutírico; ácido 4-aminobutírico; ácido piperidínico; ácido 6-aminocaproico; ácido 2-aminoheptanoico; ácido 2-aminoisobutírico; ácido 3-aminoisobutírico; ácido 2-aminopimélico; ácido 2,4

diaminobutírico; desmosina; ácido 2,2'-diaminopimélico; ácido 2,3-diaminopropiónico; N-Etilglicina; N-Etilasparagina; Hidroxilisina; alo-Hidroxilisina; 3-Hidroxiprolina; 4-Hidroxiprolina; Isodesmosina; alo-Isoleucina; N-Metilglicina; sarcosina; N-Metilisoleucina; 6-N-metil-lisina; N-Metilvalina; Normalina; Norleucina; y Ornitina.

5 Las sustituciones conservadas de aminoácidos pueden hacerse cuando un residuo de aminoácidos es sustituido por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar (por ejemplo, dentro de un valor de más o menos 2.0, o más o menos 1.5, o más o menos 1.0, o más o menos 0.5), donde el siguiente puede ser un aminoácido que tenga un índice hidropático de aproximadamente -1.6 tal como Tyr (-1.3) o Pro (-1.6) y son asignados a residuos de aminoácidos (como se detalla en la Patente de los Estados Unidos No. 4,554,101, incorporada aquí como referencia): Arg (+3.0); Lys (+3.0); Asp (+3.0); Glu (+3.0); Ser (+0.3); Asn (+0.2); Gln (+0.2); Gly (0); Pro (-0.5); Thr (-0.4); Ala (-0.5); His (-0.5); Cys (-1.0); Met (-1.3); Val (-1.5); Leu (-1.8); Ile (-1.8); Tyr (-2.3); Phe (-2.5); y Trp (-3.4).

15 Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden hacerse cuando un residuo de aminoácido es sustituido por otro que tiene un índice hidropático similar (por ejemplo, dentro de un valor de más o menos 2.0, o más o menos 1.5, o más o menos 1.0, o más o menos 0.5). En tales realizaciones, cada residuo de aminoácido puede recibir la asignación y el índice hidropático sobre la base de sus características de hidrofobicidad y carga, como sigue: Ile (+4.5); Val (+4.2); Leu (+3.8); Phe (+2.8); Cys (+2.5); Met (+1.9); Ala (+1.8); Gly (-0.4); Thr (-0.7); Ser (-0.8); Trp (-0.9); Tyr (-1.3); Pro (-1.6); His (-3.2); Glu (-3.5); Gln (-3.5); Asp (-3.5); Asn (-3.5); Lys (-3.9); y Arg (-4.5).

20 Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden hacerse utilizando familias de matrices de similitud públicamente disponibles.⁶³⁻⁶⁹ La matriz PAM se basa en recuentos derivados de un modelo evolutivo, mientras que la matriz Blosum utiliza recuentos derivados de bloques altamente conservados dentro de un alineamiento. Un marcador de similitud por encima de cero en cualquiera de las matrices PAM o Blosum puede ser utilizado para hacer sustituciones conservadoras de aminoácidos.

25 Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden hacerse cuando un residuo de aminoácido es sustituido por otro de la misma clase, donde los aminoácidos son divididos en clases no polar, ácido, básico y neutro, como sigue: no polares: Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, Met; ácidos: Asp, Glu; básicos: Lys, Arg, His; neutrales: Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr.

30 Los cambios conservadores de aminoácidos pueden incluir la sustitución de un L-aminoácido por el correspondiente D-aminoácido, por un D-aminoácido conservador, o por una forma de aminoácido de origen natural, codificado no genéticamente, así como una sustitución conservadora de un L-aminoácido. Los aminoácidos codificados no genéticamente de origen natural incluyen beta-alanina, ácido 3-amino-propiónico, ácido 2,3-diamino propiónico, ácido alfa-aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, N-metilglicina (sarcosina), hidroxiprolina, ornitina, citrulina, t-butilalanina, t-butilglicina, N-metilisoleucina, fenilglicina, ciclohexilalanina, norleucina, norvalina, 2-naftilalanina, piridilalanina, 3-benzotienil alanina, 4-clorofenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina, 4-fluorofenilalanina, penicilamina, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, beta-2-tienilalanina, sulfóxido de metionina, homoarginina, N-acetil lisina, ácido 2-amino butírico, ácido 2-amino butírico, ácido 2,4-diamino butírico, p-aminofenilalanina, N-metilvalina, homocisteína, homoserina, ácido cisteico, ácido épsilon-amino hexanoico, ácido delta-amino valérico, o ácido 2,3-diaminobutírico.

40 Los cambios conservadores de aminoácidos incluyen cambios basados en consideraciones de hidrofiliidad o hidrofobicidad, tamaño o volumen, o carga. Los aminoácidos pueden ser caracterizados en general por ser hidrófobos o hidrófilos, dependiendo primariamente de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido. Un aminoácido hidrófobo exhibe una hidrofobicidad mayor de cero, y un aminoácido hidrófilo exhibe una hidrofiliidad de menos de cero, con base en la escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg et al.⁵⁷ Los aminoácidos hidrófobos codificados genéticamente incluyen Gly, Ala, Phe, Val, Leu, Ile, Pro, Met y Trp, y los aminoácidos hidrófilos codificados genéticamente incluyen Thr, His, Glu, Gln, Asp, Arg, Ser, y Lys. Los aminoácidos hidrófobos codificados no genéticamente incluyen t-butilalanina, mientras que los aminoácidos hidrófilos codificados no genéticamente incluyen citrulina y homocisteína.

50 Los aminoácidos hidrófobos o hidrófilos pueden ser subdivididos adicionalmente con base en las características de sus cadenas laterales. Por ejemplo, un aminoácido aromático es un aminoácido con una cadena lateral que contiene al menos un anillo aromático o heteroaromático, el cual puede contener uno o más sustituyentes tales como -OH, -SH, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NO₂, -NO, -NH₂, -NHR, -NRR, -C(O)R, -C(O)OH, -C(O)OR, -C(O)NH₂, -C(O)NHR, -C(O)NRR, etc., en donde R es independientemente (C₁-C₆) alquilo, (C₁-C₆) alquilo sustituido, (C₁-C₆) alquienilo sustituido, (C₁-C₆) alquienilo, (C₁-C₆) alquienilo sustituido, (C₅-C₂₀) arilo, (C₅-C₂₀) arilo sustituido, (C₆-C₂₆) alquiarilo, (C₆-C₂₆) alcarilo sustituido, heteroarilo de 5-20 miembros, heteroarilo de 5-20 miembros sustituido, alq-heteroarilo de 6-26 miembros o alqheteroarilo sustituido de 6-26 miembros. Los aminoácidos aromáticos codificados genéticamente incluyen Phe, Tyr, y Trp, mientras que los aminoácidos aromáticos codificados no genéticamente incluyen fenilglicina, 2-naftilalanina, beta-2-tienilalanina, ácido 1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-3-carboxílico, 4-clorofenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina, y 4-fluorofenilalanina.

Un aminoácido apolar es un aminoácido hidrófobo con una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico y que

tiene enlaces en los cuales un par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene en general igualmente para cada uno de los dos átomos (esto es, la cadena lateral no polar). Los aminoácidos apolares codificados genéticamente incluyen Gly, Leu, Val, Ile, Ala, y Met, mientras que los aminoácidos apolares codificados no genéticamente incluyen ciclohexilalanina. Los aminoácidos apolares pueden ser subdivididos adicionalmente para incluir aminoácidos alifáticos, el cual es un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral hidrocarburo alifática. Los aminoácidos alifáticos codificados genéticamente incluyen Ala, Leu, Val, e Ile, mientras que los aminoácidos alifáticos codificados no genéticamente incluyen norleucina.

Un aminoácido polar es un aminoácido hidrofílico con una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene un enlace en el cual el par de electrones compartidos en común por dos átomos es mantenido más cercanamente por uno de los átomos. Los aminoácidos polares codificados genéticamente incluyen Ser, Thr, Asn, y Gln, mientras que los aminoácidos polares codificados no genéticamente incluyen citrulina, N-acetil lisina y sulfóxido de metionina. Un aminoácido ácido es un aminoácido hidrofílico con un valor pKa de cadena lateral de menos de 7. Los aminoácidos ácidos típicamente tienen cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ión hidrógeno. Los aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen Asp y Glu. Un aminoácido básico es un aminoácido hidrofílico con un valor de pKa de la cadena lateral de más de 7. Los aminoácidos básicos tienen típicamente cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación del ion hidronio. Los aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen Arg, Lys, y His, mientras que los aminoácidos básicos codificados no genéticamente incluyen los aminoácidos no cíclicos ornitina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico, y homoarginina.

Se hará evidente para una persona experimentada en el arte que las clasificaciones anteriores no son absolutas y que un aminoácido puede ser clasificado en más de una categoría. Además, los aminoácidos pueden ser clasificados con base en el comportamiento conocido y o en propiedades químicas, físicas o biológicas características con base en ensayos especificados o en comparación con aminoácidos identificados previamente. Los aminoácidos también pueden incluir unidades estructurales disfuncionales que tengan cadenas laterales similares a aminoácidos.

Los cambios conservadores también pueden incluir la sustitución de una unidad estructural químicamente derivada para un residuo no derivado, por ejemplo, la reacción de un grupo lateral funcional de un aminoácido. Así, estas sustituciones pueden incluir compuestos cuyos grupos amino libres hayan sido derivados a clorhidratos de amina, grupos t-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoxy, grupos t-butilocarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. De manera similar, los grupos carboxilo libres pueden ser derivados para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas, y las cadenas laterales pueden ser derivadas para formar derivados O-acilo o O-alquilo para grupos hidroxilo libres o N-im-bencilhistidina para el nitrógeno imidazol de la histidina. Los análogos de péptidos también incluyen aminoácidos que han sido alterados químicamente, por ejemplo, por metilación, por amidación del aminoácido terminal en C mediante una alquilamina tal como etilamina, etanolamina o etilendiamina, o acilación o metilación de una cadena lateral de un aminoácido (tal como la acilación del grupo amino épsilon de la lisina). Los análogos de péptido también pueden incluir el reemplazo del enlace amida en el péptido con una amida sustituida (por ejemplo, grupos de la fórmula $-C(O)-NR$, donde R es (C₁-C₆) alquilo, (C₁-C₆) alqueno, (C₁-C₆) alquino, (C₁-C₆) alquilo sustituido, (C₁-C₆) alqueno sustituido, o (C₁-C₆) alquino sustituido) o isómeros de un enlace amida (por ejemplo, $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$ (cis y trans), $-C(O)CH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, o $-CH_2SO-$).

El compuesto puede estar enlazado covalentemente, por ejemplo, por polimerización o conjugación, para formar homopolímeros o heteropolímeros. Pueden utilizarse espaciadores y enlazantes, compuestos típicamente de moléculas neutras pequeñas, tales como aminoácidos que no están cargados bajo condiciones fisiológicas. Los enlaces pueden ser logrados en una serie de formas. Por ejemplo, los residuos de cisteína pueden ser agregados a los terminales peptídicos, y péptidos múltiples pueden ser enlazados covalentemente mediante oxidación controlada. Alternativamente, algunos agentes heterobifuncionales, tales como agentes formadores de disulfuro/amida o agentes formadores de tioéter/amida pueden ser usados. El compuesto también puede ser enlazado a otro compuesto que pueda modular la apoptosis neuronal, la endocitosis del receptor de AMPA, la plasticidad sináptica, el aprendizaje o la memoria, o el abuso o adicción a sustancias, etc. El compuesto también puede ser constreñido como por ejemplo, para tener porciones cíclicas.

Los péptidos o análogos de péptidos pueden ser sintetizados por técnicas químicas estándar, por ejemplo, por síntesis automatizado utilizando metodología de síntesis en fase de solución o sólida. Hay sintetizadores de péptidos automatizados comercialmente disponibles y utilizan técnicas bien conocidas en el arte. Los péptidos y análogos de péptidos también pueden ser preparados utilizando tecnología de ADN recombinante usando métodos estándar como los descritos, por ejemplo, en Sambrook, et al.⁵⁸ o Ausubel et al.⁵⁹ En general, los compuestos candidatos son identificados a partir de genotecas grandes de productos naturales o sintéticos (o semisintéticos) extractos o bibliotecas químicas de acuerdo con métodos conocidos en el arte. Los experimentados en el campo del descubrimiento y desarrollo de fármacos entenderán que la fuente precisa de extractos o compuestos de prueba no es crítica para los métodos de la invención. De acuerdo con lo anterior, virtualmente cualquier número de extractos o compuestos químicos pueden ser cribados utilizando los métodos de ejemplo descritos aquí. Ejemplos de tales

extractos o compuestos incluyen, pero no se limitan a, extractos basados en plantas, fúngicos, procariotas o animales, caldos de fermentación y compuestos sintéticos, así como la modificación de compuestos existentes. Hay también disponibles numerosos métodos para generar síntesis aleatoria o dirigida (por ejemplo, semisíntesis o síntesis total) de cualquier número de compuestos químicos, incluyendo, pero no limitándose a, compuestos basados en sacáridos, lípidos, péptidos y ácidos nucleicos. Hay disponibles bibliotecas de compuestos sintéticos. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales son comercialmente disponibles a partir de una serie de fuentes, incluyendo Biotics (Sussex, Reino Unido), Xenova (Slough, Reino Unido), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, FL, Estados Unidos de América), y PharmaMar, MA, Estados Unidos de América. Además, las genotecas producidas de manera natural y sintética, por ejemplo, de polipéptidos neuronales, se producen, si se desea, de acuerdo con métodos conocidos en el arte, por ejemplo, por métodos de extracción y fraccionamiento estándar. Adicionalmente, si se desea, cualquier genoteca o compuesto es modificado fácilmente utilizando métodos químicos, físicos o bioquímicos estándar.

Cuando se encuentra que un extracto crudo modula la apoptosis neuronal, la endocitosis del receptor de AMPA, la plasticidad sináptica, el aprendizaje o la memoria, o el abuso o adicción a sustancias, etc., es necesario el fraccionamiento adicional del extracto candidato positivo para aislar constituyentes químicos responsables del efecto observado. Así, la meta del proceso de extracción, fraccionamiento y purificación es la caracterización e identificación cuidadosa de una entidad química dentro del extracto crudo que tenga actividades de apoptosis neuronal, endocitosis del receptor de AMPA, plasticidad sináptica, etc. Los mismos ensayos descritos aquí para la detección de actividades en mezclas de compuestos pueden ser utilizados para purificar el componente activo y para probar los derivados del mismo. Los métodos de fraccionamiento y purificación de tales extractos heterogéneos son conocidos en el arte. Si se desea, los compuestos que demuestran ser agentes útiles para tratamiento son modificados químicamente de acuerdo con métodos conocidos en el arte. Los compuestos identificados por tener valor terapéutico pueden ser analizados subsecuentemente utilizando un modelo de mamífero, o cualquier otro modelo animal para daño neuronal, disfunción neural, plasticidad sináptica, aprendizaje o memoria, o abuso o adicción a sustancias.

Composiciones farmacéuticas, dosificaciones y administración

Los compuestos de la invención pueden ser provistos solos o en combinación con otros compuestos (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, péptidos o análogos de péptidos), en la presencia de un liposoma, un adyuvante o cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable, en una forma adecuada para administración a humanos, si se desea, el tratamiento con un compuesto de acuerdo con la invención, puede ser combinado con terapias más tradicionales y existentes para el daño neurológico, plasticidad sináptica, aprendizaje o memoria, o abuso de sustancias. Por ejemplo, los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser administrados como una terapia de combinación con otros tratamientos tales como inhibidores de radicales libres para maximizar la supervivencia neuronal; como terapia complementaria a la profilaxis anticoagulante en sujetos que experimentan fibrilación atrial o se consideran en riesgo de apoplejía⁸⁶. Los compuestos pueden ser administrados en ventanas terapéuticas específicas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los compuestos pueden ser administrados aproximadamente 3 horas después de la aparición de la isquemia.

Se describe que los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser provistos en fusión con un péptido heterólogo para facilitar la translocación de los compuestos a través de las membranas celulares, como por ejemplo, se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,348,185; concedida a Pivnicka-Worms; la Publicación de la Patente de los Estados Unidos US 2003/0229202 (Guo et al.), o la Publicación PCT WO 00/62067 (Dowdy), Becker-Hapak et al.⁸⁵, o Kabouridis¹¹⁴. En algunas realizaciones, los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser provistos en combinación con el péptido portador PEP 1 o con un péptido portador que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser provistos en células madre, por ejemplo, células madre neuronales, modificadas para expresar el péptido. Las células y vectores adecuados para tal administración incluyen vectores virales tales como adenovirus, virus adenoasociados, o virus de herpes simplex^{121,122}.

La práctica farmacéutica convencional puede ser empleada para proveer formulaciones o composiciones adecuadas para administrar los compuestos a pacientes que sufren de o son presintomáticos de daño neurológico o disfunción neural. Los compuestos pueden ser administrados sistémicamente o pueden ser administrados directamente al sistema nervioso central u otra región de daño neurológico. Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser provistos en una forma adecuada para administración a través de la barrera sangre-cerebro. Puede emplearse cualquier ruta apropiada de administración, por ejemplo, administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol u oral. Las formulaciones farmacéuticas pueden estar en la forma de soluciones o suspensiones líquidas; para administración oral, las formulaciones pueden estar en la forma de tabletas o cápsulas; y para formulaciones intranasales, en la forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.

Los métodos bien conocidos en el arte para hacer formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington's

Pharmaceutical Sciences" (19th edition), ed. A. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa. Las formulaciones para administración parenteral, por ejemplo, pueden contener excipientes, agua estéril o solución salina, polialquilen glicoles tales como polietilen glicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Pueden utilizarse polímeros láctidos, copolímero láctido/glicólico o copolímeros polioxietilen-polioxipropileno biodegradables biocompatibles para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para los compuestos moduladores incluyen partículas de copolímeros de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser soluciones acuosas que contiene, por ejemplo, polioxietilen-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o pueden ser soluciones oleosas para la administración en la forma de gotas nasales o como un gel.

Para composiciones terapéuticas o profilácticas, los compuestos se administran a un individuo en una cantidad suficiente para detener o hacer disminuir la degeneración o apoptosis celular, o para potenciar o mantener la plasticidad sináptica, dependiendo del trastorno. Una "cantidad efectiva" de un compuesto de acuerdo con la invención incluye una cantidad terapéuticamente efectiva o una cantidad profilácticamente efectiva. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el efecto terapéutico deseado, tal como una reducción de la degeneración o apoptosis celular, o para potenciar la plasticidad sináptica. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosificación pueden ser ajustados para proveer la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es aquella en la cual cualquier efecto tóxico o nocivo del compuesto es contrarrestado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesario para alcanzar el resultado profiláctico deseado, tal como la inhibición de la degeneración o apoptosis celular, o para potenciar la plasticidad sináptica. Típicamente, se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa temprana de la enfermedad, de tal manera que una cantidad profilácticamente efectiva pueda ser menor que una cantidad terapéuticamente efectiva. Un rango preferido para cantidades terapéutica o profilácticamente efectiva de un compuesto puede ser 0.1 nM-0.1 M, 0.1 nM-0.05 M, 0.05 nM-15 μ M o 0.01 nM-10 μ M.

Hay que anotar que los valores de dosificación pueden variar con la severidad de la condición que va a ser aliviada o con la ruta de administración seleccionada. Por ejemplo, para administración oral, los valores de dosificación pueden ser más altos que para administración intravenosa o intraperitoneal. Para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos pueden ser ajustados con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Los rangos de dosificación fijados aquí son solamente de ejemplo y no limitan los rangos de dosificación que pueden ser seleccionados por practicantes médicos. La cantidad de compuesto activo en la composición puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo. Los regímenes de dosificación pueden ser ajustados para proveer la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, puede administrarse un bolo individual, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede ser reducida o incrementada proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Puede ser ventajoso formular composiciones parenterales en formas unitarias de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación.

En el caso de formulaciones para vacuna, puede proveerse una cantidad con efecto inmunogénico de un compuesto de la invención, solo o en combinación con otros compuestos, con un adyuvante, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund o hidróxido de aluminio. El compuesto puede estar enlazado con una molécula portadora, tal como albumina de suero bovino o hemocianina de lapa para potenciar la inmunogenicidad.

