

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 543**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/GB2014/052041**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15004430**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14736948 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 3019591**

54 Título: **Trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

09.07.2013 GB 201312279

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

19.01.2018

73 Titular/es:

**NEURO-BIO LTD (100.0%)
Building F5, Culham Science Centre
Abingdon, Oxfordshire OX14 3DB, GB**

72 Inventor/es:

GREENFIELD, SUSAN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 650 543 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

Trastornos neurodegenerativos

5 La invención se refiere a trastornos neurodegenerativos y en particular a composiciones novedosas, terapias y procedimientos para tratar dichas afecciones, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer.

10 La enfermedad de Alzheimer afecta principalmente a hombres y mujeres de más de 65 años de edad y la probabilidad de ser diagnosticados con la enfermedad aumenta sustancialmente con la edad. El porcentaje de adultos de más de 65 años de edad espera crecer a nivel mundial durante los próximos 40 años, se espera que la incidencia de la enfermedad de Alzheimer sea más del doble, llegando de 21 millones de casos en el 2010 a 53 millones en el 2050 (estadísticas de www.alzheimersresearchuk.org y www.alz.org). Este aumento exponencial en el número esperado de pacientes que presentan enfermedad de Alzheimer no solo representa un área principal de la necesidad médica no satisfecha, si no que ofrece una oportunidad significativa de mercado para terapéuticos y diagnósticos ya que actualmente no hay un método completamente efectivo para tratar la enfermedad.

20 No ha habido un nuevo fármaco para combatir específicamente la enfermedad de Alzheimer, ni la neurodegeneración más generalmente, en los últimos 10 años. La razón es que, hasta el momento, aún no se ha identificado el mecanismo básico subyacente que, en consecuencia, podría ser dirigido farmacéuticamente. El principal contendiente para explicar el proceso de neurodegeneración es la "hipótesis amiloide", donde la muerte neuronal se atribuye a la interrupción de la membrana celular por depósitos tóxicos de amiloides, característicos del cerebro de Alzheimer post-mortem y que resultan de la división anormal de la proteína precursora amiloide. Sin embargo, esta "hipótesis amiloide" no explica la Copatología frecuentemente observada con las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, ni la selectividad característica de las células vulnerables a degeneración, ni la ausencia de depósitos amiloide en modelos demencia animal, ni de hecho la aparición de amiloides en determinadas regiones del cerebro en donde no son evidentes los déficits cognitivos. A pesar de la popularidad de la formación amiloide como un objetivo farmacéutico en las últimas dos décadas, ningún tratamiento basado en esta teoría ha demostrado ser efectivo. Una posibilidad más probable es que una vez el proceso neurodegenerativo está en marcha, entonces los amiloides se generaran adicionalmente como un efecto secundario, exacerbador que es menos específico.

30 Una pista para identificar el mecanismo primario de neurodegeneración, puede ser que solamente solo arios grupos neuronales son principalmente vulnerables. Adicionalmente, los subgrupos de células diversas propensas a enfermedades neuromotrices de Alzheimer y Parkinson, sin embargo, adyacentes entre sí y forman un "centro" continuo, que se extiende desde el tallo cerebral hasta el prosencéfalo y todas envían proyecciones difusas hacia arriba y hacia afuera hacia los centros cerebrales superiores. Por lo tanto, a pesar de su heterogeneidad en los transmisores, estos grupos neuronales han sido denominados colectivamente neuronas "Globales" para distinguirlas de los circuitos celulares localizados y más familiares en la mayoría de las otras partes del cerebro, tales como el cerebelo, tálamo, corteza, etcétera. Estas neuronas globales selectivamente vulnerables se identificaron anteriormente, aunque utilizando una terminología diferente ("núcleo isodendrítico") como pivote en la neurodegeneración hace varias décadas.

45 Los subgrupos de neuronas globales tienen una característica específica en común que puede explicar la pregunta desconcertante y sin respuesta de porque solamente estas células sucumban a la muerte progresiva mientras que sus contrapartes en otras partes en la cerebro, incluso cuando se dañan por accidentes cerebrovasculares, no: retienen una plasticidad robusta en y a través de la adultez, acompañada por una sensibilidad específica a sustancias que ayudan y sostienen el crecimiento -"factores tróficos". En el desarrollo del cerebro, los factores tróficos funcionan al estimular el flujo de calcio, que activa una cascada de eventos dentro de la célula, que resultan eventualmente en crecimiento y diferenciación selectiva. Sin embargo, en mayores dosis o con exposiciones más grandes, la entrada de calcio sostenida puede ser tóxica para las neuronas. Más significativamente, un factor de determinación adicional en sí o no la entrada de calcio activa efectos tóxicos o tróficos, es la edad: a medida que las neuronas maduran, se vuelve letal un nivel trófico anterior de calcio intracelular.

55 El inventor ha propuesto previamente que el proceso neurodegenerativo es de hecho un proceso de desarrollo activado de forma aberrante. En apoyo de esta hipótesis, se ha informado de una hipertrofia de las neuronas "núcleo" del tallo cerebral con cerebros con Alzheimer (Bowser et al., 1997, Brain Pathol. 7:723-30). Si las áreas grandes de este núcleo se dañan, entonces se presentará más de una enfermedad neurodegenerativa, como ocurre en los casos frecuentemente vistos, pero nunca explicados aun de copatología con enfermedades de Parkinson y de Alzheimer. De manera interesante, todas las neuronas dentro del núcleo vulnerable de neuronas Globales, a pesar de la heterogeneidad del transmisor, todas contienen la enzima familiar acetilcolinesterasa (AChE). La AChE está por lo tanto presente en neuronas en el que sería incapaz de realizar su función normal, en razón a que dichos subgrupos de células como los locus coeruleus noradrenérgicos, la substantia nigra dopaminérgica o los núcleos rafe serotoninérgicos, en ningún caso contienen el sustrato usual, acetilcolina. Una desviación no esperada adicional de su normal, la función enzimática es que el AChE se libera actualmente de neuronas Globales, presumiblemente como algún tipo de mensajero intracelular en sí mismo. En general, el AChE está ahora ampliamente bien establecido como una molécula de señalización que tiene actividad trófica en una variedad diversa de situaciones

tanto en tejido neuronal como no neuronal.

El inventor ha demostrado previamente que el AChE, que funciona como un agente trófico independiente de su acción enzimática, de hecho, activa la entrada de calcio en las neuronas. Por lo tanto, es posible que, dentro de las neuronas Globales, el AChE tenga una acción no clásica dual que varía a lo largo de un eje trófico-tóxico, dependiendo de la cantidad, duración de la disponibilidad y, más significativamente, de la edad. Si las neuronas estándar se dañan en la adultez, como en un accidente cerebrovascular, otros compensaran la funcionalidad. En contraste, las neuronas Globales responderán ha llamado de sus recursos tróficos en un intento de regeneración. Pero debido al posterior influjo de calcio será letal en las células maduras, más viejas, el daño resultante activará intentos adicionales para compensar en un ciclo pernicioso que caracteriza la neurodegeneración.

La acetilcolinesterasa (AChE) se expresa en diferentes etapas del desarrollo en diversas formas, todas las cuales tienen actividad enzimática idéntica, pero que tienen diferente composición molecular. La "cola" (T-AChE) se expresa en la sinapsis y los inventores han identificado previamente dos péptidos que se pueden dividir del terminal C, uno denominado como "T14", dentro del otro que se conoce como "T30", y que ambos tienen fuerte homología de secuencia a la región comparable de β -amiloide (véase figura 11; y SEQ ID NO: 2-5). El péptido "T14" de terminal C de AChE se ha identificado como la parte principal de la molécula AChE responsable de su gama de acciones no hidrolíticas. El análogo de péptidos de aminoácidos 14 sintético (es decir, "T14") y posteriormente la secuencia de aminoácidos más grande, más estable y más potente en la que se incorpora (es decir, "T30") Muestra acciones comparables con aquella notificadas para AChE "no colinérgicos", en el que el residuo inerte dentro de la secuencia T30 (es decir, "T15") no tiene efecto.

Los efectos agudos de T14 y T30 son que: (i) modulan la entrada de calcio en neuronas en rebanadas de cerebro en escalas de tiempo de milisegundos a horas; (ii) compromete viabilidad celular en células PC 12 y también en cultivos neuronales organotípicos in vitro. (iii) modula la liberación de AChE inducida por calcio "compensadora" de neuronas y células PC 12; (iv) activan corrientes de calcio en ovocitos y neuronas en rebanadas de cerebro; (v) hace sinergia con amiloides en efectos tóxicos; y (vi) están implicadas en la producción de proteína precursora amiloide y liberación de péptidos beta amiloides. Efectos crónicos de T14 y T30 son que: (i) reducen el crecimiento neuronal; (ii) inducen apoptosis; (iii) aumentan la liberación de AChE; (iv) se unen a y modulan el receptor nicotínico $\alpha 7$; y (v) mejora la expresión del receptor $\alpha 7$ sobre la superficie celular durante 24 horas, proporcionando de este modo un mecanismo de alimentación hacia adelante para mayor toxicidad.

En razón a que T14 y T30 son más selectivos que los β -amiloide para inducir toxicidad y también son sinérgicos con amiloides que exacerbaban la toxicidad, se ha postulado que cualquier agente que bloquea el efecto de T14 o T30 también reduciría el efecto tóxico menos selectivo y posterior de los amiloides. El inventor ha demostrado previamente que los péptidos T30 y T14 unidos a un sitio alostérico el receptor nicotínico $\alpha 7$ inducen un espectro de efectos tróficos-tóxicos. Este receptor se coexpresa con AChE durante períodos críticos del desarrollo del cerebro, así como demuestran una distribución cercanamente paralela en el cerebro adulto y es uno de los ionóforos de calcio más poderosos en el cerebro. También puede funcionar independiente de la transmisión colinérgica, en razón a que la colina (derivada de la dieta) puede servir como un ligando primario alterno. Mas aun, este receptor ya ha estado implicado en la enfermedad de Alzheimer como uno de los objetivos de la terapia actual de galantamina (Reminyl (RTM)), además de estar relacionada con las acciones del amiloide.

Sin embargo, la eficacia de la galantamina ha resultado limitada, mientras que otros antagonistas de receptor acetilcolina nicotínica $\alpha 7$ todavía están en ensayos clínicos. La galantamina tiene una baja afinidad por el receptor nicotínico $\alpha 7$ (es decir, solamente 10 μ M) en comparación con aquel de T30 y T14, que tienen afinidad mucho mayor por el receptor nicotínico $\alpha 7$ (es decir, 5 nM). Por lo tanto, si en un cerebro de Alzheimer, el equivalente endógeno del péptido T30 ya está ocupando el sitio respectivo del receptor, la galantamina tendría que administrarse en altas dosis no fisiológicas, con efectos secundarios inevitables y lo más importante, eficacia cuestionable.

El documento WO 02/14351 A2 divulga péptidos cíclicos derivados del receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 ($\alpha 7$ -nAChR) que inhibe la interacción de péptidos beta amiloides con $\alpha 7$ nAChR. Estos péptidos cíclicos se pueden utilizar para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer.

El documento WO 00/73427 A2 divulga péptidos cíclicos derivados de la secuencia de aminoácidos acetilcolinesterasa (AChE). Estos péptidos se pueden utilizar para tratar trombocitopenia, afecciones posteriores a quimioterapia o afecciones que siguen a la pérdida masiva de sangre.

Cherio E. Bond et al ("Upregulation of [alpha]7 Nictinic Receptors by Acetylcholinesterase C-Terminal Peptides", PLOS ONE, vol. 4, no. 3, 16 March 2009, page e4846) demuestran una relación entre la $\alpha 7$ -nAChR y las funciones no-enzimáticas de AChE, mediadas independientemente por su dominio de terminal C.

Susan Greenfield ("Discovering and targeting the basic mechanism of neurodegeneration: The role of peptides from the C-terminus of acetylcholinesterase: Non-hydrolytic effects of ache: The actions of peptides derived from the C-terminal and their relevance to neurodegeneration", CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS, vol. 203, no. 3, 3 April 2013, pages 543-546) se centra en la observación de que el AChE, que funcionan como un agente trófico

independiente de su acción enzimática, activa la entrada de calcio en las neuronas.

Por lo tanto, subsiste la necesidad de proporcionar un medicamento mejorado para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, tal como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

5 Como se describe en los ejemplos, el inventor ha demostrado sorprendentemente que un péptido cíclico derivado del terminal C de AChE se puede utilizar para inhibir selectivamente los efectos no clásicos de AChE y/o su péptido terminal in vitro (es decir, los efectos de AChE que son independientes de su actividad enzimática), y por lo tanto tratar efectivamente trastornos neurodegenerativos.

10 De esta manera, de acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un péptido cíclico que consiste de la SEQ ID No: 4.

15 Los polipéptidos cíclicos son cadenas de péptidos cuyo terminal N y terminal C se ligan en si mismos junto con un enlace peptídico que forma una cadena circular de aminoácidos. Como se describe en los ejemplos, el inventor ha demostrado sorprendentemente que la ineficacia de la protección contra la acción no específica de peróxido de hidrógeno sugeriría que la acción de bloqueo del polipéptido cíclico del primer aspecto es altamente selectivo y mediado por receptor. El inventor también está muy sorprendido en observar que los polipéptidos cíclicos de la invención antagonizan los efectos tóxicos de los péptidos lineales conocidos, T14 y T30, en una variedad de pruebas que indican que evitan el influjo adicional de calcio a través de un sitio alostérico (por ejemplo, un sitio alostérico sensible a la ivermectina) del receptor nicotínico $\alpha 7$ y superan efectivamente la unión de los péptidos T14 y T30 lineales, así como el β -amiloide. Por lo tanto, el péptido cíclico puede ser un antagonista selectivo del receptor nicotínico $\alpha 7$.

25 Sin embargo, los inventores han mostrado que los polipéptidos cíclicos de la invención actúan como un modulador alostérico inerte del receptor nicotínico $\alpha 7$ que antagoniza la acción de los péptidos beta amiloide y T30. Por lo tanto, preferiblemente el polipéptido cíclico es un modulador alostérico selectivo del receptor nicotínico $\alpha 7$, más preferiblemente un modulador alostérico selectivo inerte del mismo. El término "inerte" puede significar que el polipéptido de la invención sólo actúa como un modulador alostérico del receptor en la presencia de compuestos tóxicos, es decir, péptidos beta amiloides y T30 (β -amiloide).

30 Preferiblemente, el polipéptido cíclico evita el influjo adicional de calcio a través de un sitio alostérico (más preferiblemente, un sitio alostérico sensible a la ivermectina) del receptor nicotínico $\alpha 7$. Se prefiere que el polipéptido cíclico supere la unión del β -amiloide.

35 No se podría haber predicho que el péptido de la invención superaría el equivalente endógeno del péptido T30 que ya ocupa el sitio del receptor respectivo. Adicionalmente, la estabilidad mejorada del péptido cíclico reemplazaría este desplazamiento efectivo. De acuerdo con lo anterior, el polipéptido cíclico evita los efectos tóxicos previamente establecidos de los péptidos T14, T30 lineales y también β -amiloides. El inventor considera por lo tanto que el polipéptido cíclico de la invención tendrá significativa utilidad para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos en la estabilización y pérdida adicional de células.

40 El término "derivado de" puede significar una secuencia de aminoácidos que es un derivado o una modificación de una secuencia de aminoácidos que estará presente en, o forma, el terminal C de AChE y parte del mismo.

45 Preferiblemente, el polipéptido cíclico se purifica y/o aísla, es decir, no se encuentra en la naturaleza.

50 La acetilcolinesterasa es una proteasa serina que hidroliza la acetilcolina, y será bien conocida por el experto. La forma principal de acetilcolinesterasa que se encuentra en el cerebro es conocida como acetilcolinesterasa de cola (TACHÉ). Dado que la invención se relaciona principalmente con el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, se prefiere que polipéptido cíclico comprende una secuencia de aminoácidos derivada del terminal C de acetilcolinesterasa de cola (TACHÉ), o un truncamiento de la misma.

55 La secuencia de proteína de una realización de acetilcolinesterasa de cola (Gen Bank: AAA68151.1) tiene 614 aminoácidos de longitud y se proporciona aquí como la SEQ ID NO: 1, como sigue:

```

1 mrppqcllht pslaspllll llwllgggvg aegredaell vtvrgrlrg irlktpggpv
61 saflgipfae ppmgprflp pepkqpwsgv vdattfqsvc yqyvdtlypg fegtemwnpn
121 relsedcyl nwtpyrprt sptpvlvwiy gggfysgass ldvydgrflv qaertvlvsm
181 nyrvgafgfl alpgsreapg nvglldqrla lqwvqenvaa fggdptsvtl fgesagaasv
241 gmhllsppsr glfhravlqs gapngpwatv gmgearrrat qlahlvgcpp ggtggndtel
301 vaclrtrpaq vlvnhewhvl pquesvfrfsf vpvvdgdfls dtpealinag dfhglqvlvg
361 vvkdegisyfl vygapgfskd neslisraef lagvrvgvpq vsdlaaeavv lhytdwlhpe
421 dparlreals dvvgdhnvvc pvaqlagrla aqgarvyayv fehrastlsw plwmgvphgy
481 eiefifgipl dpsrnytaee kifaqrlmry wanfartgdp neprdpkapq wppytagaqq
541 yvslldlrple vrrglraqac afwnrflpkl lsatdtldea erqwkaefhr wssymvhwkn
601 qfdhyskqdr csdl

```

[SEQ ID No:1]

Se apreciará que los primeros 31 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No: 1 se eliminan mientras que la proteína se libera, dejando por lo tanto una secuencia de 583 aminoácidos. Esta divulgación describe un polipéptido cíclico que comprende una secuencia de aminoácidos derivada del terminal C de acetilcolinesterasa, o un truncamiento de la misma, en el que la acetilcolinesterasa comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se establece en la SEQ ID No: 1, que excluye preferiblemente los 31 aminoácidos en el terminal N.