En general, los compuestos de la invención deberían ser utilizados sin causar una toxicidad sustancial. La toxicidad de los compuestos de la invención puede ser determinado utilizando técnicas estándar, por ejemplo, probando en cultivos de células o animales experimentales y determinando el índice terapéutico, esto es, la relación entre la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la LD100 (la dosis letal para el 100% de la población). En algunas circunstancias sin embargo, como en el caso de condiciones de enfermedad severa, puede ser necesario administrar excesos sustanciales de las composiciones.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Cultivos primarios de neuronas de hipocampo

Los hipocampos fueron retirados rápidamente de ratas Sprague-Dawley E18 embrionarias y reunidos antes de la trituración. Las suspensiones de células de hipocampo fueron sembradas sobre placas de cultivo o cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-D-lisina y cultivados en medio neurobasalTM (Invitrogen) durante 14 días *in vitro* (DIV). Se retiró el medio de neuronas maduras 14 DIV y se reemplazó con NMDA 100 μ M más glicina 10 μ M durante 1 hora a 37°C antes de restaurar las neuronas al medio de cultivo definido. Veinticuatro horas después de la aplicación de

NMDA/glicina, las neuronas fueron procesadas utilizando ensayos de muerte celular. Las respuesta de entre $[Ca^{2+}]_i$ inducido por NMDA fueron evocadas y medidas utilizando métodos descritos previamente²⁶.

Ensayos de muerte celular

5 Cuantificación de la apoptosis: La apoptosis inducida por NMDA fue cuantificada utilizando un Cell Death Detection Elisa Plus Kit (Roche Applied Sciences), el cual se basa en la determinación *in vitro* de fragmentos de ADN citoplasmático asociados con histona, o utilizando la adición mediada por TdT de 11-dUTP biotinilado a los extremos 3'-OH libres del ADN. Las lecturas de absorbancia para ambos ensayos fueron llevados a cabo utilizando un lector de microplacas.

10 Tinción con yoduro de propidio (PI) de los núcleos: Después de la inducción de la apoptosis, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%/sacarosa al 4% durante 10 minutos seguidos por acetona enfriada en hielo durante 1 minuto, y luego se tiñeron con 20 mg/ml de PI en PBS de Dulbecco durante 30 minutos. Los cubreobjetos teñidos fueron montados sobre portaobjetos de vidrio y observados con un microscopio de fluorescencia Leica para identificar los núcleos condensados. Las células con núcleos condensados fueron contadas como apoptóticas y el porcentaje de células apoptóticas con respecto al número total de células fue calculado para dar un análisis semicuantitativo, expresado como porcentaje de apoptosis.

Tratamiento de células con péptidos

20 Un péptido corto (YKEGYNVYGIIE) correspondiente a los residuos de aminoácidos 869 a 879 del terminal C de GluR2 (R2-CT) fue sintetizado e incubado con una proteína portadora (Pep-1)²³ a una relación de 1:20 en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM, Gibco) a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de Co2 durante 30 minutos para permitir la formación del complejo R2-CT/Pep-1. Las neuronas de hipocampo (DIV 12-14) fueron superpuestas con el complejo preformado para alcanzar una concentración de R2-CT final de 1 μ M y se incubaron adicionalmente durante 1 hora antes de comenzar el experimento.

Ensayos de tráfico de receptor

25 Ensayo celular por ELISA: La cuantificación de los receptores de AMPA o NMDA de superficie celular fue llevado a cabo mediante un ensayo celular de ELISA colorimétrico esencialmente como se describió previamente¹⁴. En resumen, las neuronas de hipocampo fueron tratadas con NMDA 100 μ M más glicina 10 μ M durante 1 hora y luego fijadas con paraformaldehído al 4%/sacarosa al 4% en PBS durante 10 minutos. La mitad de las células en cada condición de tratamiento fue permeabilizada entonces con Triton-X 100 al 0.1% durante 5 minutos. Los receptores sobre la superficie de la membrana del plasma y el conjunto celular total fueron determinados incubando las células con anticuerpos monoclonales contra los dominios extracelulares de GluR2 o NR1 (Chemicon, 1 μ g/ml) durante la noche a 4°C, seguido por incubación con anticuerpo secundario de IgG anti-ratón conjugado con HRP (1:1000, Amersham Life Sciences) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado extensivo con PBS, las células fueron incubadas con sustrato OPD (Sigma) durante aproximadamente 10 minutos. Las reacciones fueron detenidas con 0.2 volúmenes de HCl 3N, y se leyó la observancia a 492 nm utilizando un lector de microplacas espectrofotométrico.

40 Ensayo de endocitosis de receptor de transferrina: Para establecer el efecto de los inhibidores de la endocitosis sobre la endocitosis del receptor de transferrina, se incubaron neuronas de hipocampo con 2 mg/ml de transferrina conjugada con Alexa-A488 (Molecular Probes) durante 30 minutos a 37°C en la presencia o ausencia de inhibidores de endocitosis. Los receptores internalizados fueron observados entonces con un microscopio de fluorescencia Leica.

Plásmidos de ADNc y transfección celular

45 Los ADNc de la subunidad del receptor de GluR1 y GluR2 etiquetadas con HA de rata han sido descritas previamente¹⁴. Los constructos de mutantes por eliminación o truncamiento interno del carboxilo de HA-GluR2 fueron hechos por métodos de PCR estándar. El mutante HA-GluR23Y-3A fue hecho utilizando un Quick-Change Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Las células HEK293 (ATCC) fueron transfectadas utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio. De treinta y seis a cuarenta ocho horas después de la transfección, las células fueron lavadas con solución de registro extracelular (ECS en mM: NaCl 140, glucosa al 33, HEPES 25, KCl 5.4, CaCl2 1.3; pH 7.4, 320 mOsm) y se incubaron en ECS durante al menos una hora (con privación de suero). Para tratamiento con insulina, las células fueron incubadas con ECS suplementado con insulina humana recombinante 0.5 μ M (Sigma) durante 10 minutos, después de lo cual las células fueron procesadas para inmunohistoquímica y ensayos colorimétricos o sometidas a lisis en regulador RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y Triton X-100 al 1%) para inmunoprecipitación como se describe más adelante.

Clonación, expresión y purificación de proteínas de fusión GST

GST-GluR23Y y GST-GluR23A fueron construidas subclonando fragmentos de PCR correspondientes en vectores pGEX 4T-1. Las proteínas de fusión GST fueron expresadas en *E. coli* DH5 α y purificadas a partir de los lisados bacterianos de acuerdo con el protocolo del fabricante (Pharmacia). Los productos fueron dializados en PBS y concentrados utilizando columnas Microcon-10 (Amicon) para la aplicación intracelular durante los registros de la célula entera.

Microscopia confocal inmunofluorescente

Las células HEK293 fueron sembradas sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina y puestos en placas de cultivo de 35 mm y transfectados con 2 μ g del plásmido de interés. Para los ensayos de expresión del receptor de superficie celular, las células a las 48 horas post-transfección fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos. Los receptores de AMPA en superficie fueron marcados primero con anticuerpo anti-HA monoclonal (1:2000, Babco, Berkeley, CA) y visualizados con un anticuerpo de IgG anti-ratón conjugado con FITC (1:500, Sigma). Para el ensayo de internalización del receptor de AMPA en superficie, las células HEK293 transfectadas con constructos de GluR2 etiquetados con HA fueron incubadas vivas a 4°C con anticuerpo anti-HA monoclonal (10: g/ml) durante 1 hora a los receptores de AMPA de superficie marcados. Las células fueron incubadas entonces a 37°C en ECS suplementado con o sin insulina 0.5 μ M durante 10 minutos antes de una incubación adicional de 20 minutos en ECS para permitir la internalización constitutiva o regulada de los receptores marcados. Después de un período de fijación de 10 minutos con paraformaldehído al 4% sin permeabilización, los receptores remanentes en la superficie de la membrana del plasma fueron teñidos con anticuerpos IgG anti-ratón conjugados con FITC. Los receptores de superficie celular internalizados fueron marcados subsecuentemente con anticuerpos IgG anti-ratón conjugados Cy3 después de la permeabilización de las células como lo describe Man et al.¹⁴

Ensayos colorimétricos

Los ensayos colorimétricos fueron llevados a cabo esencialmente como se informo previamente.¹⁴

Inmunoprecipitación e inmunoprecipitación Western

La inmunoprecipitación y la inmunoprecipitación Western fueron llevadas a cabo esencialmente como se reporto previamente. Las proteínas del córtex cerebral, secciones de hipocampo, neuronas de hipocampo cultivadas o células HEK293 transfectadas fueron solubilizadas en regulador RIPA que contenía bien SDS al 1% (más 5 minutos de ebullición; condiciones de desnaturalización) o DOC al 1% (condiciones no desnaturalizantes). Para la inmunoprecipitación, se incubaron 500 μ g de proteína de estos lisados de tejido con sus respectivos anticuerpos en 500 μ l de regulador RIPA durante 4 horas a 4°C. Se agregó la proteína A-sefariosa a la mezcla y se incubó durante 2 horas adicionales. El complejo fue aislado por centrifugación y lavado tres veces. Las proteínas eluidas de las perlas de sefariosa fueron sometidas a SDS-PAGE e inmunoprecipitación utilizando sus anticuerpos respectivos. Para el resonado secuencial de las mismas manchas, las membranas fueron desprendidas de los anticuerpos primarios y secundarios iniciales y sometidas a inmunoprecipitación con otro anticuerpo. Las manchas fueron desarrolladas utilizando detección potenciada con quimioluminiscencia (Amersham). Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas utilizando el software Scion Image PC.

Cultivos, transfección y ensayos de internalización basados en fluorescencia de neuronas de hipocampo

Como en Lee et al., 2002⁴⁰; Passafaro et al., 2001.⁴⁹

Registro electrofisiológico

Se prepararon secciones de hipocampo (400 μ m de espesor) a partir de ratas Sprague-Dawley con edades de 16-26 días después del nacimiento y se perfusionaron a temperatura ambiente con fluido cerebroespinal artificial que contenía (mM): NaCl 126, NaHCO₃ 26, glucosa 10, KCl 3, KH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1, y CaCl₂ 1, saturado con 95% O₂/5% CO₂¹⁴. Las pipetas de registro (4-5 M Ω) fueron llenadas con solución que contenía (mM): CsCl 135, HEPES 10, QX-314 5, Mg-ATP 4, MgCl₂ 2, EGTA 0.5, GTP 0.2 y CaCl₂ 0.1, pH 7.4, 310 mOsm. El registro de células enteras de neuronas CA1 y la inducción de LFS-LTD fueron llevados a cabo como se describió previamente.¹⁴

Análisis estadístico

Las pruebas t de Student fueron utilizados siempre que se compararon muestras intraexperimento. Para comparaciones cruzadas o análisis de datos entre experimentos todos los valores fueron sometidos primero a ANOVA de una vía y todos los grupos fueron comparados contra valores basales de control. Los valores no fueron significativos estadísticamente a $F > 0.5$. Los grupos que fueron encontrados como estadísticamente significativos fueron comparados individualmente utilizando la prueba t de Dunnett. Todos los análisis se hicieron utilizando valores normalizados en el paquete de estadística Statistica (Statsoft).

Cultivos neuronales primarios

El córtex fue seccionado a partir de los 18 días en embriones *in utero* Wistar y fue tratado con tripsina-EDTA durante 15 minutos a 37°C. Las células fueron lavadas entonces 3 veces y trituradas hasta obtener una suspensión celular sencilla. Las neuronas con glia fueron entonces sembradas a una densidad de $\sim 2.5 \times 10^5$ neuronas/pozo en placas de cultivo de tejido de 12 pozos recubiertas con poli-D-lisina. Las células fueron cultivadas entonces durante 24-48 horas en medio de siembra (Gibco Neurobasal™, FBS al 1%, suplemento B-27 al 2%, L-glutamato 0.5 mM, y ácido glutámico 25 μ M), después de lo cual las células fueron tratadas con medio de mantenimiento neurobasal™ (NMM: Gibco Neurobasal™ Medio + L-glutamato .5 mM, suplemento B-27 al 2%) con 5-Fluoro-2'-desoxiuridina 10 μ M (FDU) para enriquecer el cultivo para las neuronas ($\sim 85\%$). Después de un cultivo de 24h-48h en FDU, las células fueron mantenidas en NMM cambiado cada 4 días.

Generación de péptidos

Tat-GluR2-3Y, Tat-GluR2-3A, y Tat-GluR2-3Y conjugado con dansilo fueron todos sintetizados sobre un sintetizador de péptidos ABI 433A (NAPS).

Consumo neuronal del péptido Tat-GluR2-3Y marcado con dansilo

Neuronas corticales primarias del día 13 *in vitro* (DIV) a una densidad de 2.5×10^5 /pozo en placa de 12 pozos fueron lavadas una vez con solución extracelular (ECS: NaCl 140 mM, KCl 5.4 mM, CaCl_2 1.3 mM, HEPES 10 mM, D-glucosa 33 mM, pH 7.4) y luego se agregó 1 mL sin contenido de péptido (control) o Tat-GluR2-3Y marcado con dansilo 1 μ M a los pozos. Después de 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, o 60 minutos de incubación a 37°C los pozos fueron lavados dos veces con ECS y sometidos a generación de imágenes utilizando microscopia de fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 550 nm.

Cuantificación de endocitosis de AMPAR en respuesta al tratamiento con NMDA

Utilizando ELISA celular, la cantidad de expresión de AMPAR intracelular versus la extracelular se midió permitiendo la cuantificación de la endocitosis de AMPAR en respuesta al ataque con NMDA. Las neuronas DIV 12-13 fueron lavadas una vez con ECS a temperatura ambiente. Se agregó 1 mL de NMM con o sin el péptido Tat-GluR2-3Y o Tat-GluR2-3A 1 μ M a los pozos y las células fueron incubadas durante 1 hora a 37°C. El medio fue aspirado entonces y se agregó 1 mL de ECS con diferentes combinaciones del péptido (Tat-GluR2-3Y o Tat-GluR2-3A 1 μ M) y de tratamiento con NMDA-glicina (NMDA 50 μ M + glicina 10 μ M) se agregó a los pozos y las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pozos fueron lavados entonces una vez con ECS y luego fijados inmediatamente con 0.5 mL de fijador frío (paraformaldehído al 4%, y sacarosa al 4% en PBS) durante 10 minutos con agitación. Las células fueron lavadas entonces 3 veces con 1 mL de PBS. La mitad de los pozos para cada grupo de tratamiento se dejó impermeabilizado (representando una expresión de AMPAR extracelular) y la mitad fue permeabilizada (representando la expresión de AMPAR intracelular y extracelular total) con 0.5 mL de Triton X 100 al 0.2% en PBS durante 10 minutos con agitación seguida por 3 lavados con PBS. Los pozos fueron bloqueados entonces con suero de cabra al 2% en PBS durante 1 hora. Después de bloquear se aspiró el regulador de bloqueo y se agregaron 400 μ L de anticuerpo del ratón anti-rata de GluR2 en GluR2 de terminal N 1 μ g/mL en suero de cabra al 2% (clon: 6C4, Chemicon) o 400 μ L de regulador de bloqueo (controles sin anticuerpo primario) agregados a los pozos y las placas fueron incubadas durante la noche con agitación a 4°C. Las placas fueron lavadas entonces 3 veces con PBS y se agregaron 400 μ L de anticuerpo de IgG2a anti-ratón de oveja conjugado con peroxidasa de rábano 1/1000 en suero de cabra al 2% y las placas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas fueron lavadas entonces 3 veces con PBS, luego se agregó una solución de 1 mL de OPD (0.4 mg/mL de o-fenilendiamina, 0.4 mg/mL de peróxido de urea hidrógeno, y regulador fosfato-citrato 50 mM, Sigma) y las placas fueron incubadas durante 5-10 minutos a temperatura ambiente con agitación. La reacción de la peroxidasa fue terminada mediante la adición de 200 μ L de HCl 3N. La absorbancia a 492 nm fue leída utilizando un lector de placas μ Quant (Bio-Tek Instruments Inc.). Los datos fueron analizados sustrayendo primero los valores de absorbancia de los controles no primarios de las otras muestras. El porcentaje de expresión en superficie de AMPAR fue expresado entonces como una relación de las muestras no permeabilizadas a las muestras permeabilizadas. Los experimentos repetidos individuales fueron normalizados entonces y los grupos de tratamiento fueron comparados utilizando ANOVA seguidos por la prueba de Tukey-Kramer, ($p = 0.05$).

Cuantificación de apoptosis neuronal en privación de oxígeno y glucosa (OGD)

Se sometieron neuronas a 60 minutos de privación de oxígeno y glucosa y la apoptosis fue cuantificada utilizando un ELISA con mono- y oligonucleosoma. Las neuronas DIV 13 sembradas a una densidad de 2.5×10^5 /pozo en placas de 12 pozos fueron lavadas una vez con ECS, y las células fueron pretratadas durante 60 minutos con o sin Tat-GluR2-3Y 1 μ M en NMM. Las células fueron lavadas entonces dos veces con regulador OGD (NaCl 121 mM, KCl 5 mM, piruvato de Na 1 mM, CaCl_2 1.8 mM, NaHCO_3 25 mM, glicina 0.01 mM; pH 7.4) para las muestras de OGD, o

con ECS para las muestras sin OGD. Las muestras sin OGD fueron incubadas entonces durante 25 horas a 37°C en NMM y las muestras con OGD fueron incubadas en regulador de OGD con o sin Tat-GluR2-3Y en una cámara anaerobia a 37°C durante 60 minutos. Las muestras con OGD fueron incubadas entonces durante 24 horas a 37°C en NMM. La apoptosis neuronal fue cuantificada entonces utilizando un kit Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Applied Science) según las instrucciones del fabricante. Se leyó la absorbancia a 405 nm (longitud de onda de referencia, 490 nm) utilizando un lector de placa μ Quant (Bio-Tek Instruments Inc.). Los experimentos repetidos individuales fueron normalizados entonces y se compararon los grupos de tratamiento utilizando ANOVA seguido por la prueba de Tukey-Kramer ($p = 0.05$).

Infiltración con Tat-GluR2-3Y de tejido cerebral

- 10 Dos ratones C57-Black/6 macho adultos con pesos de ~22 g recibieron una inyección intraperitoneal bien de solución salina o de 30 nmol/g de Tat-GluR2-3Y marcado con dansilo. Los ratones fueron sacrificados a las 2 horas y los cerebros fueron retirados y congelados inmediatamente a -80°C. Se cortaron secciones de la corona de 40 micrones con un criostato y se visualizaron con microscopia de fluorescencia.

Modelo de isquemia focal transiente

- 15 El procedimiento fue llevado a cabo esencialmente como se describió previamente (70). En resumen, ratas Sprague-Dawley macho adultas entre 280 y 320 g (peso tras 20 horas de ayuno) fueron anestesiadas con una mezcla inhalada de 4% de isoflurano, en óxido nitroso balanceado con oxígeno al 30%, y mantenidas con isoflurano al 1.5%. Las secreciones bronquiales fueron minimizadas administrando 0.5 mg/kg de atropina intraperitonealmente. Alternativamente, 3 nmoles/g de Tat-GluR2-3Y en solución salina, 3 nmoles/g Tat-GluR2-3A en solución salina, o solución salina solamente fueron administrados 1 hora después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCA), a través de un catéter PE-50 de la vena femoral. El experimento fue ciego en cuanto a la identidad de los grupos de tratamiento para todas las cirugías y experimentos corriente abajo. Bajo un microscopio de disección, la arteria carótida común (CCA), la arteria carótida externa (ECA), y la arteria carótida interna (ICA) fueron expuestas y diseccionadas. Las arterias lingual y maxilar terminales fueron cauterizadas y la arteria pterigopalatina fue ligada entonces con una sutura de seda 5-0. Después de este punto la ICA fue la única ramificación extracraneal remanente de la CCA. La ECA fue entonces cortada parcialmente cerca a la ligadura rostral y se insertó un monofilamento de nylon 3-0 de 30 mm con una punta de cabeza redondeada en la ECA y se avanzó hasta después de la bifurcación CCA. La ECA fue entonces cortada completamente, movilizándolo el tocón de ECA que contenía la sutura de nylon. La estructura de nylon fue luego retorcida de tal manera que su punta estaba de cara a la ICA y la sutura de nylon fue avanzada entonces suavemente aproximadamente 20 mm hasta que se encontró resistencia. En este punto la sutura alcanzó el origen de la MCA y la arteria cerebral anterior bloqueando completamente el flujo de sangre al territorio de la MCA. La herida fue entonces cerrada por sutura con sutura de seda y el animal fue despertado desconectando el isoflurano. Se midió la temperatura rectal y la presión sanguínea con un manguito de cola antes del tratamiento, 15 minutos después de la inyección, 50 minutos después de la inyección y 15 minutos después de la oclusión de la MCA. Se midieron el pH, O₂ y CO₂ en plasma con un analizador de gas sanguíneo RapidlabTM 348 (Bayer Diagnostics) en algunos animales para asegurar que las ratas de flujo de gas utilizadas eran apropiadas y produjeron gases sanguíneos reproducibles. El animal recibió entonces un examen neurológico después de 45 minutos de la oclusión de la MCA. Este examen fue utilizado para excluir cualquier animal que no hubiese experimentado oclusión significativa de la MCA. El examen consistió en 10 pruebas con un marcador de déficit máximo de 23 (71). Las pruebas individuales se resumen en la Tabla II.

Tabla II. Resumen de marcador neurológico

Prueba	Descripción	Marcador
Reflejo postural:		
Grado de giro	Grado de rotación del cuerpo hacia el lado pariético cuando se sostiene por la cola.	0-2
Grado de flexión de extremidad anterior	Grado de flexión de una extremidad anterior cuando se sostiene por la cola.	0-2
Perturbaciones en salida	Formación de círculos o desplazamiento hacia el lado pariético, u otras perturbaciones de salida.	0-5
Halado de cola	Movimiento desviado hacia un lado cuando se hala la cola	0-2

Prueba	Descripción	Marcador
Resistencia al empuje	Grado de resistencia lateral al empuje	0-2
Colocación visual:		
Hacia adelante	Presencia de un reflejo de colocación de una extremidad anterior en respuesta a una pista visual hacia adelante.	0-2
Lateral	Presencia de un reflejo de colocación de una extremidad anterior en respuesta a una pista visual lateral.	0-2
Colocación táctil:		
Hacia adelante	Presencia de un reflejo de colocación de extremidad anterior en respuesta a un estímulo táctil sobre la superficie dorsal de la garra.	0-2
Lateral	Presencia de un reflejo de colocación en extremidad anterior en respuesta a un estímulo táctil sobre la superficie lateral de la garra.	0-2
Colocación propioceptiva	Presencia de un reflejo de colocación de extremidad anterior en respuesta a ser sostenida por los cuartos traseros por encima de la superficie.	0-2
Marcador total		0-23

5 El animal fue inducido de nuevo después del examen neurológico y el monofilamento de nylon fue retirado a los 60 minutos después de la aparición de la oclusión retornando el flujo de sangre al territorio de la MCA. El examen neurológico fue llevado a cabo de nuevo en el momento del sacrificio (~24 horas). La cirugía de simulación fue llevada a cabo como oclusión de MCA, sin embargo, el monofilamento de nylon no fue insertado.

Tinción con TTC

10 Las ratas fueron sacrificadas 3 días después de la oclusión de MCA por anestesia profunda seguida por decapitación. El cerebro fue retirado inmediatamente después del sacrificio y colocado en una matriz de cerebro de rata acrílica (Harvard Apparatus) e incubado a -80°C durante 15 minutos. Se cortaron entonces secciones de corona de 1 mm con cuchillas de afeitar y se colocaron a 37°C en solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 2% (TTC, Sigma) en PBS. Las secciones fueron incubadas entonces durante aproximadamente 15 minutos hasta que se desarrolló suficiente color.

Tinción TUNEL

15 En el día 1 después de la MCAo las ratas fueron anestesiadas con 1.5 mL de uretano al 25% y fueron perfusionadas con 100 mL de solución salina al 0.9% seguida por 120 mL de paraformaldehído al 4% en PBS. Los cerebros fueron retirados entonces y almacenados durante la noche a 4°C en paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron transferidos entonces a sacarosa al 30% y azida de sodio al 0.1% en PBS y almacenados a 4°C hasta que los cerebros se hundieron completamente. Los cerebros fueron congelados entonces en hielo seco y se cortaron secciones de corona de 12 micrones con un criostato a -8 mm con respecto al bregma utilizando un método de flotación libre (72). Las secciones fueron montadas entonces sobre láminas de vidrio y teñidas con TMR-TUNEL (marcación terminal del extremo de muesca dUTP mediada por desoxirribonucleótido transferasa [TdT]) (Roche Applied Science) según las instrucciones del fabricante. Las secciones fueron calificadas en cuanto al número de células que se tiñeron en positivo para TMR-TUNEL por campo de visión a una magnificación 10X. Para cada sección los mismos 3 campos a lo largo de la porción lateral del córtex sobre el hemisferio afectado fueron calificadas (el hemisferio afectado fue definido como el lado con la mayor cantidad de apoptosis).

Ejemplo 2: La apoptosis inducida por NMDA requiere la endocitosis del receptor de AMPA

30 Con el fin de inducir apoptosis en cultivos maduros de neuronas de hipocampo de rata (14 DIV+) se trataron células con un ataque moderado de NMDA 100 µM con glicina 10 µM durante 1 hora seguido por recuperación de las células en medio normal para períodos de hasta 24 horas. Como se muestra en la figura 1A, B, el tratamiento con NMDA indujo un incremento dependiente del tiempo en la actividad de la caspasa-3, un indicador bioquímico de la apoptosis neuronal, según se detectó por el ensayo de ELISA de escisión de DEV-pNA. Este incremento en la

actividad de caspasa-3 tuvo un pico entre 12-24 horas después del tratamiento, momento en el cual la mayoría de las neuronas estaban o muriendo o muertas, exhibiendo los hitos de la muerte celular apoptótica, incluyendo el escalamiento de ADN demostrado por electroforesis en gel de ADN extraído (Figura 1C), y la condensación nuclear con procesos de desintegración mostrados por la tinción de núcleos con yoduro de propidio o la intercalación de colorante de ADN, Hoechst 33258 (bisbenzimidaz). El grado de apoptosis neuronal también fue cuantificado por la medición de la escisión internucleosómica de ADN con 11-DUTP (Figura 1E) y ensayos de biotilación con histona (Figura 1F). En contraste, en los cultivos no tratados hubo poca apoptosis detectable bien sea bioquímica o morfológicamente (Figura 1A-F). Adicionalmente, la apoptosis inducida por NMDA fue el resultado de la activación específica de los receptores de NMDA, puesto que fue bloqueada completamente por el antagonista del receptor de NMDA, APV (50 μ M; Figura 1D). Por lo tanto, el tratamiento con NMDA produjo apoptosis neuronal.

Con el fin de determinar el papel de la endocitosis inducida por NMDA en la mediación de la apoptosis neuronal, se examinó primero el efecto de la sacarosa hipertónica, un inhibidor de la endocitosis dependiente de clatrina bien caracterizado que inhibe el ensamblaje de los pozos recubiertos con clatrina^{13,14}. Como se muestra en la Figura 1E, cuando se trataron células con sacarosa hipertónica (0.4 M), antes de la aplicación de NMDA y en su presencia durante 1 hora, se encontró que la apoptosis se reducía dramáticamente. A la vez que la sacarosa hipertónica ha sido utilizada ampliamente como un inhibidor efectivo de la endocitosis mediada por clatrina, puede tener muchas acciones diferentes a la inhibición de la endocitosis. Para establecer adicionalmente un papel esencial de la endocitosis estimulada y la apoptosis inducida por NMDA, también se examinó el efecto de otro inhibidor específico para la endocitosis dependiente de clatrina. El inhibidor es un péptido miristoilado corto derivado de la dinamina que es permeable a la membrana (myr-Dyn). Bloquea el reclutamiento de dinamina a los pozos recubiertos con clatrina por anfifisina, inhibiendo por lo tanto la endocitosis mediada por clatrina¹⁵. En efecto, la incubación de neuronas con myr-Dyn (100 μ M) se encontró efectivo como la sacarosa hipertónica en la reducción de la apoptosis inducida por NMDA (Figura 1E y F). En contraste, los péptidos Dyn de control, ambos no miristoilados (no permeables a la membrana) Dyn (Dyn; Figura 1E) y myr-Dyn mezclados (s-myr-Dyn; Figura 1F) no miristoilados (no permeables en membrana), tuvieron poco efecto. Así, la endocitosis dependiente de clatrina facilitada es necesaria para la apoptosis mediada por el receptor de NMDA. Con el fin de probar si los efectos de la inhibición de la endocitosis eran específicos para la apoptosis inducida por NMDA, se probó a continuación el efecto de estos inhibidores sobre un modelo de apoptosis neuronal bien caracterizado que es inducida por el tratamiento de neuronas con el inhibidor de quinasa estaurosporina (STS; 100 nM, 1 h)¹². Como se muestra en la Figura 1E, se encontró que ambos inhibidores de la endocitosis fallaron en alterar significativamente la apoptosis neuronal inducida por STS. Por lo tanto, la endocitosis mediada por clatrina se requiere específicamente para la apoptosis neuronal inducida por la activación del receptor de NMDA.

Para discernir la posibilidad de que los inhibidores de endocitosis puedan haber evitado la apoptosis neuronal interfiriendo con la función del canal receptor de NMDA, y por lo tanto con el influjo de Ca^{2+} a través del canal activado, se cargaron neuronas de hipocampo con el colorante Ca^{2+} intracelular, Fura-2, y luego se monitoreó el influjo de calcio evocado por la aplicación "en ráfaga" local repetitiva de NMDA (100 μ M; 500 ms) a neuronas antes y durante el tratamiento con sacarosa hipertónica. Como se resume en la Figura 2A, B, la sacarosa en concentraciones que inhibían la endocitosis y la apoptosis no alteró significativamente las respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocadas por NMDA. El hecho de que la inhibición de la endocitosis bloqueó la apoptosis inducida por NMDA sin afectar las respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indica que los incrementos intracelulares en las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aunque necesarios, pueden no ser suficiente para producir apoptosis inducida por NMDA.

La activación de ciertas formas de caspasas, tales como la caspasa-3 y -7¹⁶ (también Figura 1A, B) ha estado implicada en la apoptosis neuronal inducida por NMDA. Por lo tanto investigamos los efectos de inhibir la endocitosis sobre la activación dependiente de NMDA de la caspasa-3. El tratamiento con NMDA incrementó dramáticamente el nivel de la forma activada de caspasa-3 como lo demostraron las inmunoprecipitaciones Western utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente solamente la caspasa-3 activada/escindida (Figura 2C). El myr-Dyn permeable a membrana, en la concentración que inhibe la apoptosis mediada por el receptor de NMDA, inhibe eficientemente la activación de caspasa mediada por NMDA (Figura 2C).

La serina/treonina quinasa Akt/PKB ha sido implicada en la protección de neuronas frente a la muerte celular apoptótica¹⁷ y se ha sospechado que la inhibición de esta actividad de quinasa está involucrada en la apoptosis mediada por el receptor de NMDA¹⁸. Investigamos si el proceso de endocitosis juega un papel crítico en la inhibición de la actividad de Akt determinando el nivel de fosforilación de Akt en serina 473, un residuo cuya fosforilación es requerida para la activación completa de Akt¹⁹. Como se muestra en la Figura 2D, el tratamiento de neuronas con NMDA dio como resultado una reducción significativa en el Akt S473 fosforilado y por lo tanto en la actividad de Akt, sin alterar los niveles de Akt total. Esta reducción de la actividad de Akt fue evitada largamente por la inhibición de la endocitosis con sacarosa hipertónica. En contraste, el tratamiento con sacarosa no tuvo efecto sobre la reducción de la fosforilación de Akt después del tratamiento con STS, soportando adicionalmente la involucración específica de la endocitosis en la apoptosis inducida por NMDA (Figura 2D). Así, la endocitosis estimulada parece ser una etapa obligatoria corriente abajo de la elevación en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y corriente arriba de la activación de caspasa y la inhibición de Akt en apoptosis neuronal inducida por NMDA.

Se observó una reducción significativa de los receptores de AMPA en la superficie celular, pero no de NMDA, después del tratamiento con NMDA y esta reducción fue el resultado de una endocitosis del receptor facilitada puesto que bloqueó el inhibidor de la endocitosis myr-Dyn, pero no el péptido de control, Dyn (Figura 3A). Para investigar si había un enlace directo entre la endocitosis y apoptosis del receptor de AMPA inducidas por NMDA, se administró un péptido derivado de la secuencia de aminoácidos corta entre los residuos de tirosina 869 y ácido glutámico 879 dentro de la región del terminal carboxilo (CT) de la subunidad GluR2 del receptor AMPA (YKEGYNVYGI; denominado R2-CT) en neuronas cultivadas mezclándolo con un péptido portador (Pep-1)²³ una hora antes y durante el tratamiento con NMDA. Los resultados indicaron que la reducción inducida por NMDA de los receptores de AMPA de la superficie celular fue evitada (Figura 3B).

Con el fin de asegurar que el bloqueo por parte de este péptido no era debido a efectos no específicos del proceso endocitótico, se examinó su efecto sobre la endocitosis del receptor de transferrina, una endocitosis de receptor mediada por clatrina bien caracterizada¹³. La incubación de neuronas de hipocampo con transferrina marcada con fluorescencia durante 30 minutos dio como resultado una acumulación de la transferrina marcada con fluorescencia en el compartimiento intracelular. Esto fue un resultado de endocitosis de receptor de transferrina mediada por clatrina puesto que fue eliminada cuando estaba presente también sacarosa 0.4 M durante el período de incubación de la transferrina. En contraste, el R2-CT + Pep-1, aplicados a estas neuronas una hora antes y durante la incubación de transferrina, no logro prevenir la endocitosis del receptor de transferrina. Así, el péptido de R2-CT es un inhibidor dominante que puede bloquear específicamente la endocitosis de receptor de AMPA inducida por NMDA, pero no afecta no específicamente el proceso de endocitosis mediada por clatrina.

Adicionalmente, el pretratamiento de la neuronas con R2-CT + Pep-1 redujo significativamente la endocitosis inducida por NMDA cuantificada por el ensayo de biotilación con histona (Figura 4A), y por tinción nuclear PI (Figura 4B). La tinción con PI después de la fijación demostró que el R2-CT bloqueaba la apoptosis inducida por NMDA. En este ejemplo particular, ni el R2-CT ni el Pep-1 solos tuvieron efecto detectable alguno sobre la apoptosis inducida por NMDA. De manera similar al bloqueo general del proceso endocitótico mediado por clatrina con sacarosa o myr-Dyn, interfiriendo con la endocitosis del receptor de AMPA por R2-CT no alteró la apoptosis neuronal inducida por STS (Figura 4A). Tomados en conjunto, estos resultados han demostrado una evidencia fuerte de un requerimiento obligatorio para la endocitosis del receptor de AMPA en la apoptosis neuronal inducida por NMDA.

Por lo tanto, una endocitosis del receptor de AMPA dependiente de clatrina se requiere específicamente para la apoptosis inducida por NMDA, pero no por STS, de neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo primario. La endocitosis de bloqueo no tuvo efecto sobre las respuestas en Ca^{2+} inducidas por NMDA, pero evita la activación inducida por NMDA y de caspasa-3 y la inhibición de la fosforilación de Akt. Así, la endocitosis del receptor de AMPA puede ser un enlace crítico entre la sobrecarga de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por NMDA y las cascadas intracelulares que llevan a la apoptosis.

Así, la estimulación del receptor de NMDA activa las cascadas de señalización intracelulares que llevan a la apoptosis, y facilitan la internalización dependiente de la dinamina de los receptores de glutamato subtipo AMPA. El bloqueo de la internalización dependiente de la dinamina mejoró específicamente las cascadas apoptóticas activadas por NMDA (pero no por estaurosporina), sin afectar las elevaciones inducidas por NMDA en $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La inhibición específica de la endocitosis del receptor de AMPA inducida por NMDA por un péptido derivado de GluR2 evita la apoptosis inducida por NMDA, sin afectar la producida por la estaurosporina. Estos resultados demuestran que la endocitosis del receptor de AMPA puede requerirse en el enlazamiento de la activación del receptor de NMDA para la apoptosis neuronal, y por lo tanto sugiere que la endocitosis de receptor de AMPA juega un papel esencial en la reducción de la fuerza sináptica, y así también activamente media en otras rutas intracelulares importantes, incluyendo la muerte celular apoptótica.

Ejemplo 3: Secuencias distintivas dentro del terminal carboxilo de GluR2 son requeridas para la endocitosis del receptor de AMPA constitutiva y regulada

Para identificar determinantes de secuencia para la endocitosis del receptor de AMPA constitutiva y estimulada por insulina, se hicieron seis mutantes de GluR2 que contenían diversas eliminaciones de GluR2 CT (Figura 5B). Todos los constructos, excepto GluR2 Δ 854, fueron marcados con HA en la región amino terminal extracelular. Después de la transfección transiente en células HEK293, estos constructos fueron expresados a un nivel comparable a sus contrapartes tipo silvestre, HA-GluR2 o GluR2, según se determinó mediante un ensayo de ELISA en células colorimétrico bajo o condiciones de células permeabilizadas (Figura 5C).

La capacidad de estos mutantes para experimentar endocitosis tanto constitutiva como regulada se probó tal como se describió previamente¹⁴. Los receptores de superficie en células vivas fueron premarcados con un anticuerpo anti-HA (o un anticuerpo contra el dominio N-terminal extracelular de GluR2 en el caso de GluR2 Δ 854) a 4°C (el cual bloquea la endocitosis). Las células marcadas en superficie fueron incubadas entonces a 37°C durante 30 minutos para permitir que la endocitosis se reiniciara tanto en la ausencia como en la presencia de insulina (0.5 μM) para determinar cambios en la endocitosis del receptor de AMPA constitutiva (basal) y regulada (estimulada por insulina), respectivamente (Figura 6A, B). Los receptores internalizados fueron visualizados entonces por microscopía

confocal y cuantificados por ensayos de internalización del receptor basados en ELISA de células (Figura 6A). Las imágenes confocales representativas de células HEK293 transfectadas de manera transiente con mutantes de GluR2 o GluR2 marcados con HA se obtuvieron. Las células transfectadas fueron premarcadas con anticuerpo anti-HA y luego se evaluó la endocitosis del receptor bajo condiciones basales (endocitosis constitutiva) o después de estimulación con insulina (0.5 μ M, 10 minutos; endocitosis regulada). Los receptores de superficie celular fueron teñidos con FITC bajo condiciones de no permeación y los receptores no internalizados fueron teñidos subsecuentemente con Cy3 después de la permeabilización celular. Con el fin de determinar si los cambios en la internalización reducidos por estas mutaciones eran capaces de alterar los números de los receptores de superficie, también se midió el nivel del estado de equilibrio de los receptores de AMPA en superficie celular utilizando ensayos de receptor de superficie celular basados en ELISA de células (Figura 6C).

Como se muestra en la Figura 6A, los receptores de GluR2 tipo silvestre experimentaron endocitosis tanto constitutiva como estimulada por insulina. Así, en la ausencia de insulina, aproximadamente el 25% de los receptores de superficie celular sufrieron endocitosis al cabo de 30 minutos y esta proporción se incremento a 48% después de una breve estimulación con insulina (0.5: M, 10 min). Esta endocitosis facilitada estaba asociada con una reducción significativa en el nivel de receptores de AMPA expresados sobre la superficie celular (Figura 6B). El truncamiento de los últimos cuatro aminoácidos (GluR2 Δ 880), que forman el motivo de enlazamiento PDZ no tuvieron ningún efecto observable sobre la endocitosis constitutiva o regulada. Sin embargo, el truncamiento de los últimos 30 (GluR2 Δ 854) o 15 residuos (GluR2 Δ 869) abolió completamente la endocitosis del receptor de AMPA inducida por insulina, y la reducción en su expresión en la superficie celular (Figuras 6A-B). Ni el truncamiento altero el grado de endocitosis del receptor de AMPA constitutivo (Figura 6A) ni el nivel basal de la expresión del receptor en la superficie celular (Figura 6B). Se observó un descenso significativo en la rata de internalización constitutiva de GluR2 Δ 834-843, en la cual los primeros 10 aminoácidos del GluR2 CT fueron eliminados (Figura 6A). Sin embargo, esta eliminación interna no alteró el número de estado de equilibrio de los receptores de AMPA expresados en la superficie celular (Figura 6B). Ni alteraron la respuesta a la insulina, puesto que el GluR2 Δ 834-843 mostró una internalización potenciada similar en magnitud al GluR2 tipo silvestre (Figuras 6A y 6B). Por otro lado, el mutante de eliminación interna GluR2 Δ 844-853 no mostró cambios significativos en el grado de endocitosis constitutiva (Figura 6A), pero exhibió un pequeño descenso en la endocitosis estimulada por insulina (Figura 6A) y una reducción en el nivel del receptor en estado de equilibrio de la superficie celular (Figura 6B).