Esta divulgación describe un polipéptido cíclico que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de por lo menos 300, 200, 100 o 50 aminoácidos que forman el terminal C del acetilcolinesterasa o un truncamiento del mismo, preferiblemente en el que la acetilcolinesterasa comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se establece en la SEQ ID No: 1. La divulgación describe un polipéptido cíclico que comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos derivada de los últimos 40 aminoácidos que forman el terminal C de la acetilcolinesterasa o un truncamiento la misma.

Esta divulgación describe un polipéptido cíclico que comprende entre 8 y 40 residuos de aminoácidos, más preferiblemente entre 10 y 30 aminoácidos y más preferiblemente entre 12 y 20 aminoácidos. Como se muestra en la figura 11, el inventor ha preparado una secuencia de alineación entre β -amiloides ($A\beta$) y tres péptidos que se derivan del terminal C de CAhE, que se denominan aquí como T30, T14 y T15.

La secuencia de aminoácidos de parte del β -amiloides ($A\beta$) se proporciona aquí como SEQ ID No: 2, como sigue:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

[SEQ ID No:2]

La secuencia de aminoácidos de T30 (que corresponde a por lo menos 30 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No: 1) se proporciona aquí como SEQ ID No: 3, como sigue:

KAEFHRWSSYMWVHWKNQFDHYSKQDRCSDL

[SEQ ID No:3]

La secuencia de aminoácidos de T14 (que corresponde a los 14 residuos de aminoácidos ubicados hacia el extremo de la SEQ ID No: 1 y carece de 15 aminoácidos finales encontrados en T30) se proporciona aquí como SEQ ID No: 4, como sigue:

AEFHRWSSYMWVHWK

[SEQ ID No:4]

La secuencia de aminoácidos de T15 (que corresponde a por lo menos 15 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No: 1) se proporciona aquí como la SEQ ID No: 5, como sigue:

NQFDHYSKQDRCSDL

[SEQ ID No:5]

El inventor ha generado una secuencia consenso basada en la SEQ ID No 2-5, que se proporciona aquí como la SEQ ID No: 6, como sigue:

AEF $x_1x_2x_3$ S x_4 Y x_5 VH

[SEQ ID No:6]

Preferiblemente en la SEQ ID No: 6, x_1 puede ser un residuo de aminoácido básico, preferiblemente histidina (H), x_2 puede ser un residuo de aminoácido básico, preferiblemente arginina (R), x_3 puede ser un residuo de aminoácido aromático, preferiblemente triptófano (W); x_4 puede ser un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral

hidroxilo alifática, preferiblemente serina (S); x_5 puede ser triptófano (W) o metionina (M).

Se apreciará que cualquiera de las secuencias presentadas como SEQ ID No: 2-6 se pueden hacer cíclicas fácilmente para formar un péptido cíclico. Por ejemplo, la ciclación de los péptidos se puede alcanzar mediante técnicas de ciclización como cadena lateral a cadena lateral, cadena lateral-estructura principal o cabeza a cola (termina C a terminal N). En una realización preferida, la ciclación de cabeza a cola es el procedimiento preferido mediante el cual se producen los polipéptidos cíclicos. Los polipéptidos cíclicos se pueden sintetizar utilizando una ciclización basada en resina o ciclización de péptido lineal de fase de solución clásica. Los procedimientos preferidos para ciclización se describen en los ejemplos. En otra realización preferida, el polipéptido se produce utilizando un método de división de ciclización, en el que el polipéptido cíclico se sintetiza mediante ciclización después de síntesis de péptidos lineales en f de etapas. Una ventaja de este método es que la cadena no necesita ser anclada, haciendo el método más general, preferiblemente, antes de uso, se puede analizar las muestras resultantes de los péptidos cíclicos mediante MALDI-TOF MS.

Esta divulgación describe la SEQ ID No: 3 4, 5 o 6 cíclica. Esta divulgación describe un polipéptido cíclico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 3, y el residuo lisina del terminal N que se une al residuo leucina del terminal C para formar una cadena de aminoácidos circular. En una realización, el polipéptido cíclico comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 4, y el residuo alanina de terminal N se une al residuo lisina del terminal C. Esta divulgación describe un polipéptido cíclico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 5, y el residuo asparagina del terminal N se une al residuo leucina del terminal C. Esta divulgación describe un polipéptido cíclico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 6, en el que x_1 puede ser un residuo de aminoácido básico, preferiblemente histidina (H); x_2 puede ser un residuo de aminoácido básico, preferiblemente arginina (R); x_3 puede ser un residuo de aminoácido aromático, preferiblemente triptófano (W); x_4 puede ser un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral hidroxilo alifático, preferiblemente serina (S); x_5 puede ser triptófano (W) o metionina (M), y el residuo alanina del terminal N se liga al residuo histidina del terminal C.

El inventor encontró que la SEQ ID No: 4 ciclada (es decir, denominada aquí como "T14 ciclada", "CT14" o "NBP14") actúa sorprendentemente como un verdadero antagonista del receptor nicotínico $\alpha 7$, es decir, que la SEQ ID No: 4 ciclada protege las células de la toxicidad lineal de T14, T30 y β -amiloide. Más aun, el T14 ciclado bloquea la liberación AChE compensatoria inducida mediante esta toxicidad del T14 y T30. Adicionalmente, observan que el T14 cíclico dado solo no tiene efectos significativos en concentraciones de Ca^{2+} en rebanadas en rodajas de cerebro de rata, sino que bloquea los efectos β -amiloide.

El experto apreciaría que las variantes funcionales y análogos retienen sustancialmente la misma actividad biológica que el T14 cíclico en cualquiera de los experimentos descritos en los ejemplos. De acuerdo con lo anterior, una variante o análogo se puede seleccionar sobre la base de su actividad antagonista en el sitio alostérico sensible a ivermectina en el receptor nicotínico $\alpha 7$, o en la medida en que bloquea la liberación AChE, o en la medida en que protege de toxicidad lineal T14, T30 y β -amiloide y en la medida en que modula niveles en Ca^{2+} en una rodaja de cerebro de rata.

El inventor tiene la firme opinión de que el antagonismo de receptor observado proporcionado por la ciclación del polipéptido de acuerdo con el primer aspecto fue tan sorprendente que no pudo nunca haber sido obvio para el experto. Como tal, el inventor considera que la ciclación de cualquier polipéptido se podría utilizar para antagonizar un receptor, tal como el receptor nicotínico $\alpha 7$.

Por lo tanto, se describe un antagonista de receptor que comprende el polipéptido cíclico del primer aspecto.

Adicionalmente, se describe el polipéptido cíclico del primer aspecto, para uso como antagonista receptor.

Como se indicó anteriormente, los inventores han mostrado sorprendentemente que los polipéptidos cíclicos de la invención actúan como un modulador alostérico inerte del receptor nicotínico $\alpha 7$ que antagoniza la acción de T30 y los péptidos beta amiloides.

Por lo tanto, en un segundo aspecto, se proporciona un modulador alostérico del receptor que comprende el polipéptido cíclico del primer aspecto.

En un tercer aspecto, se proporciona un polipéptido cíclico para uso como un modulador alostérico del receptor, en el que el polipéptido cíclico es como se define en el primer aspecto.

El receptor, cuyo agente de polipéptido cíclico antagoniza o modula alostéricamente, puede ser cualquier receptor, pero es preferiblemente un receptor $\alpha 7$. Sin embargo, preferiblemente, el receptor, cuyo polipéptido cíclico antagoniza o modula alostéricamente, es el receptor nicotínico $\alpha 7$. Se prefiere que el polipéptido cíclico antagoniza o module un sitio alostérico en el receptor y preferiblemente un sitio alostérico sensible a ivermectina del receptor.

Los inventores consideran que son los primeros en haber mostrad un polipéptido cíclico en terapia, por ejemplo, en

el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, tal como enfermedad de Alzheimer.

Sin embargo, en un aspecto adicional, se proporciona el polipéptido cíclico del primer aspecto, para uso en terapia o diagnóstico.

5 En un aspecto adicional, se proporciona el polipéptido cíclico del primero aspecto, para uso en el tratamiento, alivio o prevención de un trastorno neurodegenerativo.

10 También se proporciona un método para tratar, aliviar o evitar un trastorno neurodegenerativo en un sujeto, el método comprende, administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de polipéptido cíclico del primer aspecto.

15 Como se discutió anteriormente, el inventor considera que el polipéptido cíclico o el antagonista receptor o modulador alostérico descritos aquí se puede utilizar para formar la base para tratar trastornos neurodegenerativos.

Sn embargo, se proporciona el polipéptido cíclico de acuerdo con el primer aspecto, o el modulador alostérico del receptor del segundo aspecto, para uso en terapia o diagnóstico.

20 También se proporciona el polipéptido cíclico de acuerdo con el primer aspecto, o el modulador alostérico del receptor del segundo aspecto, para uso en tratamiento, alivio o prevención de un trastorno neurodegenerativo.

25 También se proporciona un método para tratar, aliviar o evitar un trastorno neurodegenerativo en un sujeto, el método comprende, administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido cíclico de acuerdo con el primer aspecto, o el modulador alostérico del receptor del segundo aspecto.

30 Preferiblemente, el trastorno neurodegenerativo se selecciona de un grupo que consiste de enfermedad de Alzheimer; Enfermedad de Parkinson; Enfermedad de Huntington; Enfermedad neuromotriz; Espinocerebelar tipo 1, tipo 2 y tipo 3; Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS); y Demencia Frontotemporal, y se prefiere la enfermedad de Alzheimer.

35 El trastorno neurodegenerativo que se trata es preferiblemente uno que se caracteriza por el daño o muerte de neuronas "Globales". Por ejemplo, e trastorno neurodegenerativo se puede seleccionar de un grupo que consiste de enfermedad de Alzheimer; Enfermedad de Parkinson; Enfermedad de Huntington; Enfermedad neuromotriz; Espinocerebelar tipo 1, tipo 2 y tipo 3; Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS); Demencia frontotemporal; y esquizofrenia.

40 Preferiblemente, el trastorno neurodegenerativo, que se trata, es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad neuromotriz. Más preferiblemente, el trastorno neurodegenerativo, que se trata, es enfermedad de Alzheimer.

45 Se apreciará que el polipéptido cíclico o antagonista receptor o el modulador alostérico receptor de acuerdo con la invención se puede utilizar en un medicamento que se puede utilizar en una monoterapia (es decir, uso del polipéptido cíclico), para tratar, aliviar, o evitar trastornos neurodegenerativos, tal como enfermedad de Alzheimer. Alternativamente, el antagonista del receptor o polipéptido cíclico o el modulador alostérico del receptor de acuerdo con la invención se puede utilizar como una unión a, o en combinación con, terapias conocidas para tratar, aliviar o evitar la enfermedad de Alzheimer, tal como otros inhibidores de acetilcolinesterasa.

50 El polipéptido cíclico de acuerdo con la invención se puede combinar en composiciones que tienen una serie de formas diferentes, que depende, en particular, de la forma en que se va a utilizar la composición. Sin embargo, por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un polvo, comprimido, cápsula, líquido, ungüento, crema, gel, hidrogel, aerosol, pulverización, solución micelar, parche transdérmico, suspensión de liposomas o cualquiera otra forma adecuada que se puedan administrar a una persona o animal en necesidad tratamiento. Se apreciará que el vehículo de medicamentos de acuerdo con la invención debe ser uno que sea bien tolerada por el sujeto al que se le proporciona y permite preferiblemente el suministró de polipéptidos cíclicos a través de una barrera hematoencefálica.

60 Se apreciará que la eficiencia de cualquier tratamiento para trastornos cerebrales depende de la capacidad del compuesto terapéutico candidato para cruzar la barrera hematoencefálica (BBB). El inventor considera que los péptidos del tamaño T14 cíclica no pueden obtener acceso siguiendo la administración oral. Sin embargo, es bien sabido que, durante la enfermedad de Alzheimer, la barrera hematoencefálica aumenta la permeabilidad que puede permitir que el T14 cíclica alcance el sistema nervioso central, de hecho, solamente idealmente en los sitios de degeneración en el que se necesita, es decir, en el que la BBB está comprometida.

65 Dos estrategias principales se pueden aplicar para cruzar la BBB con una molécula grande, tal como T14 cíclica (es decir, NBP-14), que incluye: (1) uso de nanopartículas como transportadores para dirigir específicamente al cerebro

y suministrar el compuesto activo. Este método ha sido utilizado exitosamente para suministrar péptidos, proteínas y fármacos anti cáncer al cerebro; (2) uso de péptidos de carga. La adición de dicho péptido transportado específicamente a través de la BBB permite la transferencia de péptido cíclico a través de una forma facilitada.

5 Los medicamentos que comprenden polipéptidos cíclicos de acuerdo con la invención se pueden utilizar en una serie de formas. Por ejemplo, se puede requerir administración oral, en cuyo caso el polipéptido cíclico puede estar contenido dentro de una composición que puede, por ejemplo, ser ingerida oralmente en la forma de un comprimido, cápsula o líquido. Una opción alternativa para administrar el T14 cíclico (es decir, NBP14) sería utilizar la pulverización nasal, en razón a que la administración de péptidos mediante aerosol nasal alcanza al cerebro más rápido y más eficientemente que las formas de administración oral o intravenosa (véase <http://memoryzine.com/2010/07/26/nosesprays-cross-blood-brain-barrier-faster-and-safer/>). Por lo tanto, las composiciones que comprenden polipéptidos cíclicos de la invención se pueden administrar mediante inhalación (por ejemplo, intranasalmente). Las composiciones también se pueden formular para uso tópico. Por ejemplo, cremas o ungüentos que se pueden aplicar a la piel, por ejemplo, adyacente al cerebro.

15 Los polipéptidos cíclicos de acuerdo con la invención también se pueden incorporar dentro de un dispositivo de liberación lenta o retardada. Dichos dispositivos pueden, por ejemplo, ser insertados en o bajo la piel, y el medicamento se puede liberar durante semanas e incluso meses. El dispositivo se puede encontrar ubicar por o menos adyacente al sitio de tratamiento, por ejemplo, la cabeza. Dichos dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se requiere tratamiento a largo plazo con polipéptidos cíclicos utilizados de acuerdo con la invención y requeriría normalmente administración frecuente (por ejemplo, por lo menos inyección diaria).

20 En una realización preferida, los medicamentos de acuerdo con la invención se pueden administrar a un sujeto mediante inyección en el torrente sanguíneo o directamente en un sitio que requiere tratamiento. Por ejemplo, el medicamento se puede inyectar por lo menos adyacente al cerebro. Las inyecciones pueden ser intravenosas (bolo o infusión) o subcutánea (bolo o infusión), o intradérmica (bolo o infusión).

25 Se apreciará que la cantidad de polipéptido cíclico que se requiere se determina mediante su actividad biológica y biodisponibilidad, que a su vez depende del modo de administración, las propiedades fisicoquímicas del polipéptido cíclico y si está siendo utilizado como una monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración también se verá influenciada por la vida media del polipéptido cíclico dentro del sujeto que se trata. La dosificación óptima que se va administrar se puede determinar por el experto, y variará con el polipéptido cíclico particular en uso, la resistencia de la composición farmacéutica, la forma de administración, y el avance de la enfermedad neurodegenerativa. Factores adicionales que dependen del sujeto particular que se trata resultaran en una necesidad de ajustar las dosificaciones, que incluyen edad del sujeto, peso, genera, dieta y tiempo de administración.

30 En general, una dosis diaria de entre 0.001 µg/kg de peso corporal y 10 µg/kg de peso corporal del polipéptido cíclico de acuerdo con la invención se puede utilizar para tratar, aliviar, o evitar enfermedades neurodegenerativas, que dependen de cuál polipéptido cíclico se utiliza. Más preferiblemente, la dosis diaria está entre 0.01 µg/kg de peso corporal y 1 µg/kg de peso corporal y más preferiblemente entre aproximadamente 0.1 µg/kg y 10 µg/kg de peso corporal.