Ejemplo 4: La fosforilación de la tirosina de GluR2 CT es requerida para la endocitosis del receptor de AMPA estimulada por insulina

La secuencia de R2-CT contiene tres residuos de tirosina. Para determinar si estos residuos de tirosina son sustratos de ciertas tirosina quinasas, se llevaron a cabo ensayos de quinasas *in vitro* utilizando Src recombinante activo y proteínas de fusión de glutatona S-transferasa (GST) de las colas carboxilo de GluR1 (GST-GluR1CT) y GluR2 (GST-GluR2CT) (Figura 7A). GST-GluR2CT, pero no GST-GluR1CT o GST solo, es fosforilado específicamente por la Src quinasas. En consistencia con la hipótesis de que uno o más de los residuos de tirosina es el sustrato para la fosforilación por Src, se encontró que la Src quinasas recombinante fosforilaba una proteína de fusión GST que contenía la porción de nueve aminoácidos que incluía todos los tres residuos de tirosina únicos de GluR2 (GST-Y869KEGY873NVY876G). La fosforilación mediada por Src fue abolida cuando estos residuos de tirosina fueron mutados en alaninas (GST-A869KEGA873NVA876G).

Para determinar si los residuos de tirosina de GluR2 CT son fosforilados *in situ* por la actividad de tirosina quinasas endógena en respuesta a la estimulación con insulina, se generó un mutante de la subunidad GluR2 en el cual los residuos de tirosina Y869, Y873 y Y876 fueron mutados en alaninas (HA-GluR23Y-3A). Cuando se expresó de manera transiente en células HEK293, el mutante fue expresado al mismo tiempo que su contraparte GluR2 tipo silvestre (Figura 7B). Se examinó primero la fosforilación potencial de estos residuos de tirosina *in situ* en células que expresaban de manera transiente HA-GluR2, HA-GluR23Y-3A, o HA-GluR1. Las células fueron tratadas con o sin insulina (0.5 μ M, 10 min) y luego homogenizadas como se detalla en la sección de métodos. Los complejos de receptor de AMPA expresados fueron inmunoprecipitados utilizando un anticuerpo anti-HA bajo condiciones de desnaturalización, y luego inmunoprecipitados en cuanto a su nivel de fosforilación de tirosina utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina. Los resultados demostraron que había un nivel detectable de fosforilación de tirosina basal del GluR2 tipo silvestre y que el nivel de fosforilación se incrementó después de un breve tratamiento con insulina (Figura 7C). La triple mutación Y a A hizo disminuir fuertemente la fosforilación de tirosina tanto basal como inducida por insulina de HA-GluR2. En contraste, casi no hubo fosforilación de tirosina detectable de GluR1 bajo condiciones basales o estimuladas por insulina (Figura 7C). Estos resultados sugieren que la fosforilación de tirosina de GluR2 CT ocurre en un contexto celular bajo condiciones basales y es potenciada por la insulina.

La mutación de los residuos de tirosina de GluR2-CT evita la reducción inducida por insulina de los receptores de AMPA de la superficie celular. Las células HEK que expresan los mutantes GluR2 o GluR2 Y-A tipo silvestre fueron tratadas con insulina (0.5 μ M) durante 10 minutos y con un período de incubación adicional de 20 minutos en ECS. El nivel de receptores en la superficie celular fue probado utilizando un ensayo colorimétrico. La mutación de uno cualquiera de los residuos de tirosina fue suficiente para evitar la reducción inducida por insulina de la expresión del receptor de AMPA en la superficie celular (Figura 7D). Sin querer estar limitados por ninguna hipótesis, estos

resultados pueden sugerir que todos los tres residuos de tirosina son sustratos de la fosforilación de tirosina, o que están todos involucrados en el reconocimiento del sustrato por parte de la quinasa, o algún otro aspecto de la fosforilación catalizada de tal manera que la mutación de una tirosina en particular podría evitar la fosforilación incluso si no es la diana directa de la fosforilación. Así, en este último caso, la mutación de cualquiera de los

El significado funcional de la fosforilación de tirosina de GluR2 CT con respecto a la endocitosis estimulada por insulina se probó ensayando la internalización de HA-GluR2 y HA-GluR23Y-3A en células HEK293 (Figura 8A, B). Mientras que la mutación de estos residuos de tirosina no alteró el nivel de estado de equilibrio de GluR2 expresado sobre la superficie celular (Figura 8B), bloqueó la endocitosis inducida por insulina (Figura 8A) y la reducción inducida por insulina en el nivel de los receptores de AMPA de la superficie celular (Figura 8B).

Ejemplo 5: La insulina incrementa la fosforilación de tirosina de GluR2 y deprime la transmisión sináptica mediada por el receptor de AMPA en secciones de hipocampo

Se examinó a continuación si la estimulación con insulina podría cambiar el nivel de fosforilación de tirosina de los receptores de AMPA en hipocampo intacto, como lo hace en las células HEK293 que expresan subunidades de GluR2 (Figura 7A-D), y si esto podría ser importante para la depresión mediada por insulina de la transmisión sináptica mediada por el receptor de AMPA. Se trataron secciones de hipocampo con insulina (0.5 μ M; 10 min) y las subunidades GluR1 y GluR2 fueron inmunoprecipitadas entonces bajo condiciones de desnaturalización (como se detalla aquí) e inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-fosfotirosina (Figura 9A, B). Consistente con los resultados a partir de cultivos celulares, la subunidad GluR2 exhibió un nivel claramente apreciable de fosforilación de tirosina bajo condiciones basales; además, el nivel de fosforilación se incrementó después de la estimulación con insulina (Figura 9A, B). En contraste, los niveles de fosforilación de tirosina de GluR1 fueron apenas detectables bajo condiciones tanto basales como tratados con insulina. Estos resultados sustentan adicionalmente la fosforilación de tirosina de GluR2 en el hipocampo y demuestra que la fosforilación de tirosina en GluR2 puede ser estimulada por la insulina.

El efecto de la aplicación postsináptica de GST-GluR23Y (GST-YKEGYNVYG), y su contraparte mutante, GSTGluR23A (GST-AKEGANVAG), como control, durante los registros en célula entera de neuronas CA1 en secciones de hipocampo fue investigado para determinar la correlación, si la hay, de la fosforilación de la tirosina estimulada por insulina de los receptores de AMPA con la depresión persistente de las corrientes postsinápticas excitadoras mediadas por el receptor (EPSCs). Como se muestra en la Figura 7A, GSTGluR23Y, pero no GST-GluR23A, es un buen sustrato para la fosforilación de tirosina. La aplicación en baño de insulina dio como resultado un descenso persistente en el componente AMPA de EPSCs (Figura 9C, D). La depresión de EPSC inducida por insulina fue evitada cuando el péptido GST-GluR23Y tipo silvestre (100 μ g/ml) fue incluido en la pipeta de registro, mientras que en la misma cantidad de péptido mutante, GST-GluR23A, no tuvo efecto (Figura 9C, D). Así, el péptido que contenía tirosina tipo silvestre, pero no su contraparte mutante, es suficiente para bloquear la depresión persistente inducida por insulina de EPSCs mediado por el receptor de AMPA.

Ejemplo 6: residuos de tirosina en el LTD mediado por GluR2 CT

El nivel de fosforilación de tirosina de GluR2 fue establecido utilizando la siguiente estimulación de baja frecuencia (LFS) de secciones de hipocampo (1 Hz durante 15 minutos, lo cual induce confiablemente LTD bajo estas condiciones experimentales), para determinar si la fosforilación de tirosina de GluR2 CT puede ser requerida para la depresión a largo plazo inducida por LFS (LTD). Las secciones fueron homogenizadas en regulador de desnaturalización 10 minutos después de la estimulación y las subunidades de GluR fueron inmunoprecipitadas y sondeadas con fosfotirosina. Como se muestra en la Figura 10A, hubo una fosforilación de tirosina basal de GluR2, pero no GluR1, y la estimulación de inducción de LTD incrementó el nivel de fosforilación de tirosina de GluR2 sin afectar la de GluR1 (Figura 10A). La inducción de LTD por LFS fue bloqueada por la aplicación postsináptica de GST-GluR23Y (100 μ g/ml), pero no por el péptido mutante GST-GluR23A (100 μ g/ml; Figura 10B) o por GST-GluR2834-843 (Figura 10C).

Ejemplo 7: El péptido de GluR2 CT evita la endocitosis del receptor de AMPA inducida por isquemia y la apoptosis neuronal en un cultivo neuronal modelo de apoplejía

Un ataque similar a isquemia fue imitado por privación de oxígeno y glucosa (OGD) durante una hora en neuronas corticales cultivadas (DIV 12-14). El OGD es un modelo de cultivo celular bien caracterizado de isquemia. El péptido GluR2CT (1 mM) fue administrado a las neuronas mezclándolo con el péptido portador PEP-1 e incubando las neuronas con la mezcla durante una hora antes del ataque con OGD. La Figura 11A muestra un ensayo colorimétrico (célula-ELISA) que indica que OGD facilita la endocitosis del receptor de AMPA, haciendo disminuir por lo tanto su expresión sobre la superficie de la membrana de plasma y la preincubación del péptido de GluR2-CT reduce el descenso inducido por OGD en la expresión de receptor de AMPA en la superficie celular (n=6; *; P<0.05, prueba de Student), en comparación con control. La Figura 11B es un ensayo de apoptosis cuantitativo 24 horas

después de OGD utilizando el kit Cell Death Detection Plus (Roche, Cat# 1 774 425), demostrando que OGD produce muerte neuronal que es evitada grandemente por el pretratamiento de las neuronas con GluR2-CT. (n=6; **: P<0.01, prueba t de Student), comparada con OGD. Juntos, estos resultados indican que al igual que la sobreactivación del receptor de NMDA, los ataques similares a isquemia producen también muerte celular facilitando la endocitosis del receptor de AMPA y como tales, los péptidos que bloquean la endocitosis del receptor de AMPA, tales como el péptido GluR2-CT, pueden ser utilizados en el tratamiento de apoplejía para reducir el daño neuronal.

Ejemplo 8: La aplicación sistémica del péptido Tat-GluR2_{3Y} bloquea la expresión de la sensibilización de comportamiento del fármaco de abuso d-anfetamina en un modelo animal de adicción a fármacos

La sensibilización en comportamiento está definida como un incremento en la respuesta psicomotora al tratamiento con mucha clase de fármacos adictivos (esto es, anfetamina, cocaína, nicotina, heroína) y puede ser dividido en fases de inducción y expresión. La sensibilización en comportamiento es un modelo bien aceptado de adaptaciones neurales y de comportamiento que constituyen la hipótesis para formar las bases de adicción, específicamente cambios inducidos por fármacos en el sistema de dopamina mesocorticolímbica que subyace a la motivación para engancharse en un comportamiento de búsqueda de fármacos^{60,61}.

Para inducir la sensibilización en comportamiento a fármacos adictivos que llevan al abuso de sustancias, cuatro grupos separados de ratas recibieron inyecciones repetitivas de d-anfetamina (2 mg/kg, intraperitonealmente (IP)) o solución salina, cada tercer día durante un total de 10 inyecciones. En los días 1, 5 y 10 del régimen de inyección, las ratas fueron colocadas en dos cajas de locomoción de nivel 2 durante 30 minutos antes de la inyección de anfetamina para habituarlas a las cajas, y durante 2 horas adicionales después de la inyección, y se establecieron los marcadores de estereotipia (comportamientos inducidos por fármaco) a intervalos de 1 minuto cada 10 minutos durante la duración de la sesión de 2 horas. Después de la 10^a inyección de d-anfetamina, las ratas recibieron 21 días de descanso, y se implantaron de manera crónica catéteres permanentes en la vena yugular bajo anestesia.

Con el fin de suministrar el péptido GluR2-CT en las neuronas en el cerebro después de inyección intravenosa (IV), el péptido silvestre GluR2-CT que contenía residuos 3Y o la secuencia de péptidos correspondiente en la cual las tres tirosinas fueron reemplazadas con alanina se fusionó al dominio de transducción de la membrana celular del virus de inmunodeficiencia humano tipo 1 (VIH-1) proteína Tat (YGRKKRRQRRR), el cual es capaz de cruzar la barrera sangre cerebro (BBB)⁸⁵, para obtener los péptidos Tat-GluR2-3Y (YGRKKRRQRRR-YKEGYNVYIGIE) o Tat-GluR2-3A (YGRKKRRQRRR-AKEGANVAGIE).

En el día 21, las ratas fueron pretratadas con Tat-GluR2-3Y, o Tat-GluR2-3A 1.5 nM/gr o solución salina bien por inyección IV, o por microinyección intracraneana en el nucleus accumbens (Nac), y fueron regresados a sus jaulas de alojamiento por 60 minutos. Las ratas fueron colocadas entonces en las cajas de locomoción (cámaras de observación) durante 30 minutos y fueron tratadas luego con una dosis de ataque de d-anfetamina (2 mg/kg, IP). Los marcadores de estereotipia fueron establecidos tal como se describió (Figura 12A). Los puntos representan marcadores de estereotipia medios (± S.E.M) para grupos de ratas durante las 2 horas de la sesión de prueba. El pretratamiento con Tat-GluR2-3Y bloquea completamente la expresión aguda de la estereotipia inducida por d-anfetamina, mientras que el Tat-GluR2-3A fue inefectivo en este aspecto (F(2,31)= 4.22, p<0.01). La Figura 12B muestra el efecto pico de la estereotipia, el cual ocurrió a aproximadamente 50 minutos después del pretratamiento con d-anfetamina, el cual está representado para cada grupo. * indica que p< 0.05 en comparación con el grupo tratado con solución salina. Un pretratamiento intravenoso de 1 hora con el péptido GluR23Y, pero no el control GluR23A, abolió la expresión de la sensibilización en comportamiento a una dosis de ataque de anfetamina, sin ningún efecto colateral notable en las ratas (Figura 12A, B). El bloqueo de la sensibilización es debido a la acción específica en el Nac, en un experimento subsecuente, como microinfusión directa de GluR23Y en el Nac, pero no la administración IV imitada, de VTA, evita la expresión de la sensibilización de comportamiento (Figura 12C, D). El tratamiento sistémico con el péptido tipo silvestre efectivo fallo en perturbar una respuesta operativa aprendida para recompensa en alimento suministrado en una programación FR-2 (Figura 18A). Evidencia adicional para el alto grado de especificidad del péptido es su carencia de efecto sobre el efecto de recompensa incondicional de D-amp (Figura 18B). Estos datos proveen la primera evidencia de que el LTD en el NAc es requerido para la expresión de la sensibilización de comportamiento, una correlación de comportamiento compulsivo, y lo que es más significativo, que un "péptido de interferencia" corto que es permeable a la membrana que bloquea LTD puede evitar la expresión de esta sensibilización de comportamiento sin efectos colaterales necesarios. Así, la capacidad del tratamiento con el péptido Tat-GluR2-3Y para bloquear la expresión de la sensibilización de comportamiento es consistente con el uso de tales péptidos en el tratamiento de abuso de sustancias y adicción a clases de fármacos que inducen la sensibilización de comportamiento.

Ejemplo 9: Tratamiento de daño cerebral isquémico por bloqueo de la endocitosis del receptor de AMPA

Se investigó si un péptido que puede bloquear la endocitosis de AMPAR puede funcionar como un agente neuroprotector evitando la apoptosis neuronal inducida por glutamato. Primero, con el fin de asegurar de que el péptido era capaz de permear las neuronas, se expusieron cultivos de neuronas corticales Wistar primarios al péptido Tat-GluR2-3Y marcado con dansilo y las células fueron visualizadas por microscopía de fluorescencia. Las

neuronas DIV 13 fueron tratadas con solución salina (control) o con el péptido GluR23Y marcado con dansilo 1 μM durante 10, 20, 30, o 60 minutos. El péptido fue capaz de permear las células en una forma dependiente del tiempo. Las neuronas consumieron el Tat-GluR2-3Y dansilado en una forma dependiente del tiempo con fluorescencia visible significativamente a los 10 minutos con un máximo a aproximadamente 30 minutos.

Una vez que se supo que el péptido podría entrar a las neuronas corticales, se examinó la capacidad de Tat-GluR2-3Y para bloquear la endocitosis de AMPAR inducida por NMDA. Las neuronas corticales Wistar primarias pretratadas con o sin Tat-GluR2-3Y fueron sometidas a ataque con NMDA y la expresión en superficie de AMPARs fue cuantificada utilizando un ensayo de ELISA celular. Los niveles de línea base de la expresión en superficie de AMPAR fueron aproximadamente 70%, con una reserva intracelular correspondiente al 30%. El tratamiento con NMDA-glicina dio como resultado un descenso significativo en la expresión en superficie de AMPAR con referencia al control de 69% a 55% ($p < 0.05$, prueba de Tukey-Kramer), que fue bloqueado completamente por tratamiento con Tat-GluR2-3Y (73% de expresión en superficie, $p < 0.05$ en comparación con el grupo de NMDA, prueba de Tukey-Kramer) (Figura 13). Adicionalmente, el Tat-GluR2-3A, una versión mutada de Tat-GluR2-3Y fue incapaz de bloquear la endocitosis de AMPAR inducida por NMDA. También debe anotarse que en este ejemplo, cada péptido solo no tuvo efecto sobre la expresión en superficie de AMPAR.

Puesto que el Tat-GluR2-3Y fue capaz de bloquear la endocitosis de AMPAR inducida por NMDA, se investigó la capacidad del péptido para proteger las neuronas cultivadas contra la apoptosis inducida por privación de oxígeno y glucosa (OGD). Las neuronas DIV 12-13 fueron pretratadas bien sea con solución salina o con Tat-GluR2-3Y durante 60 minutos, seguido por 60 minutos de OGD a 37°C o incubación a 37°C en medio (control). La cantidad de apoptosis fue cuantificada utilizando un ensayo de ELISA direccionado a nucleosomas libres que son característicos de la apoptosis. La OGD indujo apoptosis significativa en comparación con el control que fue bloqueado sustancialmente por pretratamiento con Tat-GluR2-3Y ($p < 0.05$) (Figura 14).

Para el estudio de péptido *in vivo* se investigó primero si el péptido podría pasar la barrera sangre cerebro (BBB) e infiltrar el tejido neuronal. Se administraron Tat-GluR2-3Y marcada con dansilo o solución salina a ratones C57-Black/6 macho y se cortaron secciones cerebrales de corona de 40 μm con un criostato y se visualizaron con microscopía de fluorescencia. Más específicamente, dos ratones C57-Black/6 machos adultos recibieron una inyección intraperitoneal de 30 nmoles/g de Tat-GluR2-3Y marcado con dansilo o solución salina. Los ratones fueron sacrificados 2 horas después de la inyección, y se cortaron secciones de corona de 40 micrones con un criostato y se visualizaron con microscopía de fluorescencia. Los resultados indicaron que las secciones de cerebro con péptido marcado con dansilo exhibieron una intensidad de fluorescencia mayor que el control, confirmando la entrada del péptido en el cerebro, y que el Tat-GluR2-3Y marcado con dansilo cruza la barrera sangre cerebro y entra al tejido neural.

Con el fin de describir cualitativamente la localización y tamaño del infarto producido por el método de sutura intraluminal de oclusión en MCA, se sometieron 4 ratas Sprague-Dawley macho al procedimiento, se sacrificaron el día 3 después de la oclusión de MCA, y se tiñeron secciones de cerebro de 1 mm con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). Más específicamente, ratas Sprague-Dawley macho adultas de ~300 g de peso corporal fueron sometidas a 60 minutos de oclusión MCA utilizando un monofilamento de nylon 3-0 intraluminal. Las ratas fueron sacrificadas entonces 3 días después de la oclusión de MCA y los cerebros fueron cortados en secciones de 1 mm y teñidos con TTC. El método de isquemia transiente dio como resultado un volumen de infarto significativo en la involución de sección transversal coronaria máxima a ~1.5 mm con respecto al bregma. El volumen del infarto fue reproducible con involucramiento cortical significativa en cada rata. A partir de la tinción con TTC, se escogieron -0.8 mm con respecto al bregma para la tinción de apoptosis utilizando marcación final en muescas dUTP mediada por desoxirribonucleótido transferasa [TdT] (TUNEL).