35 El polipéptido cíclico se puede administrar antes, durante o después del inicio de la enfermedad neurodegenerativa. Las dosis diarias se pueden dar como una única administración (por ejemplo, una única inyección diaria o inhalación de un pulverizado nasal). Alternativamente, el polipéptido cíclico puede requerir administración dos veces o más veces durante un día. Como un ejemplo, los polipéptidos cíclicos se pueden administrar como dos dosis diarias (o más dependiendo de la severidad de la enfermedad neurodegenerativa que se trata) de entre 0.07 µg y 700 mg (es decir, asumiendo un peso corporal de 70 kg). Un paciente que recibe tratamiento puede tomar una primera dosis al despertarse y luego una segunda dosis en la noche (si está en un régimen de dos dosis) o en intervalos de 3 o 4 horas después posteriormente. Alternativamente, se puede utilizarse un dispositivo de liberación lenta para proporcionar dosis óptimas de polipéptido cíclico de acuerdo con la invención a un paciente sin la necesidad de administrar dosis repetidas.

45 Procedimientos conocidos, tal como aquellos empleados convencionalmente por la industria farmacéutica (por ejemplo, experimentación in vivo, ensayos clínicos, etcétera), se pueden utilizar para formar formulaciones específicas de polipéptido cíclico de acuerdo con la invención y los regímenes terapéuticos precisos (tal como dosis diaria de los agentes) la frecuencia de administración. La invención considera que ella es la primera en sugerir una composición antienfermedad neurodegenerativa, con base en el uso de un polipéptido cíclico de la invención.

50 Por lo tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de polipéptido cíclico de acuerdo con el primer aspecto o el modulador alostérico de receptor del segundo aspecto y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La composición farmacéutica es preferiblemente una composición anti enfermedad neurodegenerativa, es decir, una formulación farmacéutica utilizada en el alivio terapéutico, prevención o tratamiento de un trastorno

neurodegenerativo trastorno en un sujeto, tal como enfermedad de Alzheimer.

La invención también proporciona en un aspecto adicional, un proceso para elaborar la composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto, el proceso comprende combinar una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido cíclico de acuerdo con el primer aspecto o el modulador alostérico de receptor del segundo aspecto, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El polipéptido cíclico es preferiblemente T14 cíclico (es decir, NBP14) como se divulga aquí, es decir, SEQ ID No: 4. Un "sujeto" puede ser un vertebrado, mamífero o animal doméstico. Por lo tanto, un medicamento de acuerdo con la invención se puede utilizar para tratar cualquier mamífero, por ejemplo, ganado (por ejemplo, un caballo), mascotas, o se puede utilizar en otras aplicaciones veterinarias. Más preferiblemente, sin embargo, el sujeto es un ser humano.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" del polipéptido cíclico es cualquier cantidad que, cuando se administra a un sujeto, es la cantidad de agente activo que se necesita para tratar una afección de trastorno neurodegenerativo, o producir el efecto deseado.

Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido cíclico utilizado puede ser de aproximadamente 0.001 mg hasta aproximadamente 800 mg y preferiblemente de aproximadamente 0.01 mg hasta aproximadamente 500 mg. Se prefiere que la cantidad de polipéptido cíclico sea una cantidad de aproximadamente 0.1 mg hasta aproximadamente 100 mg.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se refiere aquí, es cualquier compuesto conocido o combinación de compuestos conocida que son conocidos por aquellos expertos en la técnica por ser útiles en formular composiciones farmacéuticas.

En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido, y la composición puede estar en la forma de un polvo o comprimido. Un vehículo sólido farmacéuticamente aceptable puede incluir una o más sustancias que también pueden actuar como agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión tintes, rellenos, deslizantes, auxiliares de compresión, aglutinantes inertes, endulzantes, conservantes, recubrimientos, o agentes desintegradores de comprimidos. El vehículo también puede ser un material de encapsulación. En polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está en mezcla con los agentes finamente divididos de acuerdo con la invención. En comprimidos, el agente activo (es decir, el modulador) se puede mezclar con un vehículo que tiene las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas y compactado en la forma y tamaño deseado. Los polvos y comprimidos contienen preferiblemente hasta 99% de agentes activos. Vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, povidona, ceras de baja fusión y resinas de intercambio iónico. En otra realización, el vehículo farmacéutico puede ser un gel y la composición puede estar en la forma de una crema o similares.

Sin embargo, el vehículo farmacéutico puede ser un líquido, y la composición farmacéutica está en la forma de una solución. Los vehículos líquidos se utilizan en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El agente activo de acuerdo con la invención (el polipéptido cíclico) se puede disolver o suspender en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable tal como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o grasas o aceites farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados tal como solubilizadores, emulsificantes, reguladores, conservantes, endulzantes, agentes saborizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colores, reguladores de viscosidad, estabilizantes u osmoreguladores. Ejemplos adecuados de vehículos líquidos para administración oral o parenteral incluyen agua (parcialmente que contiene aditivos como se indicó anteriormente, por ejemplo, derivados de celulosa, preferiblemente solución de carboximetil celulosa de sodio), alcoholes (que incluyen alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, por ejemplo, glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de araquís). Para administración parenteral, el vehículo también puede ser un éster aceitoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos estériles se utilizan en composiciones de forma líquida estéril para administración parenteral. El vehículo líquido para composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propelente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, que son suspensiones o soluciones estériles, se pueden utilizar mediante, por ejemplo, inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intravenosa y particularmente subcutánea. El polipéptido cíclico se puede preparar como una composición sólida estéril que se puede disolver o suspender en el momento de administración utilizando agua estéril, solución salina u otro medio inyectable estéril adecuado.

Las composiciones y polipéptidos cíclicos de la invención se pueden administrar oralmente en la forma de una solución estéril o suspensión que contiene otros solutos o agentes de suspensión (por ejemplo, suficiente solución salina o glucosa para elaborar la solución isotónica), sales de bilis, acacia, gelatina, monoleato de sorbitán, polisorbato 80 (ésteres de oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con óxido de etileno) y similares. El polipéptido cíclico utilizado de acuerdo con la invención también se puede administrar oralmente en forma de

composición sólida o líquida. Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen formas sólidas, tal como píldoras, cápsulas, gránulos, comprimidos y polvos y formas líquidas, tal como soluciones, jarabes, elixires y suspensiones. Las formas útiles para administración parenteral incluyen soluciones estériles, emulsiones y suspensiones.

5 Aunque los inventores han demostrado los efectos terapéuticos sorprendentes del polipéptido cíclico de acuerdo con el primer aspecto, debido a su naturaleza antagónica, consideran que también será útil en experimentos clínicamente no relacionados diseñados para investigar la estructura y/o función del receptor nicotínico $\alpha 7$.

10 Por lo tanto, en un aspecto adicional, se proporciona el uso del polipéptido cíclico de acuerdo con el primer aspecto, en un procedimiento analítico in vivo o ex vivo para investigar el receptor nicotínico $\alpha 7$.

Preferiblemente, el método comprende investigar el sitio alostérico del receptor nicotínico $\alpha 7$. Preferiblemente, el proceso comprende utilizar el péptido cíclico para evitar influjo adicional de calcio a través del receptor nicotínico $\alpha 7$.
 15 El péptido cíclico actúa preferiblemente como un antagonista y bloquea los iones de calcio. Esta divulgación describe los ácidos nucleicos y péptidos que comprenden sustancialmente las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos de cualquiera de las secuencias referidas aquí, que incluyen variantes funcionales o fragmentos funcionales de las mismas. Los términos "sustancialmente la secuencia de los péptidos/nucleótidos/aminoácidos", "variante funcional" y "fragmento funcional", puede ser una secuencia que tiene por lo menos 40% de identidad de
 20 secuencia con las secuencias de péptido/nucleótido/aminoácidos de una cualquiera de las secuencias referidas aquí, por ejemplo 40% de identidad con la secuencia identificada como SEQ ID No: 1-6 y así sucesivamente.

Las secuencias de polipéptido/polinucleótidos/aminoácidos con una identidad de secuencia que es mayor del 65%, más preferiblemente mayor del 70%, incluso más preferiblemente mayor del 75% y aún más preferiblemente mayor
 25 del 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias referidas también se prevé. Preferiblemente, la secuencia de polipéptidos/polinucleótidos/aminoácidos tiene por lo menos 85% de identidad con cualquiera de las secuencias referidas a, más preferiblemente por lo menos 90% de identidad, incluso más preferiblemente por lo menos 92% de identidad, aún más preferiblemente por lo menos 95% de identidad, incluso más preferiblemente por lo menos 97% de identidad, incluso más preferiblemente por lo menos 98% de identidad y, más preferiblemente por
 30 lo menos 99% de identidad con cualquiera de las secuencias referidas aquí.

El experto apreciara cómo calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de polipéptidos/polinucleótidos/aminoácidos. Con el fin de calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de polipéptidos/polinucleótidos aminoácidos, se debe preparar primero una alineación de las dos secuencias seguido
 35 por el cálculo del valor de identidad de secuencia. El porcentaje de identidad para dos secuencias puede tomar diferentes valores dependiendo de: (i) el método utilizado para alinear las secuencias, por ejemplo, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (implementados en diferentes programas), o alineación estructural de comparación 3D; y (ii) los parámetros utilizados mediante el método de alineación, por ejemplo, alineación global vs local, la matriz de clasificación de pares utilizada (por ejemplo BLOSUM62, PAM250, Gonnet etcétera) y penalidad de espacio, por
 40 ejemplo, constantes y forma funcional.

Habiendo hecho la alineación, existen muchas formas diferentes para calcular el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Por ejemplo, uno puede dividir el número de identidades por: (i) la longitud de la secuencia más corta; (ii) la longitud de la alineación; (iii) la longitud media de la secuencia; (iv) el número de posiciones de no
 45 espacio; o (iv) el número de posiciones de equivalencia excluyendo salientes. Adicionalmente, se apreciará que porcentaje de identidad también es fuertemente dependiente de la longitud. Por lo tanto, entre más corto sea un par de secuencias, mayor la identidad de secuencia que uno puede esperar que ocurra por oportunidad.

Por lo tanto, se apreciará que la alineación precisa de la proteína o secuencias de ADN es un proceso complejo. El programa de alineación múltiple popular ClustalW (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22,4673-4680; Thompson et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882) es una forma preferida para generar múltiples
 50 alineamientos de proteínas o ADN de acuerdo con la invención. Los parámetros adecuados para ClustalW pueden ser como sigue: alineaciones para ADN: penalidad de un espacio = 15.0, Penalidad De Extensión De Espacio = 6.66 y matriz = identidad. Para alineaciones de proteína: Penalidad de Espacio Abierto = 10.0, Penalidad de Extensión de Espacio = 0.2 y matriz = Gonnet. Para alineaciones de proteína y ADN: ENDGAP = -1 y GAPDIST = 4. Aquellos expertos en la técnica se darán cuenta de que puede ser necesario variar estos y otros parámetros para alineación de secuencia óptima.
 55

Preferiblemente, el cálculo del porcentaje de identidad entre dos secuencias de polipéptido/polinucleótido/aminoácido puede ser calculada posteriormente a partir de dicha alineación como $(N/T)*100$, en el que N es el número de posiciones en que las secuencias comparten un residuo idéntico, y T es el número total de posiciones comparado incluyendo espacios, pero excluyendo salientes. Por lo tanto, un método más preferido para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias comprende (i) preparar una alineación de secuencia que utiliza el programa ClustalW utilizando un grupo adecuado de parámetros, por ejemplo, como se
 60 indicó anteriormente. y (ii) insertar los valores de N y T en la siguiente fórmula: identidad de secuencia = $(N/T)*100$.
 65

Alternativa los métodos para identificar secuencias similares serán conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar se codificará mediante una secuencia que hibrida a secuencias de ADN o sus complementos bajo condiciones rigurosas. Condiciones rigurosas, significa que el nucleótido hibrida para filtrar ADN o ARN unido en solución en cloruro de sodio/citrato de sodio 3x (SSC) en aproximadamente 45°C, seguido de por lo menos un lavado en 0.2x SSC/0.1% SDS a aproximadamente 20-65°C. Alternativamente, un polipéptido sustancialmente similar puede diferir en por lo menos 1, pero menos de 5, 10, 20, 50 o 100 aminoácidos de las secuencias mostradas en la SEQ ID No: 1-6.

Debido a la degeneración del código genético, es claro que cualquier secuencia de ácidos nucleicos descrita aquí se pueda variar o cambiar sin afectar sustancialmente la secuencia de la proteína codificada de ese modo, para proporcionar una variante funcional de la misma. Las variantes de nucleótidos son aquellas que tienen una secuencia alterada mediante la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido dentro de la secuencia, produciendo de esta manera un cambio silencioso. Otras variantes adecuadas son aquellas que tienen secuencias de nucleótidos homólogas pero que comprende todas o partes de, la secuencia, que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares al aminoácido que sustituye, para producir un cambio conservador. Por ejemplo, los aminoácidos hidrófobos, no polares pequeños incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, y metionina. Los aminoácidos hidrófobos no polares grandes, grandes incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los aminoácidos (básicos) cargados positivamente incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos (ácidos) cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Por lo tanto, se apreciará que se pueden reemplazar los aminoácidos con un aminoácido que tiene propiedades biofísicas similares, y el experto en la técnica conocerá las secuencias de nucleótidos que codifican estos aminoácidos.

Todas las características descritas aquí (que incluyen cualesquiera reivindicaciones acompañantes, Resumen y dibujos), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso descrito de esta manera, se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto combinaciones en donde por lo menos algunas de dichas características y/o etapas son mutuamente excluyentes.

Para una mejor comprensión de la invención y para mostrar cómo las realizaciones de la misma se pueden llevar a cabo en efecto, se hará referencia ahora, por vía de ejemplo, a las figuras acompañantes en las que:

La figura 1 es una gráfica de barras que muestra ningún efecto del T14 cíclico solo en viabilidad celular PC₁₂ después de 1 hora de tratamiento. Los datos representan la media ± EEM, N = 6;

La figura 2 es una gráfica que muestra ningún cambio en la actividad enzimática de AChE (determinado por su capacidad para división aumentando concentraciones de un sustrato) en la presencia o ausencia de T14 cíclico. En contraste, la galantamina exhibe inhibición competitiva altamente significativa de la actividad enzimática. Los datos representan la media ± DE, N = 4;

La figura 3 es un diagrama de barras que muestra ningún efecto tóxico inespecífico de H₂O₂ (100 µM) solo, y su presencia cuando se combina con T14 cíclico (100 nM) en viabilidad celular. Los datos representan media ± EEM, N = 6. * vs Control; *P< 0.05, **P<0.01;

La figura 4 muestra el efecto después de 1 hora de tratamiento de (A) β-Amiloide (10 µM), (B) T14 (10 µM) y (C) T30 (10 µM) solo y combinado en tiempo cero con T14 cíclico (100 nM). Los datos representan la media ± EEM, N = 12. * vs Control; *P< 0.05, ***P< 0.001;

La figura 5 es un diagrama de barras que muestra la actividad AChE después de tratamiento de células PC12 con T30 (10 µM) solo, T14 (10 µM) solo o combinada con T14 cíclico (100 nM). Los datos representan la media ± EEM, N = 6. * vs Control, *** P< 0.001; # dentro de los grupos, #### P<0.001;

La figura 6 muestra curvas de competición de inhibición de ivermectina [³H] que se une mediante β-Amiloide, T30 y T14 en membranas de células PC₁₂, también como se muestra en membranas de cerebro de rata. Los datos representan la media ± EEM, N = 3;

La figura 7 muestra las curvas de competición de la inhibición de ivermectina [³H] de unión mediante T14 cíclico y galantamina en membranas de células PC12, como también se muestra en membranas de rata. Los datos representan la media ± EEM, N = 6;

La figura 8 es un diagrama de barras que muestra la concentración efectiva mínima de galantamina (100 nM) y T14 cíclica (1 nM) contra β-Amiloide (10 µM) en viabilidad celular. Los datos representan la media ± EEM, N = 6. * vs Control; *P<0.05;

La figura 9 es una gráfica que muestra el efecto de respuesta de dosis de T14 cíclico (1 nM) contra β-Amiloide (10 µM) en viabilidad celular. Los datos representan la media ±EEM, N = 6. * vs Control; *P<0.05;

La figura 10 es una gráfica de barras que muestra los niveles intracelulares de Ca^{2+} en rodajas de cerebro de rata después de 2 horas de tratamiento diferentes. Los datos representan la media \pm EEM, N = 4;

5 La figura 11 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de los péptidos, T30, T15, T14 y β -amiloide ($A\beta$);

La figura 12 es un diagrama que muestra los sitios de unión de β -amiloide y T30 en el $\alpha 7$ -nAChR;

10 La figura 13 es una gráfica que muestra el efecto protector de diferentes concentraciones de NBP-14 (5, 7, 9, 10, 20, 50, 70, 1000, 5000 nM) en influjo de calcio inducido por T30. Los valores se ajustan a una curva no lineal con el logaritmo de las concentraciones de inhibidor, NBP-14, versus la respuesta del T30, al utilizar GraphPad Prism;

15 La figura 14 es una gráfica que muestra el efecto protector de diferentes concentraciones de NBP-14 (5, 7, 9, 10, 20, 50, 70, 1000, 5000 nM) en liberación de AChE inducida por T30. Los valores se ajustan a una curva no lineal con el algoritmo de las concentraciones de inhibidor, NBP-14, versus la respuesta del T30, al utilizar GraphPad Prism;