Con el fin de determinar la dosis máxima que podría ser administrada sin reacción adversa, dos ratas Sprague-Dawley macho fueron inyectadas con dosis seriadas de Tat-GluR2-3Y variando desde 0.5 nmoles/g a 30 nmoles/g y se monitorizaron los parámetros vitales básicos. Se encontró que el fármaco fue tolerado hasta una dosis de ~12 nmoles/g después de lo cual hubo una gran declinación en presión sanguínea concurrente con un incremento en la rata de respiración (Figura 15) y cambios correspondiente en pO_2 , y pCO_2 . Ambos animales fueron revividos después de la respuesta a la curva y no mostraron signos de depresión mental u otros cambios en comportamiento. Con base en estos resultados la dosis de 3 nmoles/g fue escogida para los experimentos *in vivo* subsecuentes. Asumiendo una dispersión completa del péptido en el animal, esta dosis corresponde aproximadamente a una concentración de 3 μM .

Puesto que el mecanismo propuesto de neuroprotección para Tat-GluR2-3Y es la prevención de la apoptosis, fue necesario primero demostrar y cuantificar la apoptosis en el modelo de isquemia focal transiente. Dos ratas Sprague-Dawley macho fueron sometidas a 90 minutos de oclusión de MCA, o a cirugía simulada sin oclusión. Utilizando la tinción TUNEL de las secciones de cerebro obtenidas 24 horas después de la cirugía, la oclusión de MCA demostró causar apoptosis significativa (Figura 16).

Dada la evidencia de que el pretratamiento con Tat-GluR2-3Y era capaz de bloquear la endocitosis del receptor de

AMPA y reducir la apoptosis inducida por OGD *in vitro*, se investigó la capacidad de pretratamiento con el péptido para evitar el déficit neurológico y apoptosis penumbra en isquemia focal transiente. Se pretrataron 15 ratas Sprague-Dawley macho con o 3 nmoles/g de Tat-GluR2-3Y o de Tat-GluR2-3A o solución salina durante 60 minutos, después de lo cual, se ocluyó la MCA derecha durante 60 minutos. Las ratas se sometieron a un examen neurológico 45 minutos durante la oclusión de MCA y en el sacrificio (~24 horas). No se notó diferencia significativa en los marcadores neurológicos a las 24 horas (Figura 17A) o durante la oclusión. Después del sacrificio, se tiñeron secciones de corona de 12 µm con TUNEL y el número de células positivas a TUNEL en el córtex del hemisferio afectado fue registrado (Figura 17B). El pretratamiento con Tat-GluR2-3Y dio como resultado un descenso de ~55% en apoptosis con respecto al control con solución salina, mientras que el pretratamiento con Tat-GluR2-3A dio como resultado un incremento de ~22% en la apoptosis, sin embargo, debido al tamaño de muestra y a la alta variabilidad, estas diferencias no alcanzaron significado estadístico. Se notó durante la cirugía que el pretratamiento con Tat-GluR2-3Y y Tat-GluR2-3A versus solución salina dio como resultado una presión sanguínea arterial media significativamente inferior (MABP) 10 minutos antes de la oclusión de MCA; $p < 0.05$ prueba de Tukey-Kramer.

Ejemplo 10: Tratamiento de trastornos relacionados con el estrés utilizando el péptido GluR2-CT

El estrés es conocido por iniciar la inducción de LTD¹²³ y para dar como resultado trastornos relacionados con el estrés tales como incapacidad de la memoria, ansiedad¹²⁴ y depresión¹²⁵. Así, el péptido GluR2-3Y, al bloquear la endocitosis regulada y por lo tanto el LTD, puede tener efectos terapéuticos para estos trastornos relacionados con el estrés. Como ejemplo, hemos probado por lo tanto el efecto del péptido contra la ansiedad inducida por estrés utilizando un modelo de ansiedad animal bien establecido¹²⁶. Se inyectaron ratas (n=4) tanto con GluR2-3Y 10 nM/g o un volumen igual de vehículo ACSF (IP). Se les dio 30 minutos en un cuarto oscuro después de la inyección. Después de eso fueron colocadas en una plataforma elevada durante 30 minutos como medio de estrés y luego colocadas sobre el laberinto elevado durante 5 minutos⁷⁴. Las ratas inyectadas con GluR2-3Y gastaron más tiempo sobre los brazos abiertos que las ratas con ACSF. Las ratas con ACSF gastaron la mayor parte de su tiempo en las esquinas de los brazos cerrados o retrocediendo buscando las paredes. Así, el péptido GluR23Y bloquea la ansiedad inducida por estrés (Figura 19). Estos resultados sugieren fuertemente que la endocitosis de AMPAR facilitada y por lo tanto la expresión de LTD juegan un papel indispensable en la expresión de comportamientos inducidos por estrés y que los bloqueadores de LTD tales como el péptido GluR2_{3Y} puede ser utilizado como agente terapéutico para tratar trastornos cerebrales relacionados con el estrés, incluyendo ansiedad, síndrome posttraumático y depresión.

Ejemplo 11: Prevención de recaída en adicción a fármacos y tratamiento de trastornos psicóticos utilizando los péptidos GluR2-CT

La recaída inducida por la presentación de una dosis de inicio de fármaco o estímulos condicionales apareados previamente con infusiones de Anfetamina o heroína son una fase crítica del comportamiento adictivo. Se utilizó un modelo de rata de autoadministración de fármaco intravenosa, acoplado con la extinción de comportamiento de búsqueda de fármaco antes de las pruebas de recaída⁷³. El péptido Tat-GluR23Y, el péptido de control mutado GluR23A, y el vehículo se inyectaron intravenosamente antes de las pruebas de recaída. Después de la demostración del éxito en la prevención de la recaída, se llevó a cabo una batería de experimentos para control de comportamiento para asegurar que el tratamiento con los péptidos Tat-GluR2 no producían déficit generalizados en el aprendizaje y la memoria. El protocolo utiliza pruebas de reconocimiento y memoria espacial y de orden temporal utilizado rutinariamente, junto con una batería de pruebas neurológicas estándar para asegurar una función sensorial y motora normal (Figura 18A-B). También se examinaron los efectos del péptido GluR23Y sobre las pruebas específicas en ratas que modelan síntomas psicóticos en humanos incluyendo inhibición prepulso, hiperactividad inducida por PCP e interacción social. Ocurre un bloqueo de la sensibilización sin afectar la función de AMPAR y la transmisión sináptica basal, y las consecuencias adversas de bloquear los receptores transmisores, frecuentemente asociadas con otros fármacos antipsicóticos disponibles actualmente, no ocurren.

Referencias

1. Mattson M. P., Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 1, 120-129 (2000).
2. Graham S. H. and J. Chen, J.Cereb.Blood Flow Metab 21, 99-109 (2001).
3. Yu S. P., L. M. Canzoniero, D. W. Choi, Curr.Opin.Cell Biol. 13, 405-411 (2001).
4. Nicotera P.etc. and S. A. Lipton, J.Cereb.Blood Flow Metab 19, 583-591 (1999).
5. G. E. Hardingham, Y. Fukunaga, H. Bading, Nat.Neurosci. (2002).
6. H. Y. Man, W. Ju, G. Ahmadian, Y. T. Wang, Cell Mol.Life Sci. 57, 1526-1534 (2000).

7. R. Malinow and R. C. Malenka, *Annu.Rev.Neurosci.* 25, 103-126 (2002).
8. A. V. Vieira, C. Lamaze, S. L. Schmid, *Science* 274, 2086-2089 (1996).
9. A. Kiselev et al., *Neuron* 28, 139-152 (2000).
10. P. G. Alloway, L. Howard, P. J. Dolph, *Neuron* 28, 129-138 (2000).
- 5 11. K. L. Pierce and R. J. Lefkowitz, *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 727-733 (2001).
12. S. L. Budd, L. Tennen, T. Lishnak, S. A. Lipton, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 6161-6166 (2000).
13. S. H. Hansen, K. Sandvig, B. van Deurs, *J.Cell Biol.* 121, 61-72 (1993).
14. H. Y. Man et al., *Neuron* 25, 649-662 (2000).
15. B. Marks and H. T. McMahon, *Curr.Biol.* 8, 740-749 (1998).
- 10 16. S. S. Okamoto et al., *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 99, 3974-3979 (2002).
17. H. Dudek et al., *Science* 275, 661-665 (1997).
18. E. Chalecka-Franaszek and D. M. Chuang, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 8745-8750 (1999).
19. P. J. Coffey, J. Jin, J. R. Woodgett, *Biochem.J.* 335 (Pt 1), 1-13 (1998).
20. J. W. Lin et al., *Nat.Neurosci.* 3, 1282-1290 (2000).
- 15 21. M. D. Ehlers, *Neuron* 28, 511-525 (2000).
22. E. C. Beattie et al., *Nat.Neurosci.* 3, 1291-1300 (2000).
23. M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat.Biotechnol.* 19, 1173-1176 (2001).
24. C. Luscher et al., *Neuron* 24, 649-658 (1999).
25. Y. T. Wang and D. J. Linden, *Neuron* 25, 635-647 (2000).
- 20 26. Y. T. Wang and M. W. Salter, *Nature* 369, 233-235 (1994).
27. Benke, T.A., Luthi, A., Isaac, J.T., and Collingridge, G.L. (1998) Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature*, 393, 793-797.
28. Bonifacino, J.S. and Dell'Angelica, E.C. (1999) Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J.Cell Biol.*, 145, 923-926.
- 25 29. Boxall, A.R., Lancaster, B., and Garthwaite, J. (1996) Tyrosine kinase is required for long-term depression in the cerebellum. *Neuron*, 16, 805-813.
30. Carroll, R.C., Beattie, E.C., Xia, H., Scher, C., Altschuler, Y., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., and von Zastrow, M. (1999) Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 14112- 14117.
- 30 31. Chung, H.J., Xia, J., Scannevin, R.H., Zhang, X., and Huganir, R.L. (2000) Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J.Neurosci.*, 20, 7258-7267.
32. Daw, M.I., Chittajallu, R., Bortolotto, Z.A., Dev, K.K., Duprat, F., Henley, J.M., Collingridge, G.L., and Isaac, J.T. (2000) PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Neuron*, 28, 873-886.
- 35 33. Derkach, V., Barria, A., and Soderling, T.R. (1999) Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolopropionate type glutamate receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 3269-

3274.

34. Greengard,P., Jen,J., Nairn,A.C., and Stevens,C.F. (1991) Enhancement of the glutamate response by cAMPdependent protein kinase in hippocampal neurons. *Science*, 253, 1135-1138.
- 5 35. Hayashi,Y., Shi,S.H., Esteban,J.A., Piccini,A., Poncer,J.C., and Malinow,R. (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*, 287, 2262-2267.
36. Hollmann,M. and Heinemann,S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu.Rev.Neurosci.*, 17, 31-108.
37. Karoor,V., Wang,L., Wang,H.Y., and Malbon,C.C. (1998) Insulin stimulates sequestration of beta-adrenergic receptors and enhanced association of beta-adrenergic receptors with Grb2 via tyrosine 350. *J.Biol.Chem.*, 273, 33035-33041.
- 10 38. Kim,C.H., Chung,H.J., Lee,H.K., and Huganir,R.L. (2001) Interaction of the AMPA receptor subunit GluR2/3 with PDZ domains regulates hippocampal long-term depression. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A*, 98, 11725- 11730.
39. Lau,L.F. and Huganir,R.L. (1995) Differential tyrosine phosphorylation of N-metil-D-aspartate receptor subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 20036-20041.
- 15 40. Lee,S.H., Liu,L., Wang,Y.T., and Sheng,M. (2002) Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron*, 36, 661-674.
41. Liang,F. and Huganir,R.L. (2001) Coupling of agonist-induced AMPA receptor internalization with receptor recycling. *J.Neurochem.*, 77, 1626-1631.
- 20 42. Lu,W., Man,H., Ju,W., Trimble,W.S., MacDonald,J.F., and Wang,Y.T. (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 29, 243-254.
43. Luscher,C., Nicoll,R.A., Malenka,R.C., and Muller,D. (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat.Neurosci.*, 3, 545-550.
- 25 44. Luthi,A., Chittajallu,R., Duprat,F., Palmer,M.J., Benke,T.A., Kidd,F.L., Henley,J.M., Isaac,J.T., and Collingridge,G.L. (1999) Hippocampal LTD expression involves a pool of AMPARs regulated by the NSF-GluR2 interaction [see comments]. *Neuron*, 24, 389-399.
45. Malinow,R., Mainen,Z.F., and Hayashi,Y. (2000) LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 10, 352-357.
46. Matsuda,S., Launey,T., Mikawa,S., and Hirai,H. (2000) Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. *EMBO J.*, 19, 2765-2774.
- 30 47. Nishimune,A., Isaac,J.T., Molnar,E., Noel,J., Nash,S.R., Tagaya,M., Collingridge,G.L., Nakanishi,S., and Henley,J.M. (1998) NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron*, 21, 87-97.
48. Osten,P., Srivastava,S., Inman,G.J., Vilim,F.S., Khatri,L., Lee,L.M., States,B.A., Einheber,S., Milner,T.A., Hanson, P.I., and Ziff,E.B. (1998) The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP- dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron*, 21, 99-110.
- 35 49. Passafaro,M., Piech,V., and Sheng,M. (2001) Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat.Neurosci.*, 4, 917-926.
50. Pickard,L., Noel,J., Duckworth,J.K., Fitzjohn,S.M., Henley,J.M., Collingridge,G.L., and Molnar,E. (2001) Transient synaptic activation of NMDA receptors leads to the insertion of native AMPA receptors at hippocampal neuronal plasma membranes. *Neuropharmacology*, 41, 700-713.
- 40 51. Song,I., Kamboj,S., Xia,J., Dong,H., Liao,D., and Huganir,R.L. (1998) Interaction of the N-etilmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron*, 21, 393-400.
52. Stern-Bach,Y., Russo,S., Neuman,M., and Rosenmund,C. (1998) A point mutation in the glutamate binding site blocks desensitization of AMPA receptors. *Neuron*, 21,907-918.

53. Wenthold,R.J., Petralia,R.S., Blahos,J., II, and Niedzielski,A.S. (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *Journal of Neuroscience*, 16, 1982-1989.
54. Xia,J., Chung,H.J., Wihler,C., Huganir,R.L., and Linden,D.J. (2000) Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins. *Neuron*, 28, 499-510.
- 5 55. Krammer et al. (1991) "Apoptosis in the APO-1 System", *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*, pp. 87-99 Cold Spring Harbor Laboratory Press.
56. Harlow and Lane Antibodies; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
57. Eisenberg et al *J. Mol. Bio.* 179:125-142, 184.
- 10 58. Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
59. Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1994.
60. Berke, J.D. & Hyman, S.E. (2000). Addiction, dopamine and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, 25, 515-532.
- 15 61. Robinson, T.E. & Berridge, K.L. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res.*, *Brain Res. Rev.*, 18, 247-291.
62. Jarousse, N. and Kelly, R.B. (2000) Selective inhibition of adaptor complex-mediated vesiculation. *Traffic* 1:378-384.
- 20 63. Altschul, S.F. 1991. "Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective." *Journal of Molecular Biology*, 219: 555-665.
64. Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Orcutt, B.C. 1978. "A model of evolutionary change in proteins." In "Atlas of Protein Sequence and Structure" 5(3) M.O. Dayhoff (ed.), 345 - 352, National Biomedical Research Foundation, Washington.
- 25 65. States, D.J., Gish, W., Altschul, S.F. 1991. "Improved Sensitivity of Nucleic Acid Database Search Using Application-Specific Scoring Matrices" *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3(1): 66 - 77.
66. Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff. 1992 "Amino acid substitution matrices from protein blocks." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89(biochemistry): 10915 - 10919.
67. M.S. Johnson and J.P. Overington. 1993. "A Structural Basis of Sequence Comparisons: An evaluation of scoring methodologies." *Journal of Molecular Biology*. 233: 716 - 738.
- 30 68. Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff. 1993. "Performance Evaluation of Amino Acid Substitution Matrices." *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 17: 49 -61.
69. Karlin, S. and Altschul, S.F. 1990. "Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 2264 - 2268.
- 35 70. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R: Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91, 1989.
71. Reglodi D, Tamas A, Lengvari I: Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bull* 59:459-466, 2003.
72. Kan RK, Pleva CM, Backof DR, Hamilton TA, Petralli JP: Free-floating cryostat sections for immunoelectron microscopy: Bridging the gap from light to electron microscopy. *Microsc Res Tech* 54:246-253, 2001.
- 40 73. Taepavarapruk P and AG Phillips: Neurochemical correlates of relapse to D amphetamine self-administration by rats induced by stimulation of the ventral subiculum, *Psychopharmacology*, 168:99-108, 2003.

74. Chaki S, A Nakazato, L Kennis, M Nakamura, C Mackie, M Sugiura, P Vinken, D Ashton, X Langlois, and T Steckler, Anxiolytic- and antidepressant-like profile of a new CRF1 receptor antagonist, R278995/CRA0450, European Journal of Pharmacology 485 145- 158, 2004.
- 5 75. Davis SM, Lees KR, Albers GW, Diener HC, Markabi S, Karlsson G, Norris J: Selfotel in acute ischemic stroke : possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. Stroke 31:347-354, 2000.
76. Lees KR: Cerestat and other NMDA antagonists in ischemic stroke. Neurology 49:S66-69, 1997.
77. Sacco RL, DeRosa JT, Haley EC, Jr., Levin B, Ordonneau P, Phillips SJ, Rundek T, Snipes RG, Thompson JL: Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. Jama 285:1719-1728,2001.
- 10 78. Albers GW, Goldstein LB, Hall D, Lesko LM: Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. Jama 286:2673-2682, 2001.
79. Clark WM, Raps EC, Tong DC, Kelly RE: Cervene (Nalmefene) in acute ischemic stroke : final results of a phase III efficacy study. The Cervene Stroke Study Investigators. Stroke 31:1234-1239, 2000.
- 15 80. Diener HC, Hacke W, Hennerici M, Radberg J, Hantson L, De Keyser J: Lubeluzole in acute ischemic stroke. A double-blind, placebo-controlled phase II trial. Lubeluzole International Study Group. Stroke 27:76-81, 1996.
81. Clark WM, Wechsler LR, Sabounjian LA, Schwiderski UE: A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients. Neurology 57:1595-1602, 2001.
82. Horn J, Limburg M: Calcium antagonists for ischemic stroke: a systematic review. Stroke 32:570-576, 2001.
- 20 83. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. Neurology 57:1428-1434, 2001.
84. Lyden P, Shuaib A, Ng K, Levin K, Atkinson RP, Rajput A, Wechsler L, Ashwood T, Claesson L, Odergren T, Salazar-Gruoso E: Clomethiazol Acute Stroke Study in ischemic stroke (CLASS-I): final results. Stroke 33:122-128, 2002.
- 25 85. Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF: TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. Methods 24:247-256, 2001.
86. Lau E, Bungard TJ, Tsuyuki RT: Stroke prophylaxis in institutionalized elderly patients with atrial fibrillation. J Am Geriatr Soc 52:428-433, 2004.
- 30 87. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F: Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. Jama 282:2003-2011, 1999.
88. Ahmed N, Nasman P, Wahlgren NG: Effect of intravenous nimodipine on blood pressure and outcome after acute stroke. Stroke 31:1250-1255, 2000.
89. Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, McCulloch J, Teasdale GM, Graham DI: Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia. J Neurol Neurosurg Psychiatry 50:402-410, 1987.
- 35 90. Williams LS, Rotich J, Qi R, Fineberg N, Espay A, Bruno A, Fineberg SE, Tierney WR: Effects of admission hyperglycemia on mortality and costs in acute ischemic stroke. Neurology 59:67-71, 2002.
91. Lin B, Ginsberg MD, Busto R: Hyperglycemic exacerbation of neuronal damage following forebrain ischemia: microglial, astrocytic and endothelial alterations. Acta Neuropathol (Berl) 96:610-620, 1998.
- 40 92. Takano K, Carano RA, Tatlisumak T, Meiler M, Sotak CH, Kleinert HD, Fisher M: Efficacy of intra-arterial and intravenous prourokinase in an embolic stroke model evaluated by diffusion-perfusion magnetic resonance imaging. Neurology 50:870-875, 1998.
93. Wang Y, Lim LL, Levi C, Heller RF, Fisher J: Influence of admission body temperature on stroke mortality. Stroke 31:404-409, 2000.