20 La figura 15 es una gráfica que muestra el efecto protector de diferentes concentraciones de NBP-14 (5, 7, 9, 10, 20, 50, 70, 1000, 5000 nM) en viabilidad celular inducida por T30. Los valores se ajustan a una curva no lineal con el logaritmo de las concentraciones de inhibidor, NBP-14, versus la respuesta del T30, al utilizar GraphPad Prism;

25 LA figura 16 es una gráfica que muestra la respuesta cortical general para estimulación eléctrica talámica bajo diferentes concentraciones de T30. (A) sincronía de actividad de población neuronal, medido como cambio fraccional en intensidad de fluorescencia. (B) dispersión de de población, medida como el número de píxeles activos - definido como píxeles que muestran más del 20% de la intensidad máxima dada por cualquier píxel sencillo dentro de la región de interés;

30 LA figura 17 muestra el aislamiento y análisis lineal del aumento de fase de la dispersión de montajes bajo diferentes concentraciones de T30, como se observa de la figura 16. Aumentar las concentraciones de T30 muestran una reducción dependiente de dosis en la pendiente lineal, equivalente a la velocidad de propagación del montaje;

35 La figura 18 muestra el análisis de dinámicas dispersas de montajes neuronales evocados talamo-corticalmente bajo tratamiento de T30 y NBP-14, n=3. El análisis de aumento de fase (panel izquierdo) muestra un efecto latente de T30 en aumentar la pendiente (velocidad) de propagación. La pendiente muestra aumentos significativos solamente aproximadamente 45-60 minutos después de perfusión de T30 inicial (barras amarillas, efectos que llegan a ser evidentes durante la perfusión naranja - con perfusión de 5 nM de NBP-14). Esta tendencia al aumento brusco se ralentizada durante la perfusión NBP-14 100 nM (barra roja) y luego se invierte a los niveles iniciales durante la perfusión NBP-14 de 300 nM final (barra negra). El análisis de fase de meseta (panel derecho) muestra un perfil de efectos similar. El panel superior muestra una gráfica de caja y whisker que promedia el comportamiento de la dispersión del montaje bajo diferentes tratamientos de fármaco: se puede observar una tendencia similar como el análisis de pendiente de aumento de fase, y aunque no es significativo, la tendencia es que el T30 aumenta gradualmente la dispersión de los montajes evocados hasta que una concentración de NBP-14 suficientemente alta alcanza el baño de registro (100 nM) en donde esta tendencia excitadora se revierte de nuevo hacia los niveles de control (azul) en perfusión NBP-14 300 nM (negro);

45 La figura 19 muestra resultados cualitativos de los tres experimentos (es decir, columna izquierda, centro y derecha) en el que se prueban los efectos de T30 contra el aumento de concentraciones de NBP-14 (0.1, 5, 100 y 300 nM). El panel superior muestra las dos gráficas de datos promediadas principales: izquierda- intensidad de señal de fluorescencia, y derecha- dispersión de montajes evocados. El panel inferior muestra los mapas de "tiempo-espacio" que mapean la actividad de una fila de píxeles que se ubican sobre el área de interés (eje y) sobre el tiempo (310 ms total, eje x) para las condiciones de perfusión. La reducción drástica en la intensidad de fluorescencia como resultado de Coperfusión de T30 y NBP-14 es claramente evidente, ya que está en la Gráfica de Intensidad. Nota: los mapas de espacio-tiempo se etiquetan con su respectiva perfusión (izquierda) y tienen código de color para sus trazas correspondientes tanto en las gráficas de intensidad (derecha) y como dispersión (izquierda);

50 La figura 20 muestra un esquema del procedimiento seguido durante la prueba in vivo de NBP-14. El día antes de la cirugía se prueban todos los con el fin de recuperar cualquier lesión. El día de la cirugía se considera como el día 0 del estudio. En el primer día, una prueba de ubicación de la pata permitió la selección de 16 de los 24 mejores sujetos para inyectar con el vehículo o NPB-14. En el día 2 se realizó una prueba de ubicación de pata;

60 La figura 21 muestra el efecto de NBP-14 contra 6-OHDA en comparación con valores iniciales y 6OHDA solo en la prueba de colocación de pata 6-OHDA **P<0.01 y 6OHDA + NBP14 ***P< 0,001 vs línea de base. (N=8);

La figura 22 muestra la cascada de eventos que resultan del efecto de T30 en una célula;

65 La figura 23 muestra que el APP de longitud completa se reduce por el NBP-14. Los datos representan la expresión de APP en células PC12 solubilizadas después de 3 diferentes tratamientos de 1 hora. Los datos se representan

como media \pm EEM, n=2; y

La figura 24 muestra inmunodetección mediante transferencia western representada en la gráfica. Los 3 tratamientos diferentes muestran niveles de expresión diferentes de APP (valores representados en la figura 24. Para cada proteína de condición se corrige por los niveles de GAPDH.

La figura 25 muestra que el T30 induce la liberación de la A β 42, un efecto revertido por NBP14. La grafica muestra la liberación de A β 42 en condiciones de control, en presencia de T30 y en presencia de T30 y NBP-14. Los resultados se representan como media \pm EEM (n=4).

EJEMPLOS

Cabe entender que la SEQ ID No: 4 se denomina aquí como "T14 ciclada", "CT14" o "NBP14".

Materiales y métodos

Ciclización de péptidos

Se utilizan tres técnicas para lograr ciclización de los péptidos lineales descritos aquí, es decir, ciclización cadena lateral a cadena lateral, cadena lateral a estructura principal y cabeza a cola (terminal-C a terminal-N). La ciclización cabeza a cola se ha investigado extensamente y puede implicar ciclización de disulfuro Cys-Cys dirigida (hasta dos por molécula). La monitorización cuidadosa de la reacción asegura el 100% de ciclización. Se utilizan dos métodos generales para síntesis: (1) ciclización de péptido lineal de fase de solución clásica bajo altas condiciones de dilución; y (2) ciclización basada en resina. Se emplean dos protocolos distintos en la síntesis de fase sólida (1):

(a) La ciclización en resina de un péptido anclado a través de un grupo funcional de cadena lateral, tal como imidazol, 3 ácido, 4 amina' o alcohol, se llevó a cabo. El péptido se protege ortogonalmente como un éster en el terminal C y el péptido se ensambla luego a través de síntesis Boc o Fmoc regular seguida por saponificación, ciclización y división.

(b) Otro protocolo que se utiliza es el método de división de ciclización, en el que el péptido cíclico se sintetiza mediante ciclización después de síntesis de péptidos lineal en forma de etapas. Una ventaja de este método es que la cadena lateral no se necesita anclar, haciendo al método más general que (a). (Christopher J. White and Andrei K. Yudin (2011) Nature Chemistry 3; Valero et al (1999) J Peptide Res. 53, 76-67; Lihu Yang and Greg Morriello(1999) Tetrahedron Letters 40, 8197-8200; Parvesh Wadhvani et al (2006) J. Org. Chem. 71, 55-61).

Las muestras resultantes de los péptidos cíclicos se analizan mediante MALDI-TOF MS.

Cultivo de células PC12

Las células PC12 son una estirpe de células de feocromocitoma clonadas, derivadas de médula suprarrenal (Greene and Tischler, 1976, Proc Natl Acad Sci U S A 73: 2424-2428; Mizrahi et al., 1990, Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6161-6165). Se cultivan fácilmente y son fácilmente accesibles a manipulaciones experimentales. En razón a que las células de cromafina se derivan de la cresta neural pero se ubican en el centro de un órgano periférico accesible (la médula suprarrenal) han descrito como ofrecer una "ventana" en el cerebro (Bornstein et al., 2012, Mol Psychiatry 17: 354-358). Estas células sirven como un poderoso modelo in vitro, aunque novedoso, para estudiar el proceso principal aún desconocido de la neurodegeneración y las razones del porqué son útiles para este proyecto, son los siguientes: la médula suprarrenal en pacientes con Alzheimer muestra diversas características patológicas que recuerdan aquellas vistas en el SNC, por ejemplo, numerosas lesiones del tipo cuerpo de Lewy, ovillos neurofibrilares y filamentos helicoidales emparejados, así como expresión de proteína precursora amiloide (APP) (Takeda et al., 1994, Neurosci Lett 168: 57-60). Mas aun Appleyard and Macdonald (1991, Lancet 338: 085-1086) demuestran una reducción selectiva solamente en el soluble, es decir forma liberable de AChE de la glándula suprarrenal en AD, quizás debido a su secreción mejorada en el plasma, cuando se eleva en pacientes AD (Atack et al., 1985, J Neurol Sci 70: 1-12; Berson et al., 2008, Brain 131: 109-119).

Las células PC12 tipo natural son proporcionadas por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El cultivo se siembra en placas en forma rutinaria en platos de 100 mm (Corning) recubierto con colágeno (2 μ g/cm²) y se mantiene en medio de crecimiento con Minimum Essential Medium Eagle (MEM) complementado con suero de caballo (HS) al 10% inactivado con calor y suero bovino fetal (FBS) al 5%, 10 mM HEPES, 2mM de L-glutamina y solución de penicilina/estreptomina 1:400. Las células se mantienen a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% y el medio se reemplaza cada 2 días. Para división, las células se desprenden del plato utilizando una pipeta con medio, una parte de estas se vuelven a colocar en placas sobre nuevos platos de cultivo. Las células se utilizan entre los pasajes 12 y 25.

Preparación de membrana celular

Se obtienen membranas PC12 para realizar ensayos de unión. Las células PC12 se cultivan hasta confluencia de placas 100 mm. Se retira el medio de crecimiento y se agrega 50 mM de regulador Tris-HCl enfriado con hielo (pH 7.4) que contienen 4.5 µg/µl aprotinina y 0.1 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF). Las células se desprenden mecánicamente y se sedimentan mediante centrifugación (1040 x g) durante 4 minutos a 4°C. Los sedimentos se homogenizan con Polytron y se centrifugan (13000 x g) durante 20 minutos a 4°C. Los sedimentos se vuelven a suspender en regulador fresco y se incuban a 37°C durante 10 minutos para retirar los neurotransmisores endógenos. Posteriormente las muestras se vuelven a centrifugar. El sedimento final se vuelve a suspender en regulador y se determina la concentración de proteína utilizando el reactivo Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La preparación de membrana celular almacena a -80°C.

Preparación de β-amiloide

Se preparan fibrilas β-amiloide (1-42) como lo describe el proveedor (Abcam, Cambridge UK). Se disuelve 1 mg de β-amiloide (1-42) en 212 ml de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) y 10 µl de NH₄OH. Después de sonicación y distribución de 10 µl de muestra por tubo, las muestras se secan en un secador de vacío de velocidad (Thermo Fisher Scientific, Loughborough, UK) y se almacenan a -20°C. Para experimentos, las muestras se diluyen en 2 µl de DMSO (5 mM) y 98 µl de HCl (0.01 N) para asegurar la formación de fibrilas y se incuban durante la noche a 37°C.

Ensayo de unión [³H] ivermectina

La unión con membranas PC12, se realiza cada incubación en tubos de poliestireno (VWR International Ltd; Leicestershire, UK) que contienen 0.25 ml de membranas diluidas en 50 mM de regulador Tris-HCl (que contiene 50 µg de membranas PC12) con 5 nM de [³H] Ivermectina (American Radiolabeled Chemicals, USA) en la ausencia o presencia de diferentes concentraciones del péptido AChE T30, β-Amiloide o T14 cíclico (0.1, 0.5, 0.7, 1, 2, 10 µM) diluido en 50 mM de Tris-HCl, en un volumen final de 0.5 ml durante 2 h a 4°C.

Después de esto, las muestras se filtran a través de filtros de fibra de vidrio Brandel GB (MD, USA); se enjuagan previamente con polietilenoamina al 0.5% mediante un Cosechador (Brandel; MD, USA). Los tubos se lavan 3 veces con 50 mM de regulador Tris-HCl enfriado con hielo. La radiactividad en los tubos se cuenta mediante espectrometría de centelleo utilizando un contador de centelleo líquido 300SL (Lablogic Systems Limited, UK). Se determina la unión específica al restar el valor no específico (células tratadas con 30 µM de Ivermectina) a todos los tubos.

Análisis de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular utilizado es el ensayo colorimétrico de sulfurodamina B (SRB) para detección de toxicidad. El día anterior a los experimentos, se siembran células en placas de 96 pozos recubiertas con colágeno en una concentración de 40.000 células/pozo. Se determina concentración celular mediante la cámara Fuchs-Rosenthal. Los fármacos se preparan en MEM que contiene L-Glutamina y las células se tratan con diferentes concentraciones de T14 cíclico (0.1-100 µM) y T30, T14 y Aβ (10 µM) solo o combinado con T14 cíclico (0.1 y 0.7 µM). Después de tratamiento, se reemplaza el medio y las células se fijan al agregar 100 µl de ácido tricloroacético al 10% (TCA) durante 1 h a 4°C. Después de esto, las células se lavan con H₂O y se tiñen con 100 µl de una solución SRB al 0.057% en ácido acético al 1% (HAc) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tinción, las células se lavan con HAc al 1% para retirar el exceso de SRB y luego se incuban con 200 µl de 10 mM de base Tris (pH 10.5) y se agita durante 5 minutos para solubilizar el tinte unido a la proteína. La medición de la absorbancia tiene lugar en un lector de microplacas cinético V_{Max} (Molecular Devices) a 490 nm.

Ensayo de actividad acetilcolinesterasa

Se mide la actividad AChE utilizando el reactivo Ellman que mide la presencia de grupos tiol como un resultado de la actividad AChE. Las células se colocan en placas el día anterior al experimento para el ensayo de viabilidad celular. Las células se tratan en concentraciones diferentes de T14 cíclico (0.1-100 µM) y 10 µM de T30, T14 y Aβ solos o combinados con T14 cíclico (0.1 y 0.7 µM). Después del tratamiento, el sobrenadante (perfusato) de cada tratamiento se recolecta y se agrega 25 µL de cada condición a una placa de 96 pozos nueva de fondo plano seguida por la adición de 175 µl de reactivo Ellman (Solución A: 139 mM de KH₂PO₄ y 79.66 mM de K₂HPO₄, pH 7.0; solución B (sustrato): 11.5 mM de yoduro de acetilcolina; Solución C (reactivo): 8 mM de 5,5'-Ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) y 15 mM de NaHCO₃). El reactivo Ellman se prepara como una mezcla de las 3 soluciones en una relación de 33(A):3(B):4(C). Las mediciones de absorbancia se toman a intervalos regulares (3, 10, 30 y 60 min) a través de experimentos en 405 nm.

Fluorimetría de calcio

Se monitoriza el aumento en Ca²⁺ intracelular al medir los cambios en fluorescencia en células cargadas con Fluo-4 (Life Technologies Corporation, UK). Se incuban rodajas de cerebro durante 2 horas en 124 mM de NaCl, 3.7 mM de KCl, 26 mM de NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 1.3 mM de MgSO₄, 1.3 mM KH₂PO₄ y 10 mM de glucosa; pH: 7.1 que contiene β-amiloide, T14 cíclico o β-amiloide + T14 cíclico. Después de 2 horas, se incuban las rodajas en la

oscuridad durante 40 minutos a temperatura ambiente con 1.2 ml/pozo de medio de carga que contiene: solución salida de Tyrode (TSS; 137 mM de NaCl, 2.7 de KCl, 1.0 mM de MgCl₂, 2,5 mM de CaCl₂, 0.2 mM de NaH₂PO₄, 12.0 de NaHCO₃, 5.5 de glucosa, pH 7.4), Fluo-4 (2 μM), Pluronic F127 (0.02%) y probenecid (2 mM). El probenecid es un bloqueador de la proteína resistente a multifarmacos, un transportador de iones y evita la excreción de la molécula fluorescente de la célula. Después de incubación, se lavan las rodajas con TSS y se agrega 1200 μl/pozo de medio de desesterificación, que contiene TSS y probenecid. Las rodajas se incuban en la oscuridad durante 20 minutos a 22°C. Se registran mediciones de fluorescencia (excitación 485 nm, emisión 538 nm) en un lector de placas Fluostar Optima (BMG, UK).

10 Fármacos y reactivos

MEM, suero de cultivo, antibióticos, colágeno, sulforodamina B, ivermectina y reactivos reguladores son proporcionados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los péptidos T30, T14 AChE y T14 cíclico se sintetizan mediante Genosphere Biotechnologies (Francia). Las existencias de péptidos se diluyen en agua destilada.