94. Thornhill J, Corbett D: Therapeutic implications of hypothermic and hyperthermic temperature conditions in stroke patients. *Can J Physiol Pharmacol* 79:254-261,2001.
95. Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G: Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res* 958:210-221,2002.
- 5 96. Doraiswamy PM: Alzheimer's disease and the glutamate NMDA receptor. *Psychopharmacol Bull* 37:41-49, 2003.
97. Cheramy A, Barbeito L, Godeheu G, Glowinski J: Riluzole inhibits the release of glutamate in the caudate nucleus of the cat in vivo. *Neurosci Lett* 147:209-212, 1992.
98. Zuddas A, Oberto G, Vaglini F, Fascetti F, Fornai F, Corsini GU: MK-801 prevents 1-metil-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in primates. *J Neurochem* 59:733-739, 1992.
- 10 99. Doble A: The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81:163-221, 1999.
100. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V: A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *ALS/Riluzole Study Group. N Engl J Med* 330:585-591, 1994.
- 15 101. Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25: 515-532.
102. Everitt, BJ, Dickinson A, Robbins TW (2001) The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Res Rev* 36:129-138.
103. Everitt BJ, Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* 22(9):3312-3320.
- 20 104. Hyman SE, Malenka RC (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2:695-703.
105. Koob GF, LeMoal M (1997) Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation *Science* 278:52-58.
106. Koob GF, LeMoal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97-129.
- 25 107. Ellenbroek BA (2003), Animal models in the genomic era: possibilities and limitations with special emphasis on schizophrenia. *Behav Pharmacol* 14(5-6): 409-17.
108. Geyer MA et al (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156(2-3): 117-54.
- 30 109. Geyer MA, Ellenbroek B (2003) Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(7): 1071-9.
110. Honer WG et al (2002) Abnormalities of SNARE mechanism proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness. *Cereb Cortex* 12(4): 349-56.
111. Mimics K et al (2000), Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 28(1): 53-67.
- 35 112. Thomas MJ, C Beurrier, A Bonci, and RC Malenka (2001), Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat. Neurosci.* 4:1217-1223.
113. Metzler M, Li B, Gan L, Georgiou J, Gutekunst CA, Wang Y, Torre E, Devon RS, Oh R, Legendre-Guillemin V, Rich M, Alvarez C, Gertsenstein M, McPherson PS, Nagy A, Wang YT, Roder JC, Raymond LA, Hayden MR: Disruption of the endocytic protein HIP1 results in neurological deficits and decreased AMPA receptor trafficking. *Embo J* 22:3254-3266, 2003.
- 40 114. Kabouridis, PS, Biological Applications of Protein Transduction Technology *TIBS* 21: 498503, 2003.
115. Yen W, Williamson J, Bertram EH, Kapur J. A comparison of three NMDA receptor antagonists in the treatment of prolonged status epilepticus. *Epilepsy Res.* 2004 Mar;59(1):43-50.

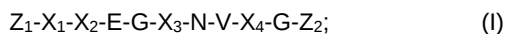
116. Kaul M, Lipton SA. Signaling pathways to neuronal damage and apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-associated dementia: Chemokine receptors, excitotoxicity, and beyond, *J Neurovirol.* 2004;10 Suppl 1:97-101.
117. Li J, Pelletier MR, Perez Velazquez JL, Carlen PL. Reduced cortical synaptic plasticity and GluR1 expression associated with fragile X mental retardation protein deficiency. *Mol Cell Neurosci.* 2002 Feb;19(2):138-51.
- 5 118. Johnston MV, Jeon OH, Pevsner J, Blue ME, Naidu S. Neurobiology of Rett syndrome: a genetic disorder of synapse development. *Brain Dev.* 2001 Dec;23 Suppl 1:S206-13.
119. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2003 Oct-Nov;34(4-5):325-37.
- 10 120. Corona JC, Tapia R. AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo. *J Neurochem.* 2004 May;89(4):988-97.
121. Rolling, F. Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives, *Gene Ther.* 2004 Oct;11 Suppl 1:S26-32.
122. Geoffroy MC, Epstein AL, Toublanc E, Moullier P, Salvetti A. Herpes Simplex Virus Type 1 ICP0 Protein Mediates Activation of Adeno-Associated Virus Type 2 rep Gene Expression from a Latent Integrated Form, *J Virol.* 2004 Oct;78(20):10977-86.
- 15 123. X. Lin et al, Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus, *Nature* 387:497, 1997.
124. F.J. Dominique et al, Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory, *Nature* 394:787, 1998.
- 20 125. Ordyan NE, Pivina SG. Characteristics of the behavior and stress-reactivity of the hypophyseal-adrenal system in prenatally stressed rats. *Neurosci Behav Physiol.* 2004 Jul;34(6):569-74.
126. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985 Aug;14(3):149-67.

Otras realizaciones

- 25 Los números de Acceso, tal como se utilizan aquí se refieren a los números de Acceso para múltiples bases de datos, incluyendo GenBank, el European Molecular Biology Laboratory (EMBL), la DNA Database of Japan (DDBJ), o el Genome Sequence Data Base (GSDB), para secuencias de nucleótidos, e incluyendo el Protein Information Resource (PIR), SWISSPROT, Protein Research Foundation (PRF), y el Protein Data Bank (PDB) (secuencias a partir de estructuras resueltas), así como a partir de traducciones de regiones codificadas anotadas de secuencias de nucleótidos en GenBank, EMBL, DDBJ, o RefSeq, para secuencias de polipéptidos. Los rangos numéricos son
- 30 incluyentes de los números que definen el rango. En la especificación, la palabra “que comprende” se utiliza como un término abierto, equivalente sustancialmente a la expresión “que incluye, pero no se limita a”, y la palabra “comprende” tiene un significado correspondiente. La citación de referencias aquí no debe considerarse como una admisión de que tales referencias son arte previo a la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que consiste de la fórmula I:



en donde

5 X_1 es Y, S, o T;

X_2 es K o R;

X_3 es Y, S, o T;

X_4 es Y, S, o T;

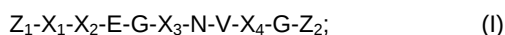
Z_1 es H_2N ;

10 Z_2 es $-C(O)OH$;

en donde "-" es un enlace covalente, y en donde el compuesto es un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA; y en donde cualquiera uno o más de X_1 , X_3 , o X_4 es un Y.

15 2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto inhibe la endocitosis del receptor de AMPA con una afinidad que es al menos tan grande como la afinidad de un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente de YREGYNVYGIE, YKEGYNVYGIE, YREGYNVYG, y YKEGYNVYG.

3. Un compuesto consistente de la fórmula I:



fusionado a o combinado con el péptido portador PEP-1 o un péptido portador que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR;

20 en donde en la fórmula I:

X_1 es Y, S, o T;

X_2 es K o R;

X_3 es Y, S, o T;

X_4 es Y, S, o T;

25 Z_1 es H_2N ;

Z_2 es $-C(O)OH$;

en donde "-" es un enlace covalente, y en donde el compuesto es un inhibidor de la endocitosis del receptor de AMPA; y en donde uno cualquiera o más de X_1 , X_3 , o X_4 es una Y.

4. Un polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos YKEGYNVYGIE.

30 5. Un polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos YKEGYNVYGIE fusionado o combinado con un péptido portador PEP-1 o un péptido portador que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR.

6. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 4 o 5.

7. Un anticuerpo que enlaza específicamente el polipéptido de la reivindicación 4.

8. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6,

el anticuerpo de la reivindicación 7, o del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la manufactura de un medicamento para tratar o prevenir daño o disfunción neurológica o abuso de sustancias en un sujeto.

5 9. El uso de la reivindicación 8, en donde el daño neurológico ocurre como resultado de activación excesiva de los receptores de NMDA o debido a cambios en la endocitosis del receptor de AMPA.

10 10. El uso de la reivindicación 8 o 9, en donde el daño o disfunción neurológico ocurre como resultado de al menos uno de un trastorno seleccionado del grupo consistente de estrés, ansiedad, depresión, hipoglicemia, paro cardíaco, epilepsia, isquemia cerebral, trauma cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington; dolor neuropático; esclerosis lateral amiotrófica (ALS); síndrome de Hutchinson Gilford; diabetes; ataxia; retardo mental; demencias, trastornos asociados con tabaco u obesidad, presión sanguínea elevada, trastornos asociados con defectos o disfunción en aprendizaje o memoria, trastornos psiquiátricos, autismo, esquizofrenia, síndrome X frágil, y trastornos asociados con abusos de sustancias o adicción a un fármaco.

15 11. Uso de polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6, el anticuerpo de la reivindicación 7 o del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la manufactura de un medicamento para modular la apoptosis neuronal mediada por NMDA o para modular la endocitosis del receptor de AMPA, o para modular la plasticidad sináptica en un sujeto.

12. Un método para modular la apoptosis neuronal mediada por NMDA *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto una célula neuronal con el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 o 5.

20 13. Un método para modular la endocitosis del receptor de AMPA *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto una célula que expresa un receptor de AMPA con el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el polipéptido de la reivindicación 4 o 5.

25 14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11 o el método de la reivindicación 12 o 13, en donde el compuesto o polipéptido es fusionado a o combinado con el péptido portador PEP-1 o un péptido portador que tiene la secuencia de aminoácido YGRKKRRQRRR.

15. Un método para cribar un modulador de la endocitosis del receptor de AMPA, comprendiendo el método:

(a) proveer un sistema que comprende

(i) un polipéptido receptor de AMPA o un fragmento biológicamente activo del mismo;

(ii) un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el polipéptido de la reivindicación 4 o 5;

30 (b) proveer un compuesto de prueba;

(c) poner en contacto el sistema con el compuesto de prueba; y

(d) determinar si el compuesto de prueba modula la endocitosis del receptor de AMPA.

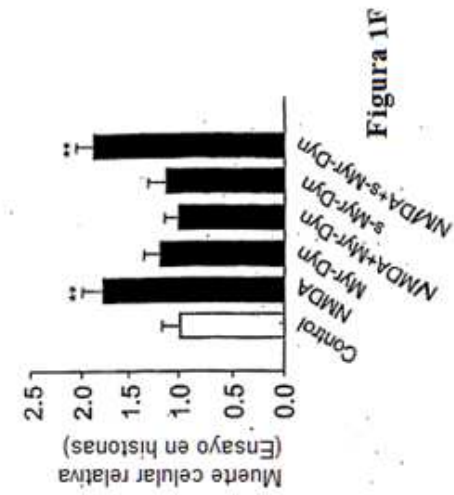
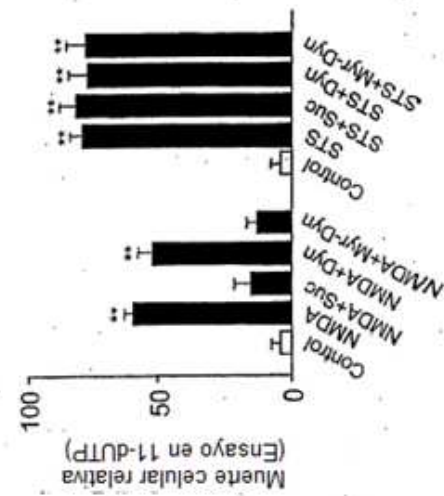
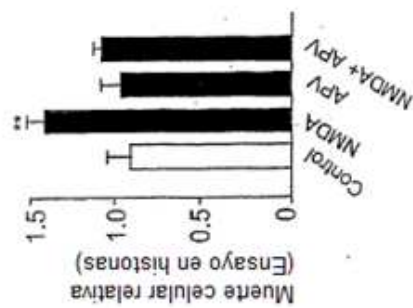
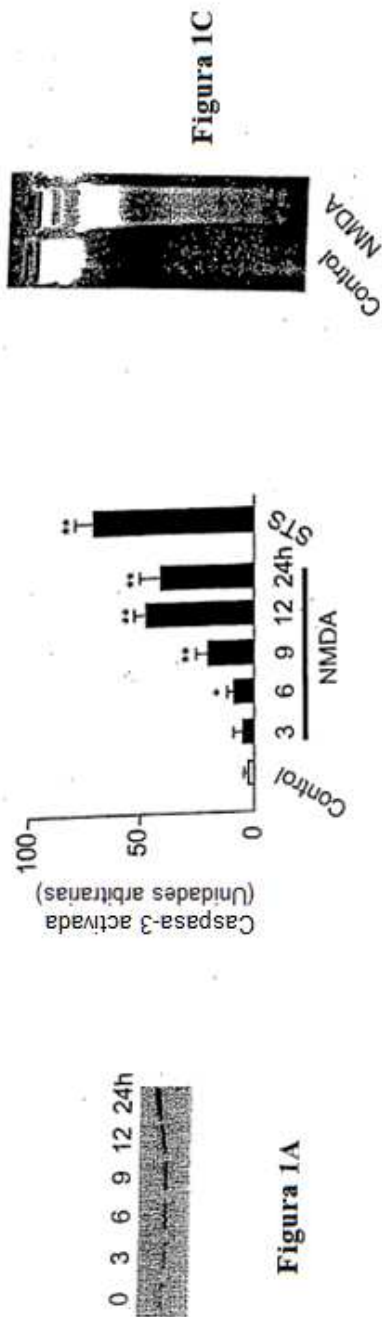


Figura 2A

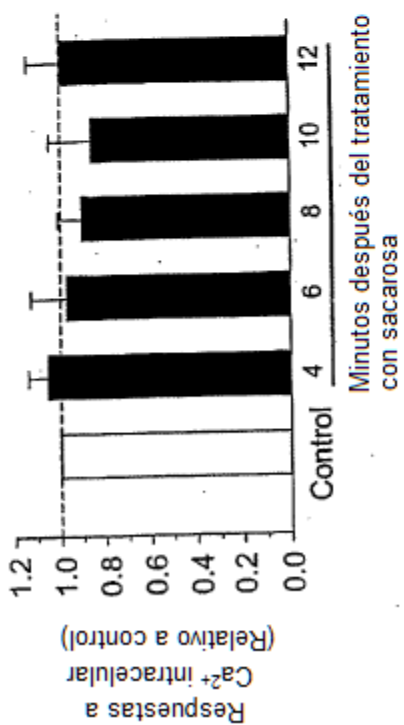
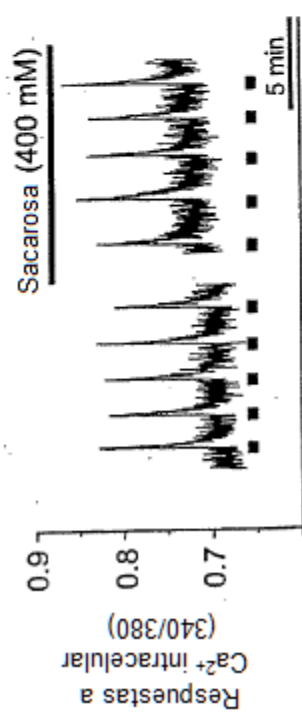


Figura 2B

Figura 2C

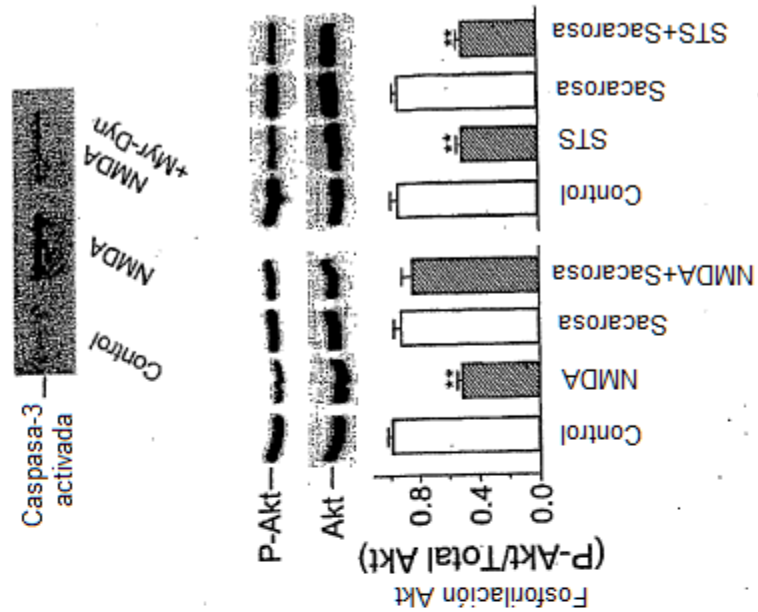


Figura 2D

Figura 3B

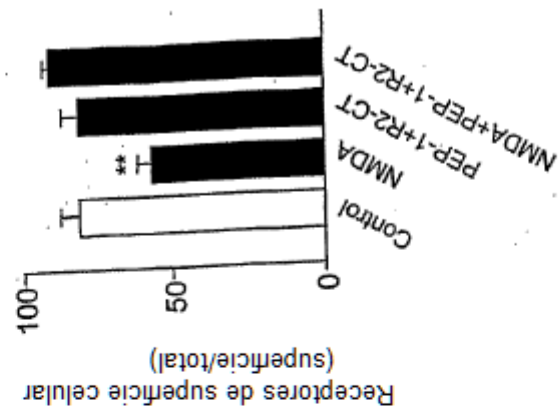


Figura 3A

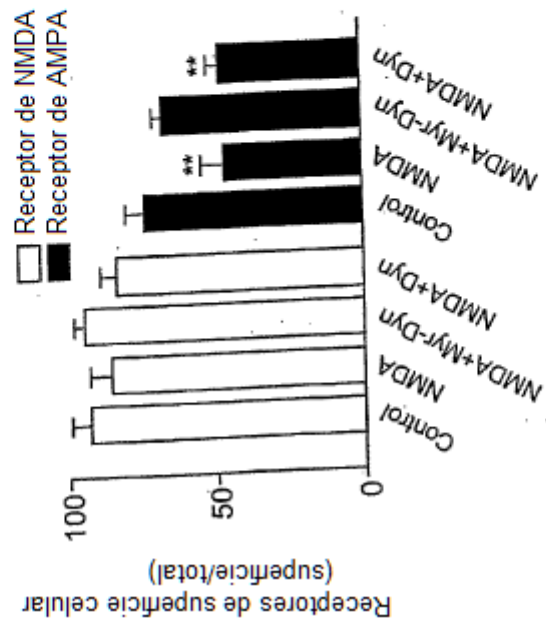


Figura 4A

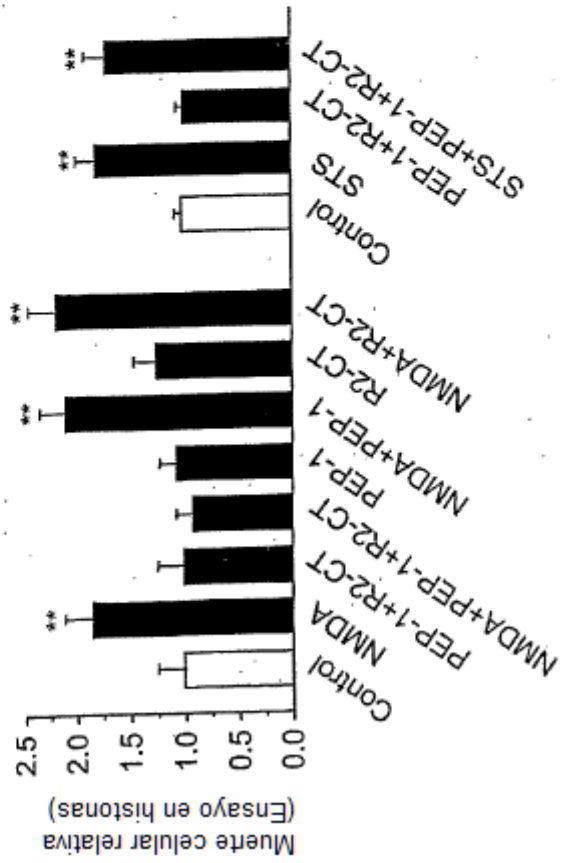


Figura 4B

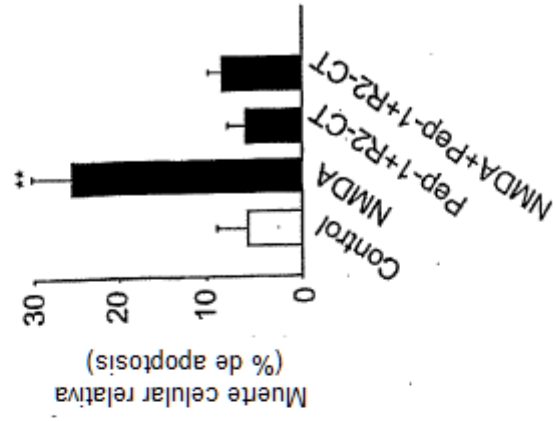


Figura 5A

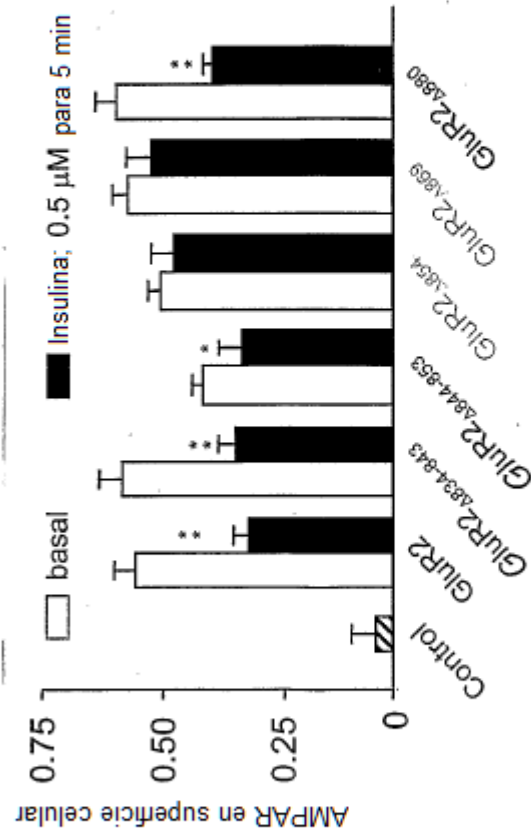


Figura 5B

Figura 6A

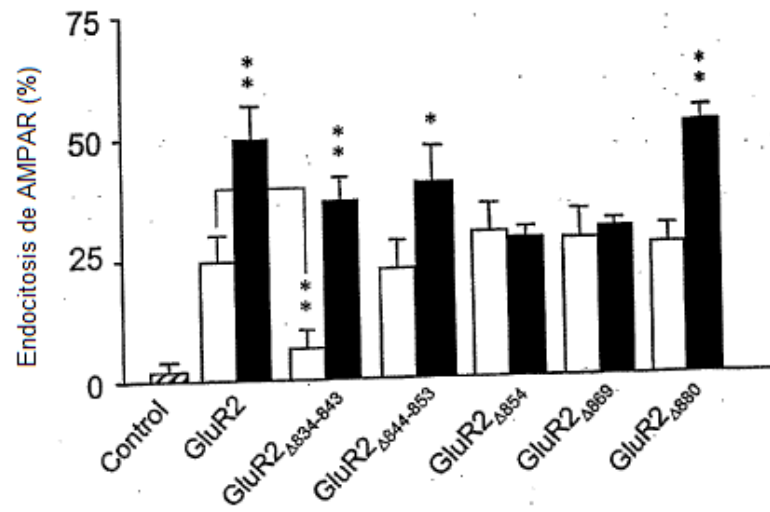


Figura 6B

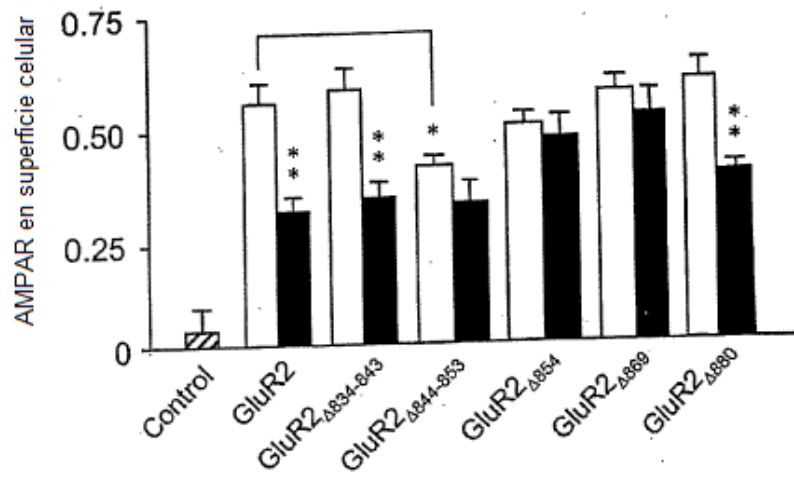
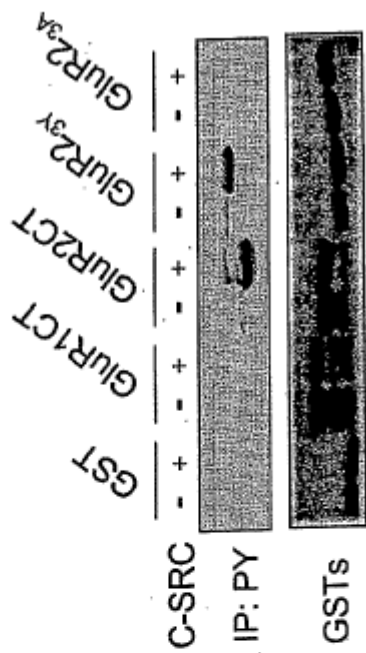


Figura 7A



- 1. GST
- 2. GST-GluR1CT
- 3. GST-GluR2CT
- 4. GST-GluR2_{3Y} (GST-YKEGYNVYG)
- 5. GST-GluR2_{3A} (GST-AKEGANVAG)

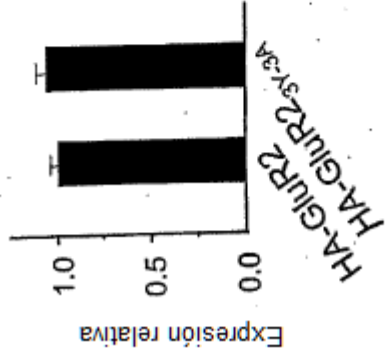


Figura 7B

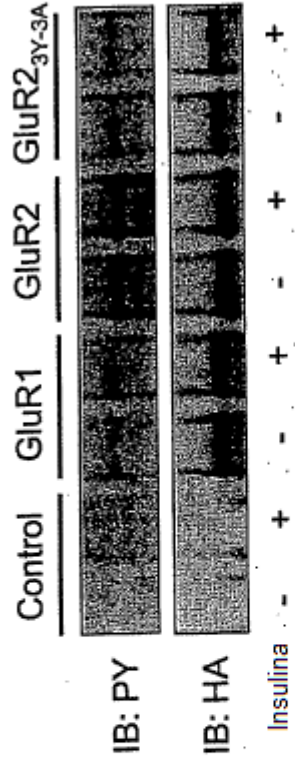


Figura 7C

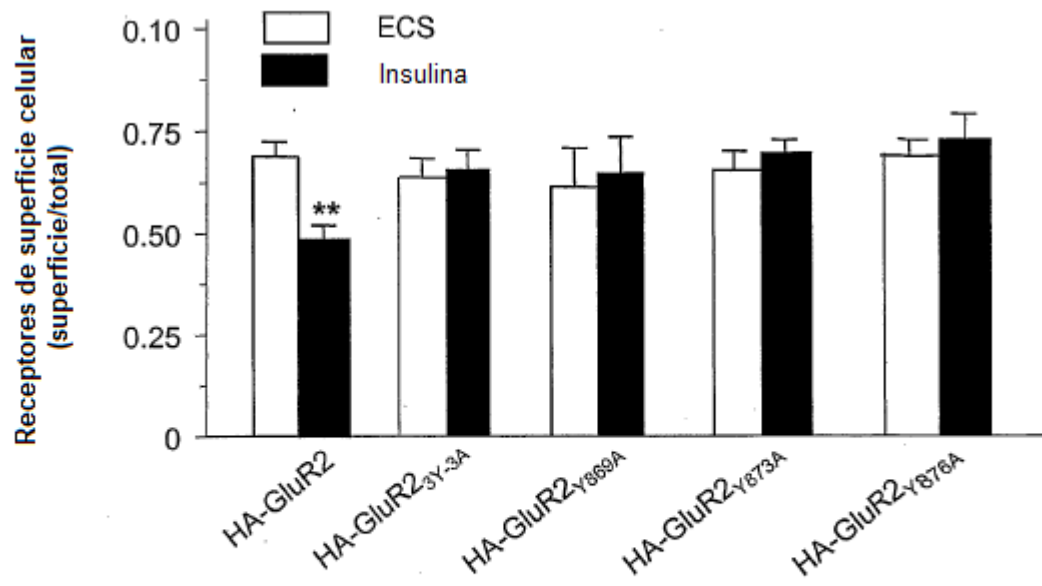


Figura 7D

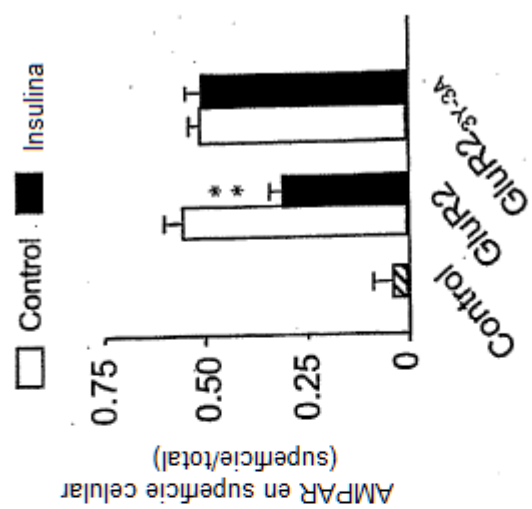


Figura 8B

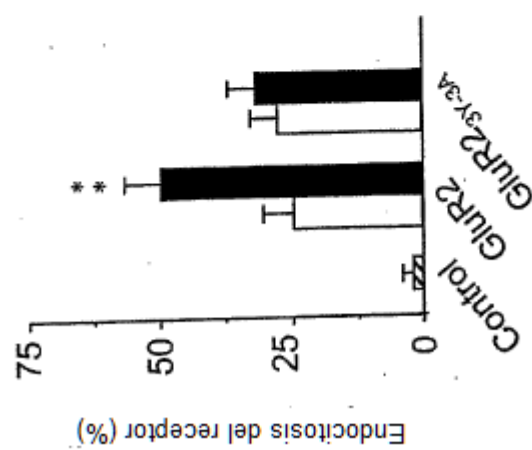


Figura 8A

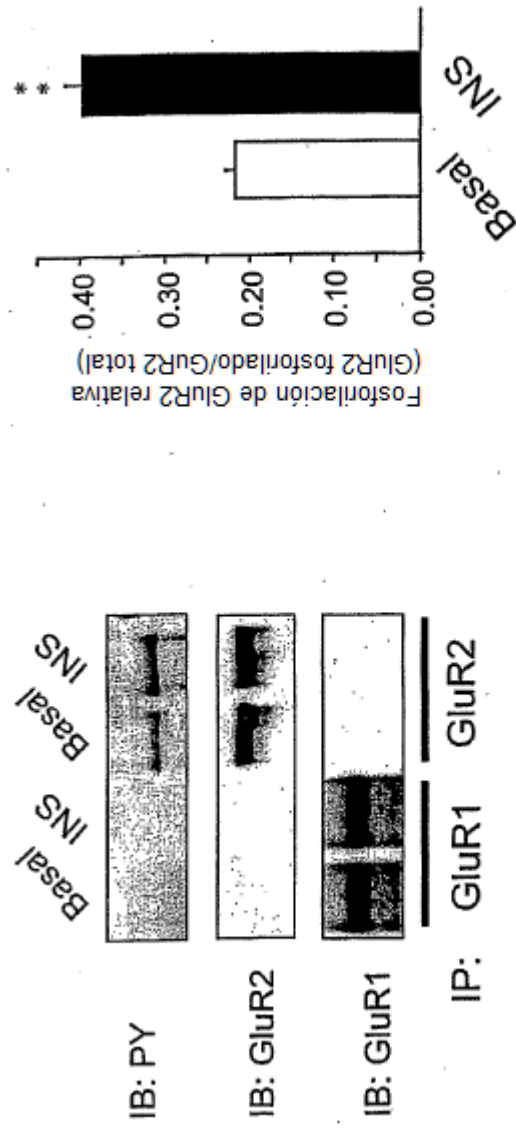


Figura 9A

Figura 9B

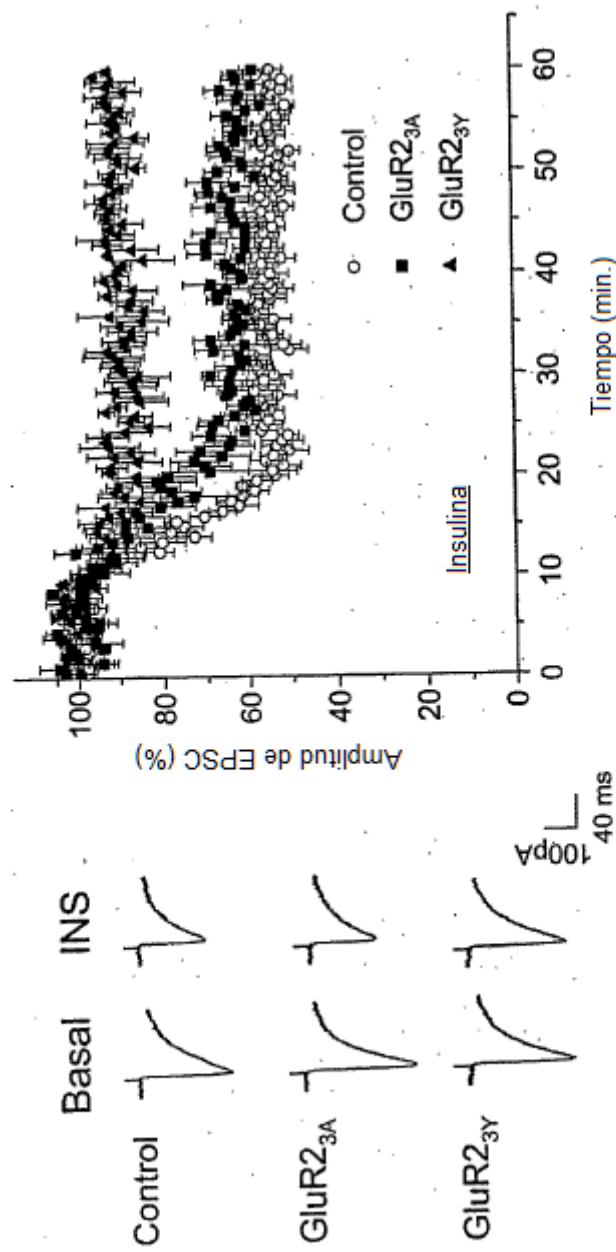


Figura 9D

Figura 9C

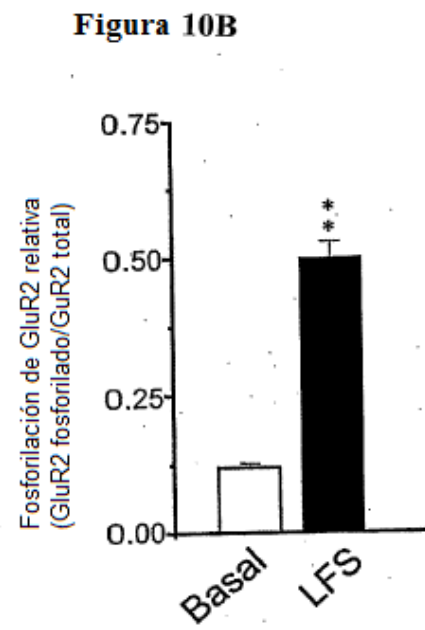
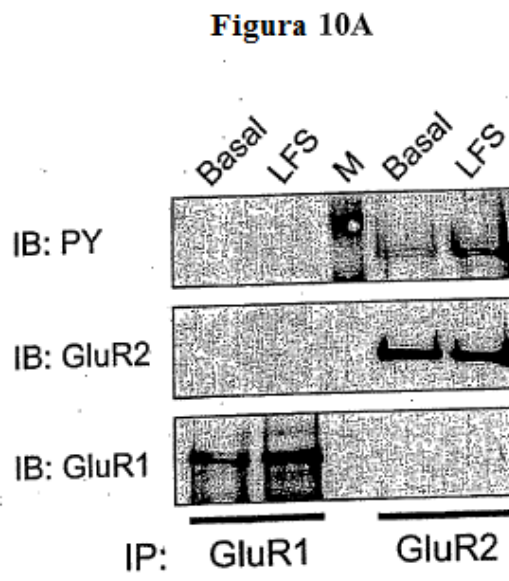