15 Análisis de datos

En cada una de las diferentes técnicas, se realizan análisis estadísticos con el promedio de los valores de porcentaje de 12 o más experimentos. Las comparaciones entre múltiples grupos de tratamiento y el mismo control se realizan mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las pruebas post hoc de Tukey que utilizan el software GraphPAD InStat (GraphPAD software, San Diego, CA). Estas pruebas comparan las medias de cada tratamiento con las medias de cada uno de los otros tratamientos; es decir, se aplican simultáneamente al grupo de todas las comparaciones en forma de pares e identifican cuando la diferencia entre las dos medias es mayor de lo que se esperaría que permitiera el error estándar. La significancia estadística se toma en un valor $P < 0.05$. Las gráficas se grafican utilizando GraphPAD Prism 6 (GraphPAD software, San Diego, CA). En el caso del experimento de unión, se obtienen resultados como conteos por minuto (cpm) y se transforma a porcentajes relacionados con control. Los resultados se ajustan a un modelo de unión de competición de sitio utilizando GraphPad Prism. En el caso de los resultados de calcio, se calculan los valores EC₅₀ al ajustar el logaritmo de los puntos de datos experimentales a una ecuación Hill de único sitio utilizando una curva de regresión no lineal utilizando GraphPad Prism.

30 Ejemplo 1 - Ciclización de T14

El inventor sintetiza un agente que dirige selectivamente el sitio alostérico en un receptor de acetilcolina nicotínico α7, para competir por la unión con T14/T30 y también para antagonizar con el β-amiloide. El agente es una forma cíclica de T14 que tiene la secuencia de aminoácidos: AEFHRWSSYMHVHWK [SEQ ID No: 4], con el residuo de alanina de terminal N que se conecta al residuo lisina de terminal C. Genosphere Biotechnologies (Francia) realiza la ciclización de T14 al transformar el péptido lineal en una lactama de terminal N a terminal C. Los siguientes ejemplos demuestran por primera vez cómo el péptido T14 cíclico bloquea los efectos tóxicos establecidos del péptido T30 péptido del amiloide in vitro.

40 Ejemplo 2 – el T14 cíclico es no tóxico cuando se aplica solo

Utilizar sulforodamina B (SRB) como un proceso de detección de viabilidad celular, se tratan células PC12, durante 1 hora con T14 cíclico producido en el ejemplo 1. Como resultado, no se observan cambios en la viabilidad celular que sugieran no toxicidad en concentraciones tan altas como 100 μM (100 nM: 98.76 ± 15.15; 700 nM: 106.94 ± 19.92; 1 μM: 104.82 ± 10.9; 100 mM: 93.58 ± 11.62) (véase figura 1).

Ejemplo 3 - T14 cíclico no afecta la actividad enzimática AChE

50 El inventor decide a continuación confirmar si o no el T14 cíclico afecta la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE). La actividad enzimática AChE se mide utilizando el ensayo de actividad acetilcolinesterasa. El inventor encuentra que la presencia de T14 cíclico (2 μM) no afecta la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa: en contraste con galantamina (2 μM) que es fuertemente inhibidor (véase figura 2).

55 Ejemplo 4 - T14 cíclico no protege contra toxicidad no específica de peróxido de hidrógeno

Los inventores luego determinan si o no el T14 cíclico protege las células PC 12 contra efectos citotóxicos no específicos del peróxido de hidrógeno. Como se puede observar en la figura 3, no hay diferencias significativas cuando se proporciona H₂O₂ solo o en combinación con T14 cíclico.

60 Ejemplo 5 - T14 cíclico protege células de Toxicidad de T14, T30 y β-amiloide

Utilizando SRB como un procedimiento de detección de viabilidad celular, se tratan células PC12 durante 1 hora con (4A) β-amiloide (4B) T14 lineal, o (4C) T30, solos o en combinación con T14 cíclico (100 nM). Como se muestra en la figura 4, los tres péptidos solos inducen una reducción en viabilidad celular (Aβ: 69.875 ± 4.38; T14: 83.02 ± 5.385

65

y T30: 68.395 ± 3.095), pero cuando se combina con células T14 cíclicas se protege sorprendentemente de la muerte ($A\beta + C14: 94.475 \pm 7.4$; $T14 + C14: 99.4 \pm 12.475$; $T30 + C14: 88.59 \pm 8.785$).

Ejemplo 6 - T14 cíclico bloquea la liberación de AChE inducida por T14 y T30

Se utiliza el ensayo colorimétrico Ellman para evaluar la actividad AChE como una respuesta compensatoria después de un estímulo tóxico. Las células se tratan durante 1 hora con T14 y T30 lineal ($10 \mu\text{M}$) solos y en combinación con T14 cíclico (100 nM) (véase figura 5). Todos los péptidos inducen un aumento de actividad AChE (T30: 129.10 ± 1.18 ; T14: $123,0 \pm 0.62$) que se bloquea parcialmente cuando se combina con T14 cíclico (T30 + C14: $110.58 \pm 0,80$; T14 + C14: 112.30 ± 1.39).

Ejemplo 7- β -Amiloide. T30 y T14 Desplazan a unión a [^3H] ivermectina

Con el fin de demostrar que el $\alpha 7\text{nAChR}$ (el receptor acetilcolina nicotínico $\alpha 7$) es un objetivo para el β -amiloide, T30 y T14 en las preparaciones utilizadas aquí. Se realizan ensayos de unión de [^3H] ivermectina en membrana de células PC12 y demuestran en una forma de registro de respuesta de dosis una reducción de la afinidad del sitio alostérico del receptor cuando el ligando une [^3H] la ivermectina (véase tabla 1, figura 6).

Tabla 1 - datos que muestran el porcentaje de unión de [^3H] ivermectina en células PC12 en la presencia de diferentes concentraciones de β -amiloide, T30 y T14, N=3.

% [^3H] Ivermectina (media \pm EEM)	β -Amiloide	T30	T14
1 nM	100.00 ± 9.70	109.16 ± 11.9	$100 \pm 9,91$
10 nM	73.61 ± 11.12	116.63 ± 13.25	90.92 ± 2.38
100 nM	41.17 ± 8.90	106.15 ± 8.04	88.92 ± 3.82
1 μM	29.98 ± 12.20	97.41 ± 7.9	85.17 ± 3.03
5 μM	34.49 ± 17.29	80.22 ± 3.81	85.36 ± 3.96

Ejemplo 8 - T14 cíclico desplaza unión de [^3H] ivermectina con mayor eficacia que galantamina

Bajas concentraciones micromolares de T14 cíclico de ivermectina [^3H] desplazada con similar afinidad, pero con significativamente mayor eficacia que galantamina.

Tabla 2 - Datos que muestran el porcentaje de unión de [^3H] ivermectina en células PC12 en la presencia de diferentes concentraciones de T14 cíclico y galantamina, N=6

% de [^3H] Ivermectina (media \pm EEM)	T14 cíclico	Galantamina
100 nM	98.10 ± 3.28	100.00 ± 11.48
200 nM	$80.81 \pm 4,37$	97.86 ± 1.40
500 nM	79.72 ± 6.76	$90.96 \pm 1,87$
700 nM	62.26 ± 17.63	69.68 ± 9.87
1 μM	29.006 ± 8.23	67.17 ± 6.64
2 μM	13.46 ± 10.40	66.32 ± 4.29

Ejemplo 9 - T14 cíclico protege células de Toxicidad β -amiloide con mayor eficacia que galantamina

Utilizar SRB como un método de detección de viabilidad celular, se tratan células PC12 durante 1 hora con β -amiloide solo o combinado con T14 cíclico (1nM) o galantamina (100 nM). Como se muestra en la figura 8, el T14 cíclico protegido contra toxicidad $A\beta$ (97.34 ± 9.57) en una dosis de dos órdenes de magnitud menor que galantamina (98.79 ± 14.21).

Ejemplo 10 - concentración mínima de T14 cíclico requerida para 100% de protección contra β -Amiloide

Utilizar SRB como un procedimiento de detección de viabilidad celular, se tratan células PC12 durante 1 hora con β -amiloide combinado con T14 cíclico en concentraciones que aumentan de 0.5 nM hasta 100 nM (0.5: 88.49 ± 10 ; 1: 97.34 ± 9.57 ; 10: 102.28 ± 8.53 ; 50: 101.79 ± 13.99 ; 100: 103.68 ± 6.34). El umbral de dosis para la protección completa fue 1nM (Figura 9).

5 Ejemplo 11 - T14 cíclica reduce niveles Ca^{2+} en rodajas de cerebro de ratón

10 Se utiliza fluorimetría para detectar variaciones en los niveles de calcio después del tratamiento durante dos horas con T14 cíclico 1 μ M, β -amiloide 10 μ M y ambos combinados. El T14 cíclico no cambia el nivel basal del calcio intracelular mientras que β -amiloide induce para aumentar el nivel de calcio intracelular, que se regrese a valores iniciales mediante T14 cíclico (véase figura 10).

Ejemplo 12 - T30 exhibe una alta afinidad de unión para el sitio alostérico del receptor nicotínico $\alpha 7$

15 Utilizar pruebas para viabilidad, el inventor ha mostrado que el T30 tiene una afinidad de unión aproximadamente de tres órdenes de magnitud mayor (5 nM) para el sitio alostérico en el receptor nicotínico $\alpha 7$, que los fármacos actualmente en uso clínico, por ejemplo, galantamina (10 μ M).

20 Discusión general

25 El T14 cíclico es un modular alostérico inerte del receptor nicotínico $\alpha 7$ novedoso del receptor nicotínico $\alpha 7$ que antagoniza la acción del T30 y los péptidos beta amiloides T14 cíclicos es un agonista del receptor nicotínico $\alpha 7$ novedoso. La ineficacia de la protección contra el peróxido de hidrógeno de agente no específico sugiere que la acción de bloqueo del T14 cíclico es selectivo y mediado por el receptor. El T14 cíclico antagoniza los efectos tóxicos de T30 en una variedad de pruebas que indican que evita el influjo adicional de calcio a través de un sitio alostérico en el receptor $\alpha 7$ mediante competición por unión con T30, así como amiloides. La estabilidad mejorada de los péptidos cíclicos se tendría en cuenta para este desplazamiento efectivo.

30 ¿Por qué un fármaco basado en T14 cíclico es más efectivo que los tratamientos actualmente disponibles?

35 El inventor ha mostrado recientemente que el T30 tiene afinidad de unión de aproximadamente tres órdenes de magnitud mayor (5 nM) para el sitio alostérico del receptor $\alpha 7$, que los fármacos actualmente en uso clínico, por ejemplo, galantamina (10 μ M). De hecho, esta observación también sugiere la razón del porqué dichos fármacos que actualmente se prescriben han probado ser relativamente decepcionantes (véase tabla 1; Kramp & Herrling, 2011, Neurodegenerative Dis 8, 44-94): Si el T30 endógeno, en exceso en cerebros de pacientes con Alzheimer, ya está ocupando el sitio clave, no se desplazaría mediante competición de baja afinidad. Sin embargo, se bloquearía mediante un agente con afinidades de unión similar o de hecho superior, como se sugiere aquí (véase figura 7). Dicho agente tiene, por lo tanto, el potencial para ser un fármaco altamente efectivo.

40 Una ventaja adicional del T14 cíclico es que, a diferencia de la galantamina, que es adicionalmente un inhibidor AChE, no tendría otras acciones biológicas, diferente de unirse al receptor. Si, como lo sugiere el trabajo previo del inventor (Greenfield, 2013, Chem Biol Interact. 203(3):543-6), el T30 es de hecho la molécula de señalización pivote en enfermedades neurodegenerativas, luego, su antagonismo sería combatir estas enfermedades en el nivel más específico y fundamental. En cualquier evento, la observación que este agente novedoso también antagoniza el amiloide sería de gran interés clínico, cuando el amiloide está implicado en los procesos degenerativos, independiente de su función precisa. Cabe notar que mientras que otros candidatos terapéuticos se dirigen a la disponibilidad del β -amiloide (por ejemplo, inhibidores gamma secretasa) que no han sido efectivos, este es el primer caso, del bloqueo efectivo de la toxicidad amiloide.

50 Tabla 3 - Comparación de características de galantamina vs fármaco basado en T14 cíclico

Galantamina	Fármaco de sueño	Cíclico T ₁₄
Inhibe AChE (efectos secundarios)	No afecta la actividad AChE	✓
Acción conocida en diversos receptores	Acción específica en el receptor $\alpha 7$	✓
afinidad micromolar	Afinidad nanomolar	✓
Bloquea β -amiloide en altas dosis (0.1 mM)	Bloquea β -amiloide en dosis bajas (1nM)	✓
Baja permeabilidad del CNS	Debe tener alta permeabilidad del CNS	

Periferia de alta biodisponibilidad (efectos secundarios como diarrea) Debe tener baja biodisponibilidad periférica	
Post sintomático	Pre sintomático

5 El inventor considera que los resultados actuales sugieren que la conformación de T14 cíclico permite unirse a su objetivo específico, receptor nicotínico $\alpha 7$. Con referencia a la figura 12, se muestra un diagrama esquemático del receptor nicotínico $\alpha 7$. El receptor homomérico contiene cinco subunidades $\alpha 7$ idénticas, que cada una se disponen simétricamente alrededor de un poro central a través del cual los iones tal como Na^+ y Ca^{2+} , pasan cuando se activa el receptor. Cada subunidad $\alpha 7$ contiene un sitio de unión ortostérico (es decir, el sitio activo) y un sitio de unión alostérico. La activación fisiológica normal del receptor se alcanza mediante la unión de una única molécula de acetilcolina a la interfaz de dos subunidades $\alpha 7$ a través de cada uno de sus sitios ortostéricos. Otros ligandos conocidos del sitio ortostérico incluyen (pero no se limitan a) colina y metillicaconitina (MLA). Los ligandos del sitio alostérico incluyen (pero no se limitan a) T14 cíclico y lineal, T30 cíclico y lineal, galantamina, ivermectina y PNU12.

10 Como se muestra en la figura 10, aunque no se desea estar limitado por esta teoría, el inventor considera que el β -amiloide ($\text{A}\beta$) es capaz de (i) unirse simultáneamente a ambos sitios de unión ortostéricos y alostérica del receptor nicotínico $\alpha 7$, o (ii) unirse no específicamente a uno cualquiera de estos sitios. El inventor ha encontrado que el T14 cíclico actúa como un antagonista en el sitio alostérico.

Diseño de fármaco

20 El inventor considera que será posible utilizar una conformación particular del T14 cíclico para diseñar un compuesto químico mucho más pequeño que, no bastante, imite aun forma tridimensional del T14 cíclico y sea capaz de cruzar más fácilmente la barrera hematoencefálica.

Ejemplo 13 - Caracterización físico-química del T-14 cíclico (es decir, denominado como "NBP14")

25 Antecedentes

30 La solubilidad de un compuesto en soluciones acuosas y orgánicas afecta fuertemente su capacidad para cruzar las barreras fisiológicas en el cuerpo, tal como la gástrica o entérica. En el caso de fármacos que se dirigen a enfermedades del cerebro, por ejemplo, demencia, se tiene que cruzar una barrera adicional, la barrera hematoencefálica. El coeficiente de partición, también conocido como Log P, evalúa la capacidad de un compuesto para solubilizarse en agua y disolvente orgánico, que se correlaciona con la capacidad de un compuesto para cruzar las barreras diferentes biológicas.

35 Procedimientos detallados

Preparación de disolvente

40 Se realiza la saturación de los disolventes como sigue. Se agita 1-octanol en la presencia de agua durante 24 h a temperatura ambiente. Se agita agua mQ en presencia de 1-octanol durante 24 h a temperatura ambiente. Luego las soluciones se dejan equilibrar durante la noche a temperatura ambiente. Se recolectan los disolventes saturados, utilizando jeringas y agujas y se almacenan a temperatura ambiente hasta uso adicional.

Procedimiento de agitación de tubo

45 Se coloca agua saturada y 1-octanol en un tubo de vidrio en la siguiente relación: cada tubo contenía el equivalente de 0.25 mg de T14 cíclico. Todos los tubos se mezclaron luego durante 4h a temperatura ambiente. Después de agitación los tubos se dejaron equilibrar a temperatura ambiente.

Curva estándar

50 Las concentraciones de T14 cíclico utilizadas para la curva estándar fueron: $0.5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.25\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.13\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.066\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.033\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $0.016\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. La absorbancia y la curva estándar se miden en 280 nm.

55 Análisis de muestra

Se recolectan ambas fracciones de cada muestra por separado utilizando una jeringa con aguja. Se mide la absorbancia de todas las fracciones en 280 nm y se estima la concentración de toda la fracción con base en la curva estándar. El coeficiente de partición del T14 cíclico se calcula utilizando la siguiente ecuación:

60 $\text{Log P} = \text{Log} (\text{Concentración en Octanol} / \text{Concentración en agua})$

Los resultados de cada condición se promedian con el fin de obtener el Log P del T14 cíclico.

Resultados y sus implicaciones

5 El Log P del T14 cíclico es -0.5899. Un valor negativo para Log P significa que el compuesto es probablemente hidrófilo. Sin embargo, un Log P cerca a 0 que corresponda a un compuesto con la capacidad de ser soluble en un ambiente lipófilo. Por lo tanto, se puede formular NBP14 para cruzar la BBB.

10 Ejemplo 14 - Efectos de T-14 cíclico y T30 (es decir, NBP-14) en células PC12

Para caracterizar adicionalmente los efectos protectores del NBP-14 contra la toxicidad T30, los inventores han determinado el efecto de concentración en tres sistemas in vitro ((A) influjo de calcio; (B) liberación AChE; (C) Viabilidad celular), como se detalla en la sección de procedimientos adelante.

15 Procedimientos

(A) influjo de calcio

20 Se colocan en placas células PC12 en 200 µl de medio de crecimiento completo el día antes del experimento en placas de 96 pozos. En el día del experimento, se prepara la solución Fluo-8 (Abcam) (según el protocolo del proveedor). Posteriormente, se retiran 100 µl del medio de crecimiento y se agrega 100 µl de solución Fluo-8. Los tratamientos con T30 y NBP-14 se agregan e incuban durante 30 minutos en el incubador y 30 a temperatura ambiente.

25 Después de 1 hora, la placa se coloca en el lector de placa de fluorescencia (Fluostar). Antes de leer la fluorescencia, se prepara acetilcolina (ACh) 100 µM y se coloca en el inyector Fluostar. Para cada pozo, se realiza la lectura formada mediante fluorescencia basal seguida por inyección de acetilcolina que inducirá un aumento de calcio a través de receptores nicotínicos. Los efectos del T30 y NBP-14 se evalúan luego.

30 (B) Liberación de AChE

El protocolo utilizado para detectar cambios en la actividad AChE es igual como se describió anteriormente.

35 (C) Viabilidad celular

Se utiliza un Kit-8 de conteo celular (CCK-8) como una mejora de la técnica SRB utilizada anteriormente. Al utilizar la sal de tetrasodio altamente soluble en agua WST-8, el CCK-8 produce un tinte formazan soluble en agua luego de reducción en la presencia de un portador de electrones. El WST-8 se reduce mediante deshidrogenasas en células para dar un producto de color amarillo (formazan), que es soluble en el medio de cultivo de tejido. La cantidad de tinte formazan generada por la actividad de las deshidrogenasas en células es directamente proporcional al número de células vivas. Las células PC12 se colocan en placas en 200 µl de medio de crecimiento completo el día antes del experimento en placas de 96 pozos. Se agregan tratamientos con T30 y NBP-14 y se incuban durante 1 hora en el incubador.

45 Posteriormente, se retiran 100 µl de medio de crecimiento y se agregan 10 µl de solución CCK-8 (Kit-8 de conteo celular). La placa se incuba durante 2 horas en el incubador y luego se coloca en el lector de placa de absorción. La absorbancia de debe medir en 450 nm.

50 (A) influjo de calcio

Como se indicó anteriormente, el T30 es un modulador alostérico positivo del receptor nicotínica α7. Por lo tanto, la acetilcolina agonista primaria se utiliza como marca de referencia del influjo de calcio de control como 100%). El T30 (5 µM) mejora este efecto hasta 171.05% ± 6.21%; N=3. El aumento de concentraciones de NBP-14 (5, 7, 9, 10, 20, 50, 70, 1000, 5000 nM) se agregó posteriormente para determinar el antagonismo de estos T30-aumentos inducidos. Los valores son (respectivamente) (%): 134.2497 ± 6.85, 120.8612 ± 8.65, 13.9162 ± 8.82, 140.776 ± 12.16, 115.83 ± 7.67, 110.3213 ± 13.21, 125.9596 ± 0.1, 99.85 ± 0.32, 115.1942 ± 9.84, 79.99 ± 14.04. La figura 13 muestra que el NBP-14 bloquea los efectos de T30 en una forma de concentración, que es protectora en un bajo rango nanomolar.

60 (B) liberación de AChE

Como se describió anteriormente, las células PC12 responden al efecto tóxico del T30 con una respuesta "compensadora", es decir, un aumento en la actividad AChE de liberación: 169.45% ± 2.11%; N=3. Los inventores determinan el efecto dependiente de dosis del NBP-14 contra 5 um T30. Los resultados muestran (Figura 14) que el NBP-14 protege de los efectos compensadores del AChE en altas concentraciones nanomolares. Los valores son

(respectivamente) (%): 130.73 ± 1.84 , 111.68 ± 2.26 , 92.78 ± 0.99 , 82.56 ± 2.38 , 68.90 ± 0.92 , 65.12 ± 1.32 , 61.04 ± 0.97 , 79.43 ± 1.69 , 116.65 ± 3.62 , 107.79 ± 5.10 , 83.91 ± 1.24 , 89.55 ± 1.25 .

(C) Viabilidad celular

5 El T30 (5uM) induce un 25% ($74.309\% \pm 2.87\%$; N=3) de reducción de viabilidad celular que se bloquea progresivamente mediante NBP-14 en una forma de efecto de concentración (Figura 15). Los valores son (respectivamente) (%): 76.25 ± 7.51 , 67.04 ± 4.35 , 76.04 ± 4.22 , 71.36 ± 1.64 , 79.02 ± 10.22 , 75.19 ± 3.9 , 62.43 ± 3.01 , 78.10 ± 2.16 , 116.65 ± 3.62 , 107.79 ± 5.10 . El NBP-14 protege de la muerte de células inducidas por T30 en alto rango nanomolar.

10 Ejemplo 15 - Efectos de T30 y T-14 cíclico (es decir, NBP14) en redes corticales in vitro en rodajas de cerebro de rata

15 Antecedentes

El péptido T30 es un segmento de 30 aminoácidos de acetilcolinesterasa (AChE), del cual también se divide el T14. Ambos inducen el mismo efecto, que sugiere que su secuencia activa está presente en el T14, y a su vez presente en el T30. La investigación ya ha mostrado la bioactividad de T14 en rodajas de cerebro de mamífero como un agente altamente modulador. El efecto del T14 se reportado que modula las redes corticales, que incluyen tanto excitación como inhibición en diferentes concentraciones: en bajas concentraciones el péptido activa el influjo de calcio mejorado a través del receptor alfa-7, pero altas concentraciones inducen dichas cantidades excesivas de calcio que inactiva el canal (Badin et al., 2013; Bon and Greenfield, 2003), así como activar la plasticidad neuronal (Greenfield et al., 2004).

25 Con el fin de obtener de nuevo comprensión de las acciones del T14/30 en las redes corticales completas, la técnica relativamente reciente de formación de imágenes de tintes sensibles al voltaje (VSDI) se utiliza con el fin de monitorizar las dinámicas de la actividad de población neuronal colectiva, "montajes neuronales", en rodajas de cerebro en una escala temporal de milisegundos (ms, acorde con eventos fisiológicos) y micrómetros (μm). Dicha técnica explota la sensibilidad de moléculas lipófilas específicas que contiene un núcleo fluorescente para cambios en potenciales eléctricos (Tominaga et al., 2000). Debido a su naturaleza lipófila, estas moléculas de tinte incorporadas en ellas mismas en membranas celulares, y alteran su lectura de fluorescencia con respecto al potencial tensión a través de esa membrana específica, que se captura con una cámara de alta velocidad de resolución de milisegundos. Como resultado, la formación de imagen utilizando tintes sensibles a la tensión proporciona una lectura en línea y directa de cambios de potencial eléctricos a través de membranas de células neuronales con una resolución espacio-temporal sin paralelo.

40 Utilizando esta técnica los inventores pueden obtener grupos completos de datos sobre actividad de población neuronal tal como (a) la intensidad de la respuesta en cualquier área dada, de la cual (b) la dispersión de montajes neuronales producidos se puede unir y desde este parámetro (c) la velocidad de propagación de la actividad de frente de onda desde el punto de iniciación (d) medido como la pendiente de la dispersión. Cada uno de estos parámetros se ha medido independientemente para dos experimentos llevados a cabo hasta ahora: 1) una investigación de los efectos inducidos al aumentar las concentraciones (0.5, 0.75, 1 y 5 μM) de T30 en actividad y sensibilidad de población cortical y 2) evaluar los efectos antagonicos de NBP-14 en una única concentración T30 relativamente alta (1 uM).

45 • Técnica utilizada: formación de imágenes de tinte sensible a la tensión (Di-4-ANEPPS) de rodajas de cerebro de rata (Wistar) p14 de talamocortical (TC).

50 • Paradigma de estimulación: estimulación de pulso emparejado 40 Hz (consistente con estimulación recurrente talamo-cortical).

55 • Paradigma de perfusión: épocas llevadas a cabo en dos fases - para cada perfusión de fármacos (decir: control, 0.1 uM T30 etcétera), se aplica la nueva perfusión se deja perfundir durante 15 minutos antes de empezar el periodo de registro (también 15 minutos), de tal manera que el fármaco tiene tiempo de alcanzar su concentración actual e inducir sus efectos dependientes de concentración una vez registrados, significa una época de perfusión que dura 30 minutos con registro que solo tiene en cuenta por lo menos 15 minutos de su época de perfusión respectiva.

60 Métodos detallados

Preparación de rodajas de cerebro

65 Se anestesian ratas Wistar macho (14-17 días de edad; 15 animales en total) utilizando isoflurano: se aplica 10 mL de isoflurano 100% p/p al lecho de algodón en el fondo de una cámara de anestesia (caja de vidrio de 20x15x15 cm) en donde las ratas estaban luego se colocan durante ~45 segundos hasta el inicio de la anestesia. Se pincha la pata trasera de cada rata anestesiada para revisar la profundidad adecuada de la anestesia. Una vez se confirma la

anestesia, se decapitan rápidamente las ratas antes de sumergir el cerebro en fluido cerebroespinal artificial enfriado en hielo, oxigenado ("rebanado" aCSF en mmol: 120 NaCl, 5 KCl, 20 NaHCO₃, 2.4 CaCl₂, 2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 10 glucosa, 6.7 de HEPES sal y 3.3 HEPES ácido; pH: 7.1) durante 7-8 minutos, el tiempo tomado para cortar el cerebro en rodajas. Se cortan secciones para sagitales (400 µm de espesor) de un bloque de cerebro que contiene tanto tálamo (VPN) como corteza somato-sensorial primaria (campo de cilindro) utilizando un Vibratome (Leica VT1000S) y se transfiere a una tasa burbujeante que contiene un aCSF a temperatura ambiente ("registro" aCSF en mmol: 124 NaCl, 3.7 KCl, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, 1.3 KH₂PO₄ y 10 glucosa; pH: 7.1), que es idéntico a aquel que se utiliza durante registros electrofisiológicos y VSDI. Las rodajas se dejan en aCSF de "registro" oxigenado (95% O₂ - 5% CO₂) para recuperar por lo menos 1 hora antes de tinción VSD.

Configuración VSD

Las rodajas se colocan en una cámara oscura de alta humedad con aCSF burbujeante con 95% O₂ - 5% CO₂. La solución de tinte (tinte de estirilo 0.2 mM al 4% piridinio 4-[2-[6-(butilamino)-2-naftalenil]-etenil]-1-(3-sulfopropil)hidróxido (Di-4-ANEPPS, Invitrogen, Paisley, UK) (Tominaga et al., 2000) en aCSF al 46%, suero bovino fetal al 46%, DMSO al 3.5% y cremofor EL al 0.4%) luego se aplica a rodajas como se describió previamente (Badin et al., 2013). Cuando se empiezan los registros VSD, las rodajas se colocan en el baño de registro en una pieza pequeña de papel de filtro para conservar viva la rodaja y se pesa adecuada utilizando una rejilla plástica doméstica colocada en la parte superior de la rodaja. Debido al VSD fluorescente, todo el manejo de las rodajas durante y después de tinción con Di-4-ANEPPS se lleva a cabo en oscuridad casi completa con el fin de mantener los efectos perjudiciales de foto toxicidad y blanqueamiento al mínimo. El VPN (cuando se colocan los electrodos de estimulación) se identifica con respecto a la distancia de la punta del hipocampo y hasta el lado de la cápsula interna.

Los electrodos de estimulación, con impedancia (medida en 1000 Hz): 500 kΩ, se colocan en VPN, en donde se activan estímulos de pulsos pareados (2x100 µs de duración; 25 milisegundos de intervalo inter-estímulos - ISI - - pulso pareado en 40 Hz) para evocar ondas de actividad de propagación de ritmo rápido en los cilindros inervados utilizando Spike 2 V6.0 (CED Ltd, Cambridge, UK) con respecto a ISI adecuado. Dichos "montajes neuronales" transitorios se registran al adquirir imágenes de 16 bits con una resolución de 1 ms utilizando un sistema de imágenes ultrarrápidas MiCAM Ultima acoplado a una cámara digital (Brain Vision MiCAM Ultima R3-V20 Master) con el software de imágenes Ultima 2004/08 (Brain Vision). La luz se genera utilizando una lámpara de visualización/óptica HLX EFR 64634 xenophot halógena Osram y se filtra para emitir luz verde (530 ± 10 nm) utilizando un MHFG150LR (Moritex Corporation). La fluorescencia emitida se pasa a través de un espejo dicróico y un filtro de paso alto >590 nm como se describió previamente (Collins et al., 2007; Devonshire et al., 2010a; Devonshire et al., 2010b; Grandy et al., 2012; Mann et al., 2005).

Preparación de fármaco y aplicación

Se preparan soluciones T30 y NBP-14 frescas al inicio de cada experimento, se agregan alícuotas de solución madre a aCSF de "registro" como adecuado y se aplica un baño en un índice constante de 1.5 mL por minuto de perfusión utilizando una bomba Minipulse 3 (Gilson Scientific Ltd, Bedfordshire, UK). Las condiciones de perfusión se dividieron en 2: la primera parte consiste de una perfusión de 15 minutos sin que tenga lugar registro, de tal manera que se puede lograr la concentración adecuada en el baño de registro antes de empezar la segunda parte de la condición de perfusión – en el que tiene lugar el registro durante los 15 minutos siguientes de perfusión (30 instantáneas promedio) - dando un total de 30 minutos por condición de perfusión.

Análisis de datos y estadísticas

El VSDI produjo imágenes bidimensionales de 4 x 4 mm (100 x 100 píxeles) de las cuales se extraen datos críticos tal como el curso de tiempo de activación, dispersión e intensidad de la señal provocada general. Para cada experimento VSDI, cada dato de instantánea entre 0 y 200 ms después de la estimulación, encapsulación de respuesta pico, tiene sus parámetros medidos y promediados para cada afección (total de 30 instantáneas por afección tanto para experimentos de T30 como T30 v NBP-14). Con el fin de alcanzar esto, se selecciona una región de interés (ROI) sobre el área activa, que abarca el ancho de la respuesta máxima después que ha sido filtrada con un umbral que aísla los píxeles activos como aquellos que muestran actividad mayor al 20% de la actividad máxima registrada dentro de la región de interés. Dichos datos se compilan luego para producir gráficas cuantitativas detalladas del alcance de intensidad de activación (Figura 16, 17, 18) así como mapas de "espacio-tiempo" cualitativo (Figura 19) para medir los efectos registrados, así como para producir representaciones visuales precisas de los datos adquiridos espacio-temporal. Todas las pruebas estadísticas (análisis de varianza - ANOVA) se realizan utilizando modelos de efectos mezclados no lineales ajustados a los datos utilizando R Studio mientras que todo el análisis y manejo de datos se realiza utilizando Mathematica 8 (Wolfram Research, USA). Para todas las pruebas estadísticas P<0.05 se considera significativo. Los datos se expresan como media ± EEM.

Resultados y discusión

La figura 16 muestra el efecto de aumentar la dosis de T30 en (A) intensidad de fluorescencia emitida, así como (B) dispersión de píxeles activos. Cada píxel tiene dimensiones de 40x40 μm lo que significa que su fluorescencia específica surge de la actividad de menos de 10 neuronas independientes. Cuando aumenta la concentración T30 dentro del baño de registro, la intensidad de fluorescencia dada por los píxeles activos disminuye. Esto indica una desincronización de actividad de población neuronal activada, ya que la despolarización de membrana neuronal simultánea y considerable de una cantidad de píxeles individuales hasta una lectura de fluorescencia mayor, se observa aquí el efecto opuesto (menor sincronía). Adicionalmente, aquí se utiliza un paradigma de estimulación de pulsos pareados de 40 Hz, como se puede observar de la gráfica de intensidad (Figura 16A). Los resultados muestran que no sólo es la fluorescencia reducida como resultado del tratamiento T30, sino que el segundo pulso (que se activa en 75 ms, 25 ms después del primero-pulso pareado de 40 Hz) muestra una facilitación mucho más reducida en comparación con la magnitud del pulso original.

Adicionalmente, como se puede observar de la gráfica de dispersión (figura 16B), la dispersión de los montajes corticales no se afecta significativamente por el tratamiento T30 hasta que se alcanzan niveles muy altos (5 μM), esto corrobora la teoría de que el T30 actúa como un agente modulador en redes todas las redes corticales. También es importante tener en mente que los diferentes parámetros resaltados por VSDI, tal como la velocidad de propagación, la dispersión y la intensidad de fluorescencia, frecuentemente se basan en principios subyacentes de dinámica cortical que no se relacionan necesariamente, lo que significa que cada uno de estos parámetros se debe analizar por separado y que sus resultados se deben interpretar primero independientemente uno del otro.