Figura 10C

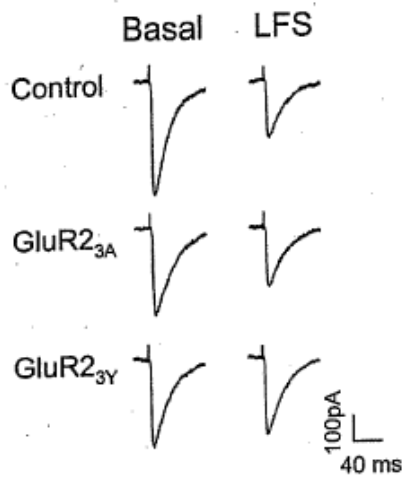


Figura 10D

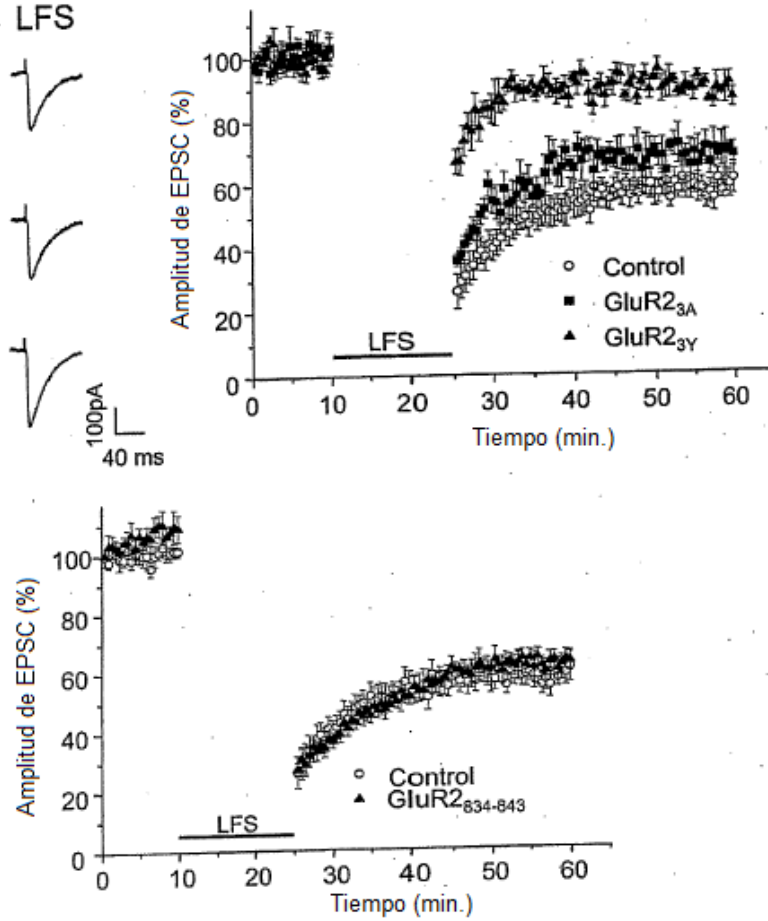


Figura 10E

Figura 11A

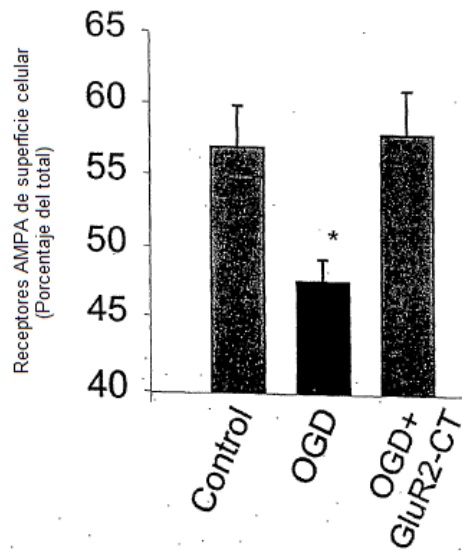


Figura 11B

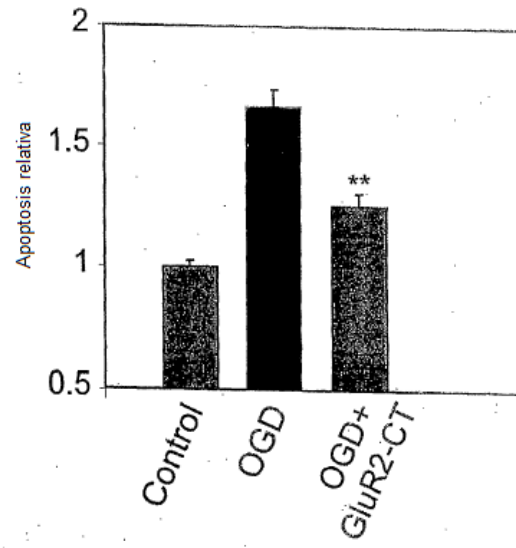


Figura 12A

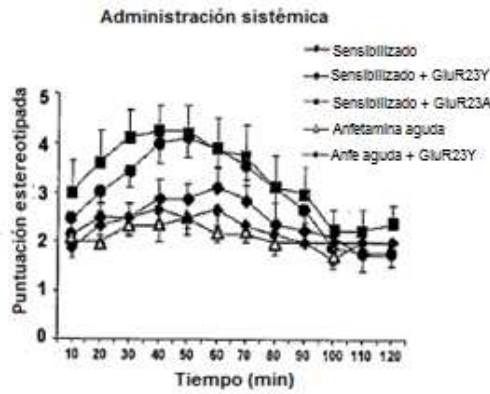


Figura 12B

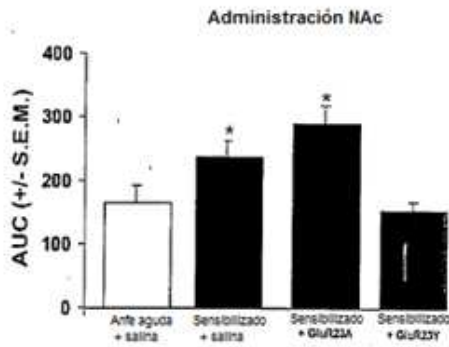
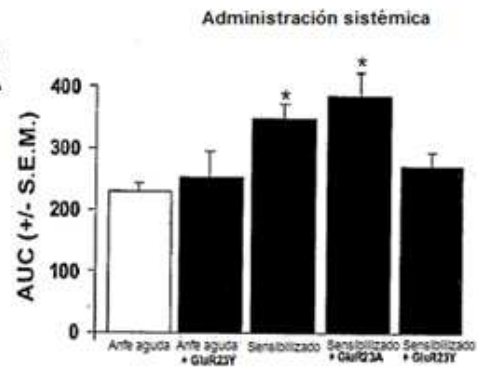


Figura 12C

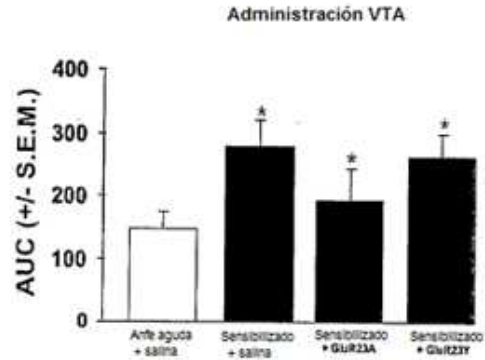


Figura 12D

Figura 13

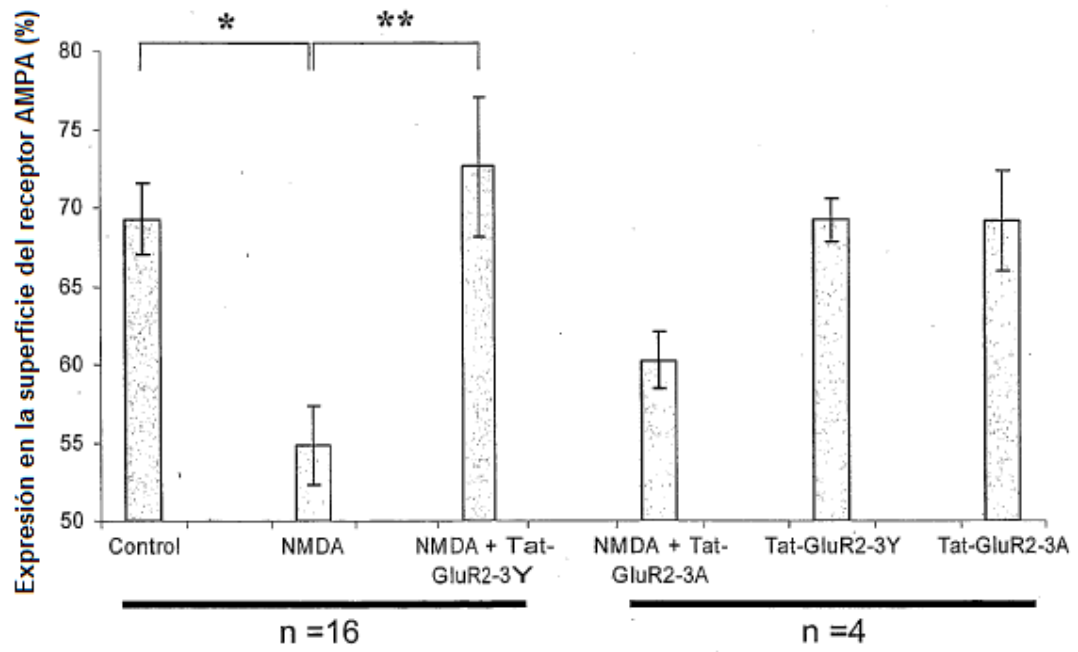
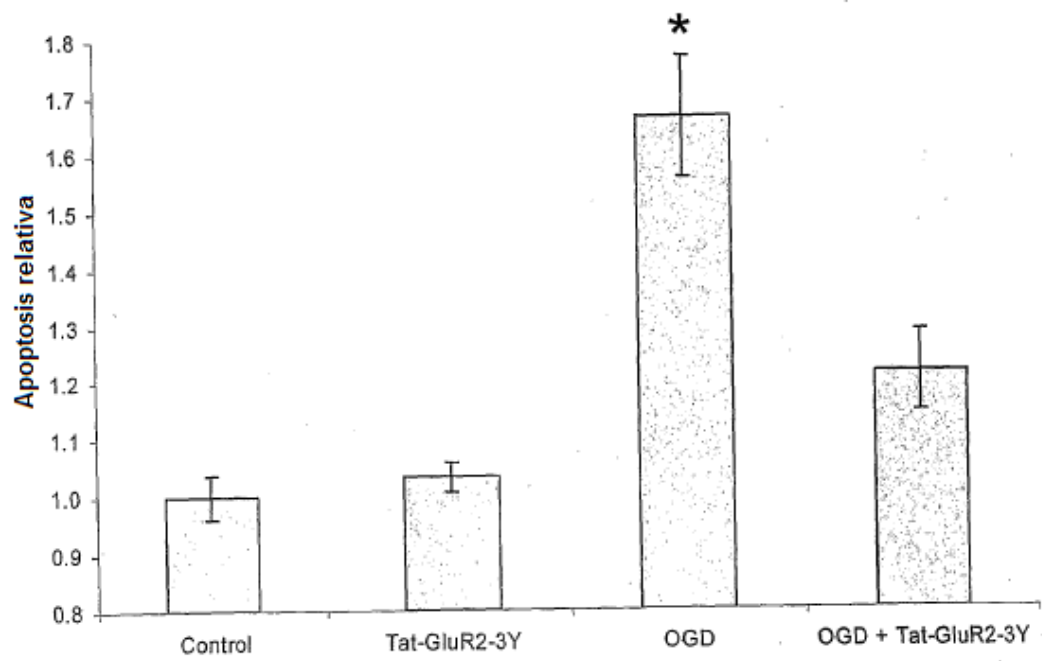


Figura 14



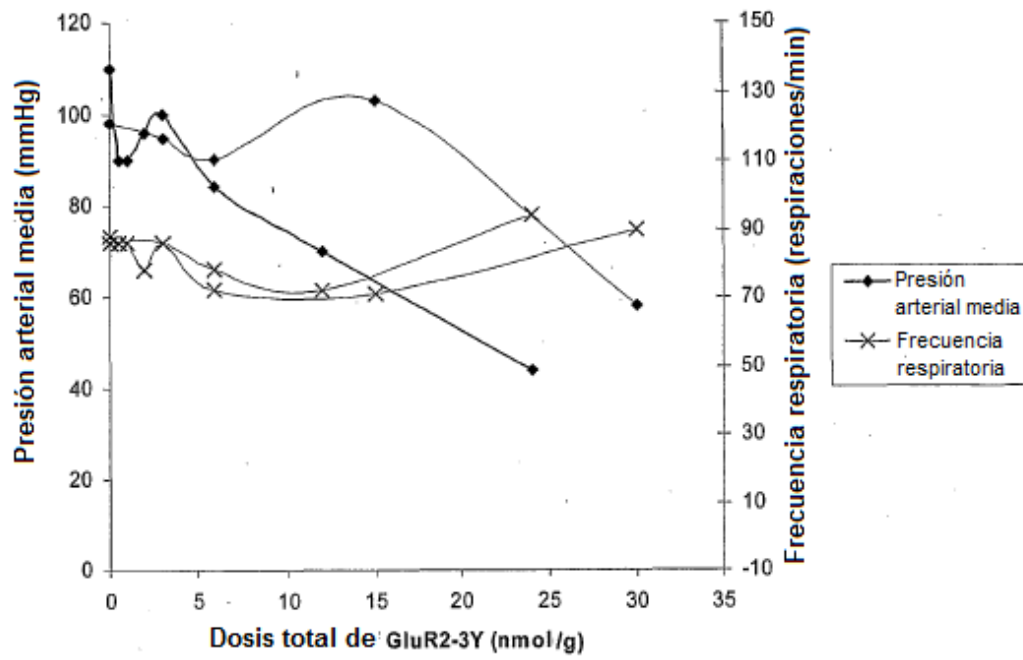


Figura 15

Figura 16

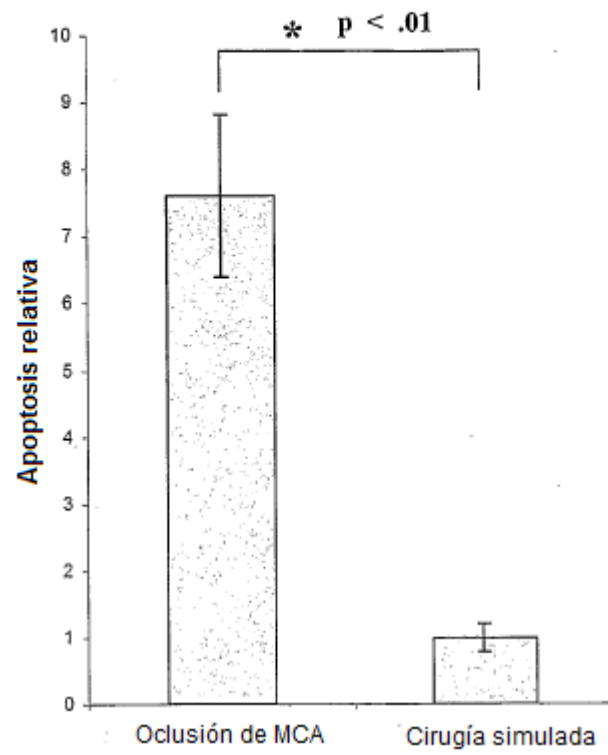


Figura 17A

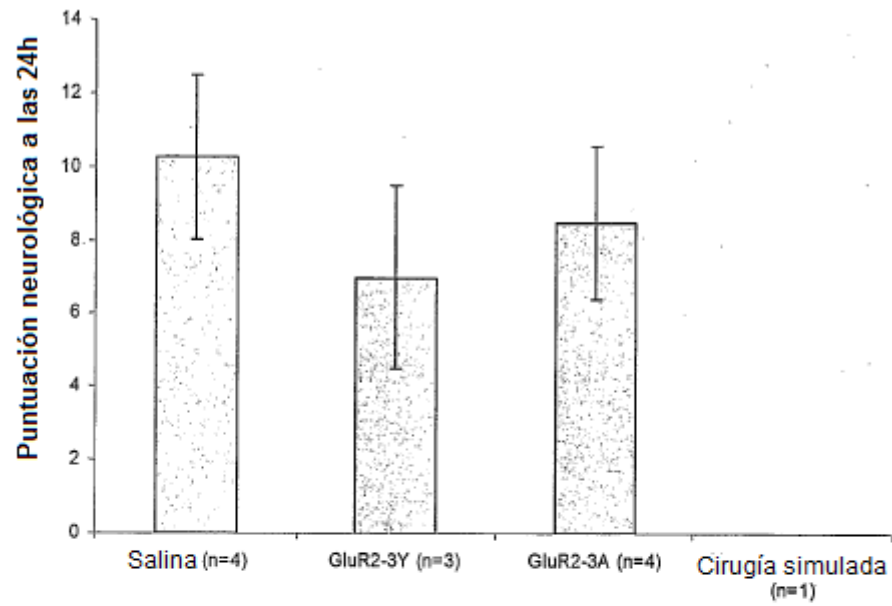


Figura 17B

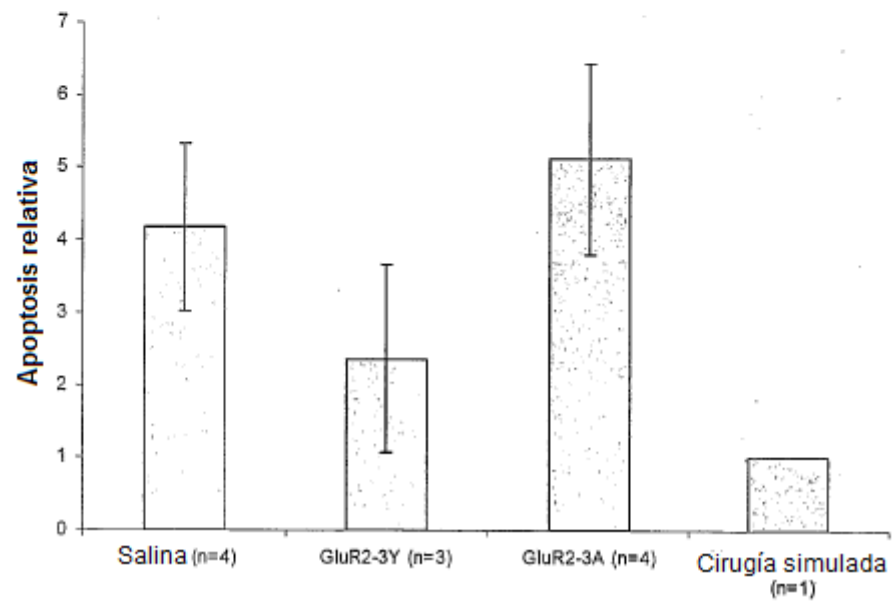


Figura 18A

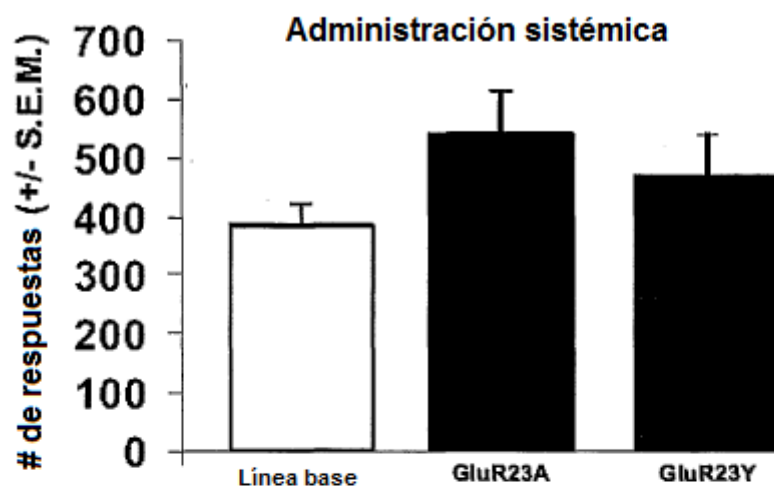
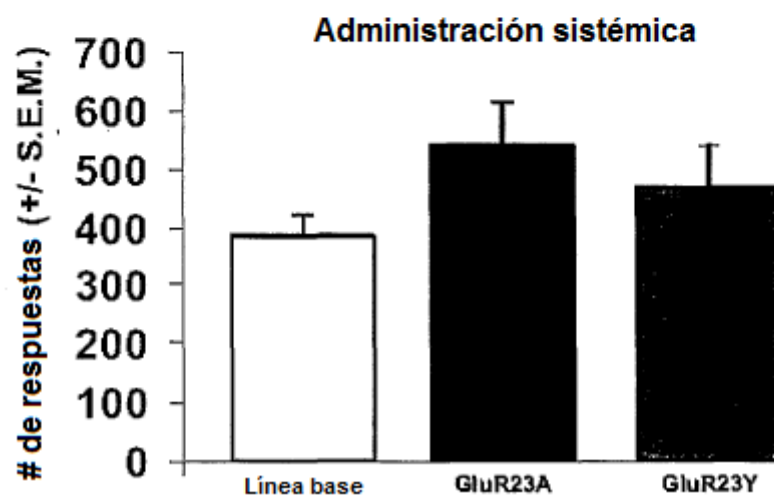


Figura 18B



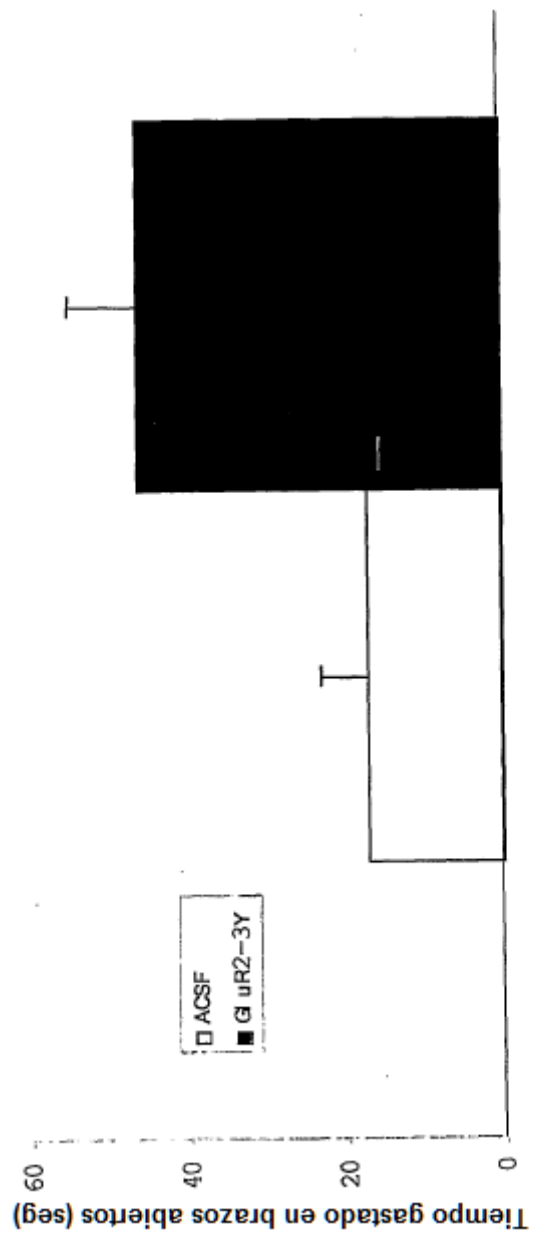


Figura 19