La figura 17 muestra el efecto de aumentar la aplicación de T30 luego de que se investigan en mayor detalle la iniciación y propagación de montaje. La figura 17 muestra que el T30 induce una reducción en velocidad de propagación de actividad neuronal (adquirida aquí como la pendiente de la fase de aumento), consistente con una reducción en la sincronía de las redes corticales, como se muestra en la figura 16, con un máximo de 3.5-veces de reducción en la velocidad de propagación bajo 5 μM de tratamiento T30. El resultado de lo anterior y los experimentos anteriores, se concluye que la concentración de 5 μM de T30 era tan alta que probablemente indujo suficiente influxo de calcio para estar en el umbral de inactivación del canal de iones, llevando de esta manera a una mezcla de efectos excitatorios/inhibidores dependiendo de la sensibilidad de la preparación particular, como se reportó anteriormente (Bon and Greenfield, 2003). Por lo tanto, los inventores utilizaron una concentración inferior, aun suficientemente potente, 1 μM de T30, para llevar a cabo experimentos posteriores que exploren la posibilidad de efectos antagónicos de NBP14. Esta concentración de T30, aunque aún bastante alta, se selecciona debido a la naturaleza del estudio actual, en el que un efecto de dilución inevitable se espera ya que el péptido penetra la rebanada de cerebro. Mientras tanto, para el NBP14, utilizaron incrementos de concentraciones de: 0.1, 5, 100 y 300 nM, es decir, 2 a 4 órdenes de magnitud menor que las concentraciones de T30, debido a estudios previos in vitro en células PC 12 que han indicado una afinidad bastante mayor para los receptores de acetilcolina nicotínicos alfa-7 en comparación con aquel del T30.

La figura 18 muestra un antagonismo de los efectos T30 al incrementar las concentraciones de NBP-14. La figura muestra la naturaleza antagónica de NBP-14 sobre los efectos moduladores inducidos por la perfusión T30 en poblaciones neuronales. Una consideración importante es el factor de dilución ya que el T30 penetra las rodajas, incluyendo todos los procesos fisiológico potencialmente aun presentes y activos dentro de las rodajas de cerebro, tal como proteasas, absorción de neurotransmisores y la densidad de la matriz celular; por lo tanto, parece altamente probable que una concentración de 1 μM de T30 tomaría tiempo para inducir sus efectos completos (45-60 minutos, como lo sugieren los datos presentados anteriormente). Teniendo esto en mente, los efectos de T30 llegan a ser evidentes durante la perfusión de 5 nM NBP-14 (línea /barra naranja), después de lo cual la tendencia inducida por T30 se reversa de nuevo hacia valores iniciales (bar/línea azul).

También es importante tener en cuenta que el NBP-14 ha mostrado ser inerte, nunca induciendo algún efecto de modularidad sobre sí mismo, implicando que los efectos vistos aquí se pueden atribuir primero a T30, y su reversión al antagonismo al incrementar las concentraciones de NBP-14. De manera importante, la amplia mayoría de los efectos de T14 se reducen de nuevo a niveles de control bajo perfusión de 300 nM de NBP-14, aunque el T30 se perfunde en una concentración de 1000 nM. Esto sugiere una afinidad significativamente mayor del NBP-14 para su objetivo en comparación con T30.

La figura 19 muestra resultados cualitativos de los tres experimentos (es decir columna izquierda, centro y derecha) en donde se prueban los efectos T30 (1 μM) contra el aumento de concentraciones de NBP-14 (0.1, 5, 100 y 300 nM). El panel superior muestra las dos gráficas principales de datos promediadas: izquierda - intensidad de señal de fluorescencia, y derecha - dispersión de montajes evocados. El panel inferior muestra mapas de "espacio-tiempo" que mapea la actividad de una fila de píxeles que se encuentran sobre el área de interés (eje y) con el tiempo (310 ms total, eje x) para cada una de las condiciones de perfusión. La reducción drástica en intensidad de fluorescencia como resultado de coperfusión de T30 y NBP-14 es claramente evidente, ya que está en la gráfica de intensidad. Nota: los mapas de espacio-tiempo se etiquetan con su respectiva perfusión (izquierda), y tienen códigos de color con sus trazas correspondientes tanto en las gráficas de intensidad (derecha) como dispersión (izquierda).

Referencias

Badin, A.S., J. Eraifej, and S. Greenfield. 2013. High-resolution spatio-temporal bioactivity of a novel peptide revealed by optical imaging in rat orbitofrontal cortex in vitro: Possible implications for neurodegenerative diseases. *Neurop-harmacology*. 73C:10-18.

5 Bon, C.L., and S.A. Greenfield. 2003. Bioactivity of a peptide derived from acetylcholinesterase: electrophysiological characterization in guinea-pig hippocampus. *Eur J Neurosci*. 17:1991-1995.

Collins, T.F., E.O. Mann, M.R. Hill, E.J. Dommett, and S.A. Greenfield. 2007. Dynamics of neuronal assemblies are modulated by anaesthetics but not analgesics. *Eur J Anaesthesiol*. 24:609-614.

10 Devonshire, I.M., E.J. Dommett, T.H. Grandy, A.C. Halliday, and S.A. Greenfield. 2010a. Environmental enrichment differentially modifies specific components of sensory-evoked activity in rat barrel cortex as revealed by simultaneous electrophysiological recordings and optical imaging in vivo. *Neuroscience*. 170:662-669.

15 Devonshire, I.M., T.H. Grandy, E.J. Dommett, and S.A. Greenfield. 2010b. Effects of urethane anaesthesia on sensory processing in the rat barrel cortex revealed by combined optical imaging and electrophysiology. *Eur J Neurosci*. 32:786-797.

20 Grandy, T.H., S.A. Greenfield, and I.M. Devonshire. 2012. An evaluation of in vivo voltage-sensitive dyes: pharmacological side effects and signal-to-noise ratios after effective removal of brain-pulsation artifacts. *Journal of neurophysiology*. 108:2931-2945.

25 Greenfield, S.A., T. Day, E.O. Mann, and I. Bermudez. 2004. A novel peptide modulates alpha7 nicotinic receptor responses: implications for a possible trophic-toxic mechanism within the brain. *J Neurochem*. 90:325-331.

Mann, E.O., T. Tominaga, M. Ichikawa, and S.A. Greenfield. 2005. Cholinergic modulation of the spatiotemporal pattern of hippocampal activity in vitro. *Neuropharmacology*. 48:118-133.

30 Tominaga, T., Y. Tominaga, H. Yamada, G. Matsumoto, and M. Ichikawa. 2000. Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *Journal of neuroscience methods*. 102:11-23.

Ejemplo 16 -Efectos de NBP 14 en ratas que se mueven libremente

35 Antecedentes

A diferencia de los modelos animales para la enfermedad de Alzheimer, el modelo de ratas para el hemiparkinsonismo está muy bien establecido y fácilmente cuantificable. De acuerdo con lo anterior, se administra una inyección unilateral intra striatum de T30 para observar cualquier efecto de comportamiento de la toxina. En un experimento posterior, los efectos protectores potenciales del NBP14 se observan contra la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) bien conocida, que conduce a pérdida de neuronas DA en el lado inyectado mientras combate las neuronas DA contralaterales. El NBP-14 se administra a través de la cánula implantada en el fascículo del prosencéfalo medial (MFB). Se inyecta 6- hidroxidopamina en 10 mg/kg.

45 Métodos detallados

Los animales se anestesian utilizando ketamina (10%, 0.1 ml/kg de peso corporal) y xilacina (2%, 0.01 ml/kg). Los animales se inyectan luego etereotácticamente MFB con 2 µL de 6-OHDA en una concentración de 20 mg/ml en 0.02% de ácido ascórbico. Las coordenadas de lesión se establecen de acuerdo con bregma y dura en cm: L-1.7 mm; AP-3.6 mm; DV-8.0 mm. Luego de la inyección (velocidad de inyección 2 µl/5 min), la aguja de inyección se deja durante 1 minuto adicional para evitar retroflujo y luego se retrae lentamente.

Prueba de Colocación de Pata (Prueba de Cilindro): esta prueba evalúa el uso de la pata anterior independiente de la rata para apoyar el cuerpo contra las paredes de un cerramiento cilíndrico. La prueba aprovecha el impulso innato de los animales para explorar un ambiente nuevo poniéndose de pie sobre las patas traseras e inclinándose hacia las paredes circundantes. Para realizar esta prueba, se colocan las ratas individualmente en un cilindro de vidrio (21 cm de diámetro, 34 cm de alto) y se registra la exploración durante 3 minutos. No se permite la habituación al cilindro antes de registro. La exploración de las paredes se expresa en términos de la relación entre las patas intactas (R) y deterioradas (L) y se calcula como los valores de miembros anteriores derecho intacto + ambos dividido por valores de miembros anteriores izquierdo deteriorado + ambos (R/L). La prueba de colocación de pata se realiza en el día 1 para obtener datos iniciales, en el día 1 para selección y en el día 2.

65 Criterio de selección (Día 1): de acuerdo con la prueba de colocación de pata todos los animales con diferencias estadísticamente significativas entre patas se incluirán en el estudio (relación entre patas intactas (R) y deterioradas (L) se expresa como los valores de miembros anteriores derecho intacto + ambo dividido en los valores de miembros anteriores izquierdo deteriorado + ambos). Los resultados de todas las pruebas se presentan como el valor ± EEM

de grupo MEDIO. Los análisis de los datos mediante ANOVA de una vía luego de prueba de Tukey se aplicarán para determinar significancia de los efectos del tratamiento. Este estudio se realiza luego de la aprobación de una forma de aplicación presentada al comité para Conducta Ética en el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio que indica que el estudio actual cumple con las reglas y regulaciones establecidas.

5 La figura 20 resume el procedimiento seguido durante la prueba in vivo de NBP-14.

Resultados

10 Efectos de NBP14

Los análisis de relación R/L de colocación de pata refleja la lesión unilateral de la función motriz. En el día 2, es decir, dos días después de inyección de 6-OHDA y un día después de inyección de NBP-14, hubo una diferencia significativa en la relación R/L de colocación de pata entre el vehículo 6-OHDA y tratado: 7.54 ± 1.63 vs 3.62 ± 0.55 , respectivamente ($p < 0.05$). El tratamiento con NBP14 mejora la movilidad del miembro anterior lesionado después de una dosificación como se muestra en la prueba de colocación de pata (Figura 21).

Ejemplo 17 - Efectos de T30 y NBP14 en la APP y amiloide

20 Antecedentes

Ya se ha establecido que un exceso de calcio puede activar la división anormal de la proteína precursora amiloide (APP) y por lo tanto la liberación de beta amiloide ($A\beta$) (Hartigan and Johnson, 1999; CAI et al., 2012). En razón a que los inventores han demostrado que T30 aumenta el influjo de calcio en aproximadamente 70% en células PC12, es posible que dicho aumento de calcio active la producción de amiloides y una consecuente reducción en la longitud completa de molécula APP.

Metodología detallada: detección de APP

30 Protocolo de proteína de solubilización

Se colocan en placas células PC12 con medio de crecimiento en Platos Petri durante una semana con el fin de tener suficiente proteína para detectar APP en membranas PC12 y se tratan durante 1 hora con T30 y NBP-14 antes de solubilizar la proteína. Una vez las células han crecido hasta el 90% de confluencia, se retira el medio de crecimiento y las células se resuspenden en 2 ml de HBSS. La suspensión de las células se transfiere a un tubo de 15 ml y se centrifugan 5 minutos a 1000 rpm. Luego se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en regulador de lisis (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, pH 8) más inhibidores de proteasa (1 μ l:1 ml PMSF y 3 μ l:1 ml aprotinina) y se trituran al utilizar un Polytron durante 10 segundos. Posteriormente, el sedimento triturado se distribuye en eppendorfs de 1.5 ml y se giran o agitan durante 2 h a 4°C. Después de 2 h, los eppendorfs se centrifugan a 15000 rpm durante 20 minutos y se conserva el sobrenadante. Se utiliza el reactivo Bradford para cuantificar la proteína contenida en cada eppendorf.

Protocolo para electroforesis

45 Para detección de APP, se utiliza una alícuota de 25 μ g de proteína. Antes de empezar el protocolo se preparan reactivos como sigue:

Gel inferior (10%) (20 min para polimerizar)

50 Para 10 ml (2 geles): 3.6 ml H₂O MQ, 2.42 ml Acrilamida y 1.3 ml Bis-Acrilamida, 2.5 ml Tris-HCl-1.5 M pH 8.8, 0.11 ml SDS 10%, 0.06 ml de persulfato de amonio al 10%, 6.67 μ l TEMED (último ingrediente).

Gel superior (5%) (20 min para polimerizar)

55 Para 5 ml (2 geles): 3.67 ml H₂O MQ, 0.48 de Acrilamida y 0.26 ml de Bis-Acrilamida, 0.625 ml Tris-HCl 1 M pH 6.8, 0.05 ml de SDS 10%, 25 μ l de persulfato de amonio 10%, 5 μ l TEMED.

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

60 Para 100 ml: 18.16 gr Tris Base, csp 100 ml H₂O MQ, pH 8.8.

Tris-HCl 1 M pH 6.8

Para 100 ml: 12.1 gr Tris Base, csp 100 ml H₂O MQ, pH 6.8.

65 Regulador de muestra (4X)

ES 2 650 543 T3

Para 8 ml: 3.2 ml SDS 10%, 1.6 ml biorefinería, 2 ml Tris-HCl 1 M pH 6.8, 0.8 ml de B-mercaptoetanol, 0.4 ml azul bromofenol al 0.1% o rojo. (Uso 1X por experimento)

5 Regulador de corrida (10X)

Para 1 L: 30.3 g Tris base, glicina, SDS, csp 1 L de 10 gr de 144 gr H₂O MQ. (Uso 1X por experimento)

Las etapas para electroforesis son las siguientes:

10 a) Preparar los geles de acrilamida superior e inferior. El % para gel APP es gel inferior al 10% y gel de apilamiento al 5%.

15 b) Prepara 24 µl de muestra en una concentración de 25 µg (determinado por ensayo Bradford) (6 µl SB 4X que contiene β-mercaptoetanol + proteína + lisis) y se hierven a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizarlos.

c) Coloca el marcador de proteína y las muestras en los pozos del gel (20-30 µL).

20 d) procede a migración: 35 mA (casi 1 hora).

Protocolo para transferencia western

Antes de empezar el protocolo se preparan los reactivos como sigue:

25 Regulador de transferencia (1X)

Para 1 L: 3.03 g Tris base, 14.4 gr glicina, 200 ml de metanol, csp 1 MQ de H₂O L.

Tampón TBS (4X)

30 Para 1 L: 24.25 gr Tris base, 60 gr NaCl, csp 1 L MQ de H₂O, pH 7.5.

TBS- Regulador Tween

35 Para 1 L: 250 ml CDA 4X 0.5 ml de Tween 20, csp 1 MQ de H₂O L.

Existen 2 etapas a seguir, la electrotransferencia y la inmunodetección de proteína, véase en las etapas adelante:

40 1) Electrotransferencia

a) Activa la membrana PVDF: 1 minuto en MeOH y 2 minutos en MQ H₂O.

b) Coloca las membranas PVDF, papeles y esponjas en el regulador de transferencia durante 10 minutos.

45 c) Prepara la intercalación y procede con la transferencia de las proteínas desde el gel hasta la membrana PDVF: 0.2 A durante 2 horas.

2) Inmunodetección de proteínas

50 a) Bloquea los sitios inespecíficos de las membranas con leche al 5% (disuelta en TBS-T).

b) Incubación con el anticuerpo primario (disuelto en TBST/leche al 5%): proteína precursora anti-amiloide (ab2072, conejo) en una dilución 1:500 (20 µl en 10 ml), durante la noche a 4°C

55 c) Se lava la membrana con TBS-T (5 min x2).

d) Incubación con el anticuerpo secundario disuelto en TBS-T: Anti-conejo-HRP (cabra) dilución 1:5000 (20 µl en 10 ml) durante 45 minutos a temperatura ambiente.

60 e) Lava la membrana con TBS-T (5 min x2 + 10 min x1).

f) Toma una imagen con la opción Chemibox (luz blanca) para ver la posición de las bandas de marcador.

65 g) Agrega reactivo ECL (HRP) para detección de anticuerpo (1ml de cada componente) y toma varias imágenes con la opción Chemibox (sin luz).

Metodología detallada: Detección de A β 42 en medio de cultivo celular

Después de 1 hora de tratamiento, se recolecta el medio de cultivo y se diluye a 1:100, utilizando medio de cultivo como diluyente. Luego se colocan cuatro repeticiones de cada muestra diluida en la placa proporcionada mediante el kit de detección ELISA, de AnaSpec (Fremont, CA, USA). Luego se lleva a cabo la detección siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, la muestra se incuba durante 4 h en la presencia de 50 μ l de anticuerpo de detección. Luego se lava la placa siete veces con solución de lavado, las muestras se incuban luego con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) proporcionada con el kit durante 15 min después de la revelación de la muestra, la reacción se detuvo con la solución de detención y la densidad óptica se lee en 450nm.

La figura 22 es un diagrama que muestra la cascada de eventos que resultan del efecto de T30 en una célula: (1) T30 se une al sitio alostérico del receptor para mejorar la abertura del canal para influjo Ca^{2+} en la célula (Greenfield et al. 2004). (2) La entrada de calcio induce despolarización y la abertura del canal dependiente de voltaje (L-VOCC) que permite aún más Ca^{2+} en la célula (Dickinson et al., 2007). (3) Este aumento de calcio intracelular induce un aumento en liberación de AChE G4 que incluye T30 (Greenfield, 2013). (4) El calcio también induce una regulación por aumento del receptor nicotínico $\alpha 7$ que permitirá que se consiga más Ca^{2+} en la célula al proporcionar aún más objetivos para T30 (Bond et al., 2009). (5) El calcio activa las enzimas (es decir, GSK-3) que (a) aumentará el Tau, (b) activará la γ - secretasa/ β - secretasa que activará la división del amiloide tóxico extracelular que (c) junto con T30 promoverá aún más la cantidad tóxica de Ca^{2+} en la célula. (Hartigan and Johnson (1999), Cai et al. (2012), Garcia Ratés et al (2013)).

De acuerdo con lo anterior, utilizando inmunodetección, los inventores han determinado (i) niveles APP y (ii) liberación de amiloide luego de administración de T30 (5 μ M) y NBP14 (0.5 μ M).

Resultados

(i) Como se muestra en la Figura 23, el T30 reduce los niveles de APP de longitud completa en membranas de células PC12, un efecto reversado por NBP14. Los valores son: Control (100% \pm 10.98); T30 5 μ M (67.82% \pm 6.23%) y T30 + NBP-14 0.5 μ M (126% \pm 1.12%).

La figura 24 muestra inmunodetección mediante transferencia western representada en la gráfica. Los 3 tratamientos diferentes muestran niveles de expresión diferentes de APP (valores representados en la figura 24). Para cada proteína de condición se corrige mediante niveles de GAPDH.

La producción de APP se reduce mediante el péptido T30, un efecto que se reversa mediante NBP-14. Esto sugiere que se puede dividir el APP, liberando péptido amiloide- β 1-42 (A β 42).

(ii) Con el fin de determinar la liberación de A β 42 se utiliza un kit ELISA, disponible comercialmente, que mide el A β 42 presente en la solución. Esta prueba muestra que el T30 aumenta la liberación de A β 42 hasta aproximadamente 175% en comparación con el control y el NBP-14 lleva la liberación de A β 42 hasta a un valor cercano al control (véase figura 25).

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido cíclico que consiste de la SEQ ID No: 4.
- 5 2. Un polipéptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en terapia o diagnóstico.
3. Un polipéptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en tratamiento, alivio o prevención de un trastorno neurodegenerativo.
- 10 4. Un polipéptido cíclico para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el trastorno neurodegenerativo se selecciona de un grupo que consiste de enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Parkinson; Enfermedad de Huntington; Enfermedad neuronomotriz; Espinocerebral tipo 1, tipo 2 y tipo 3; Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELS); y Demencia Frontotemporal.
- 15 5. Un polipéptido cíclico para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el trastorno neurodegenerativo es enfermedad de Alzheimer.
6. Un polipéptido cíclico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el polipéptido cíclico:
20 -es un modulador alostérico selectivo del receptor nicotínico $\alpha 7$; y/o
- supera la unión para β -amiloide; y/o
25 - se aísla o purifica.
7. Un modulador alostérico receptor que comprende un polipéptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 1.
8. Un polipéptido cíclico, para uso como un modulador alostérico receptor, en el que el polipéptido cíclico es como se define en la reivindicación 1.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 1, o un modulador alostérico de receptor de acuerdo con la reivindicación 7 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 10. Un proceso para fabricar una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, el proceso comprende combinar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 1, o un modulador alostérico de receptor de acuerdo con la reivindicación 7, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 11. Uso del polipéptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 1, en un proceso analítico in vitro o ex vivo para investigar un receptor nicotínico $\alpha 7$.
- 45 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el procedimiento comprende investigar el sitio alostérico del receptor nicotínico $\alpha 7$, opcionalmente en el que el método comprende evitar un influjo adicional de calcio a través del receptor nicotínico $\alpha 7$.

Figura 1

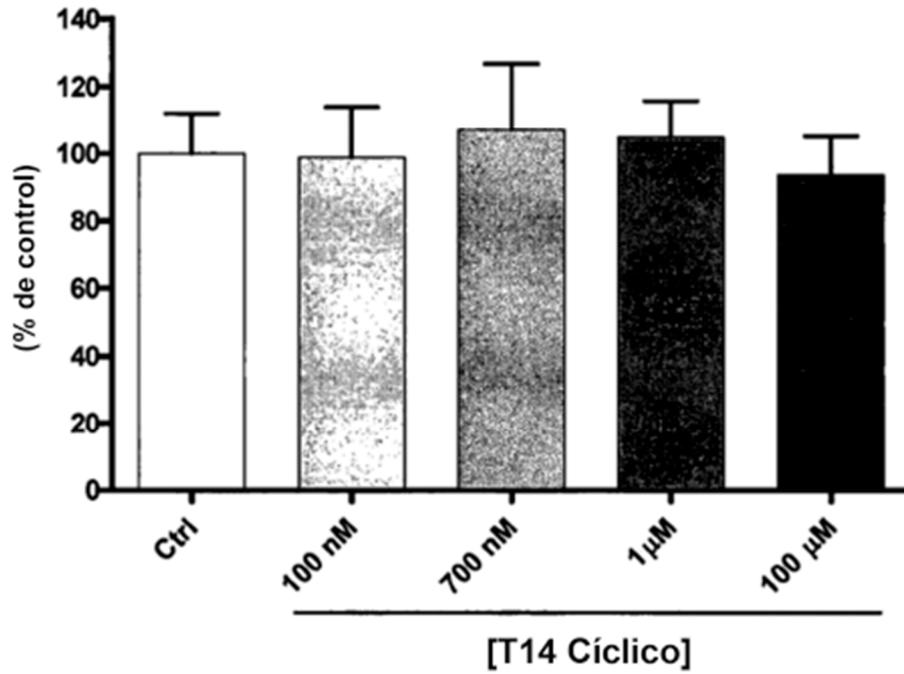


Figura 2

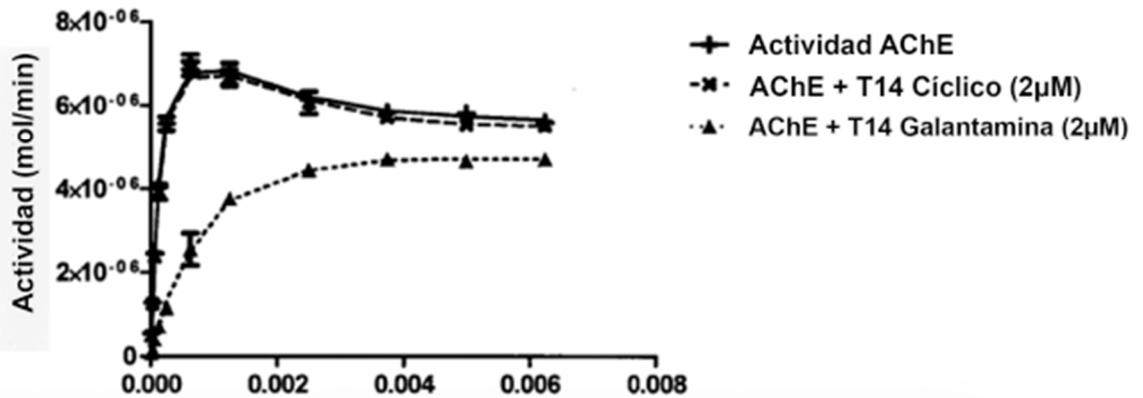


Figura 3

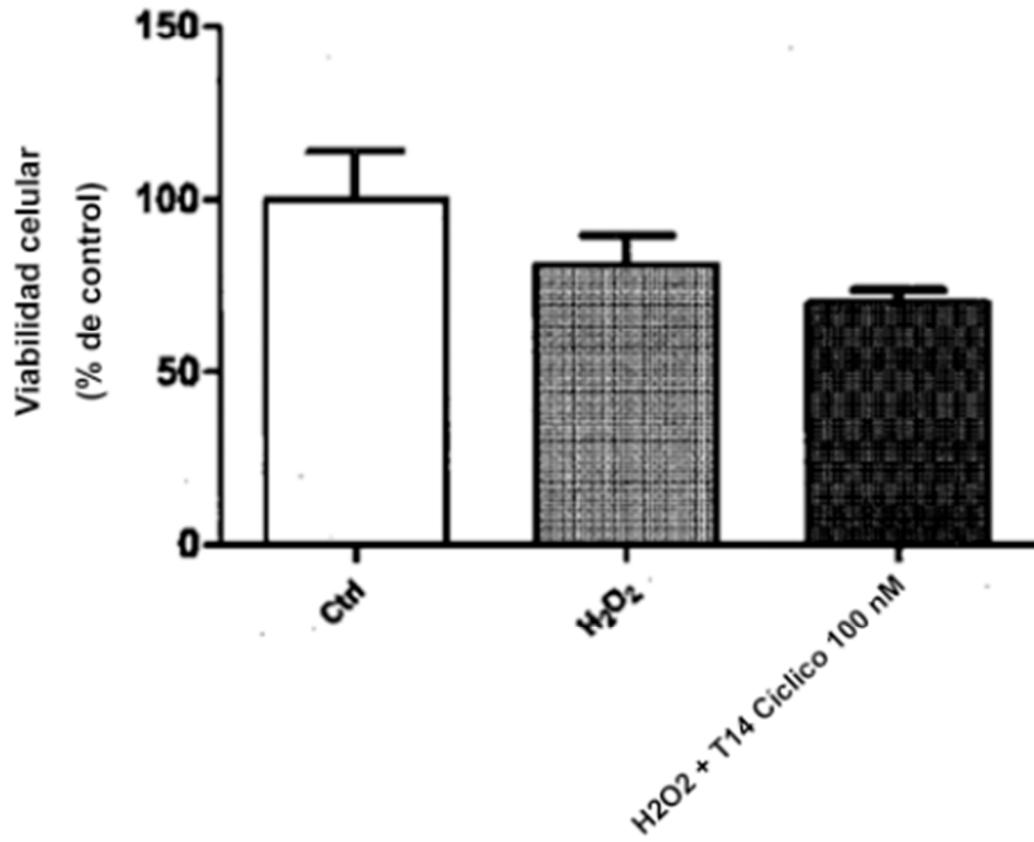


Figura 4A

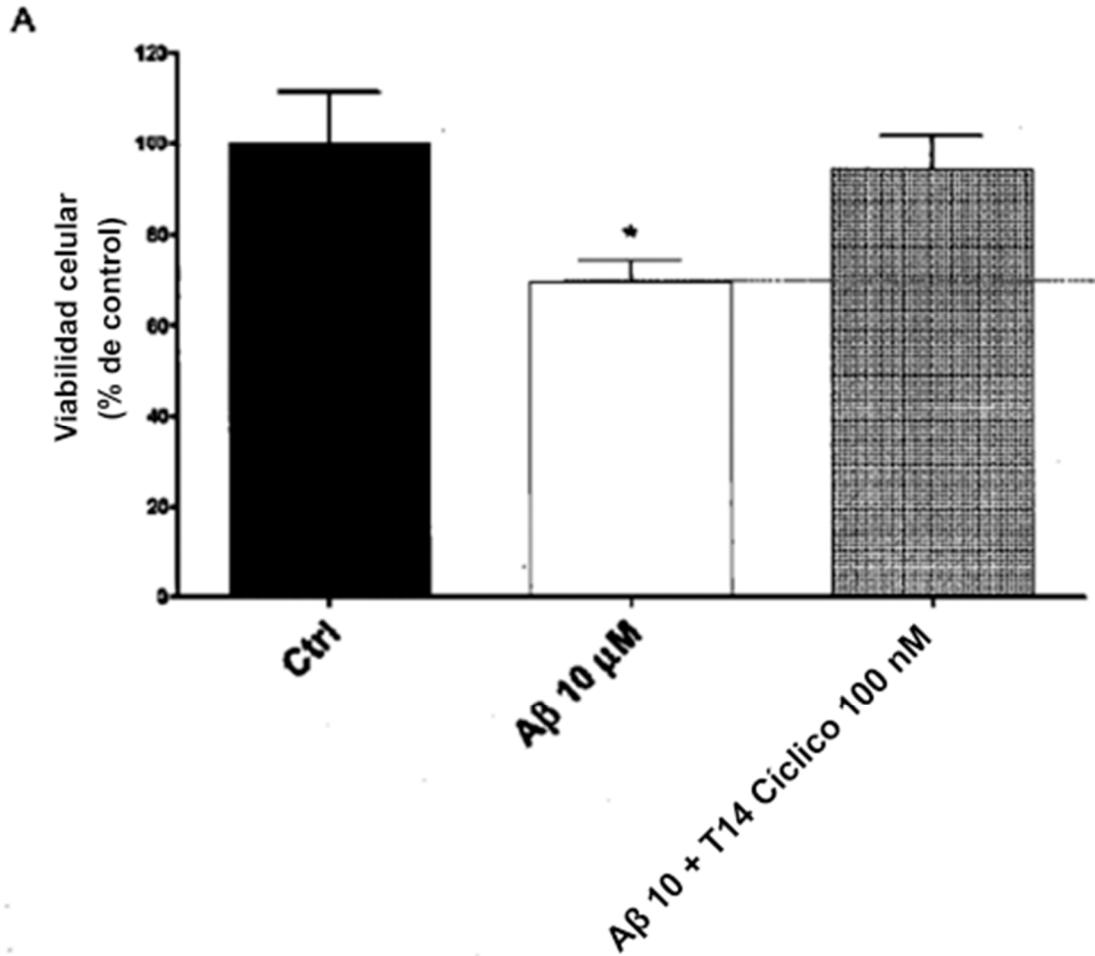


Figura 4B

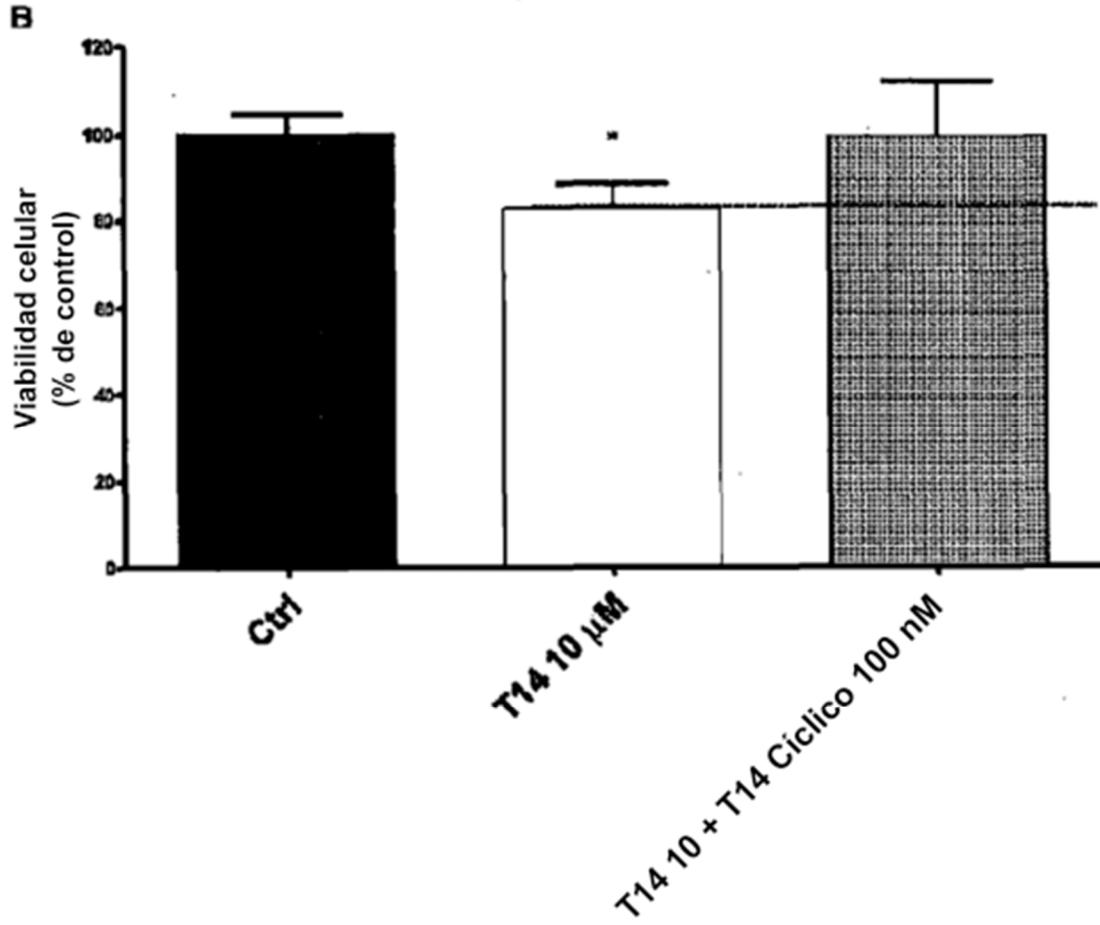


Figura 4C

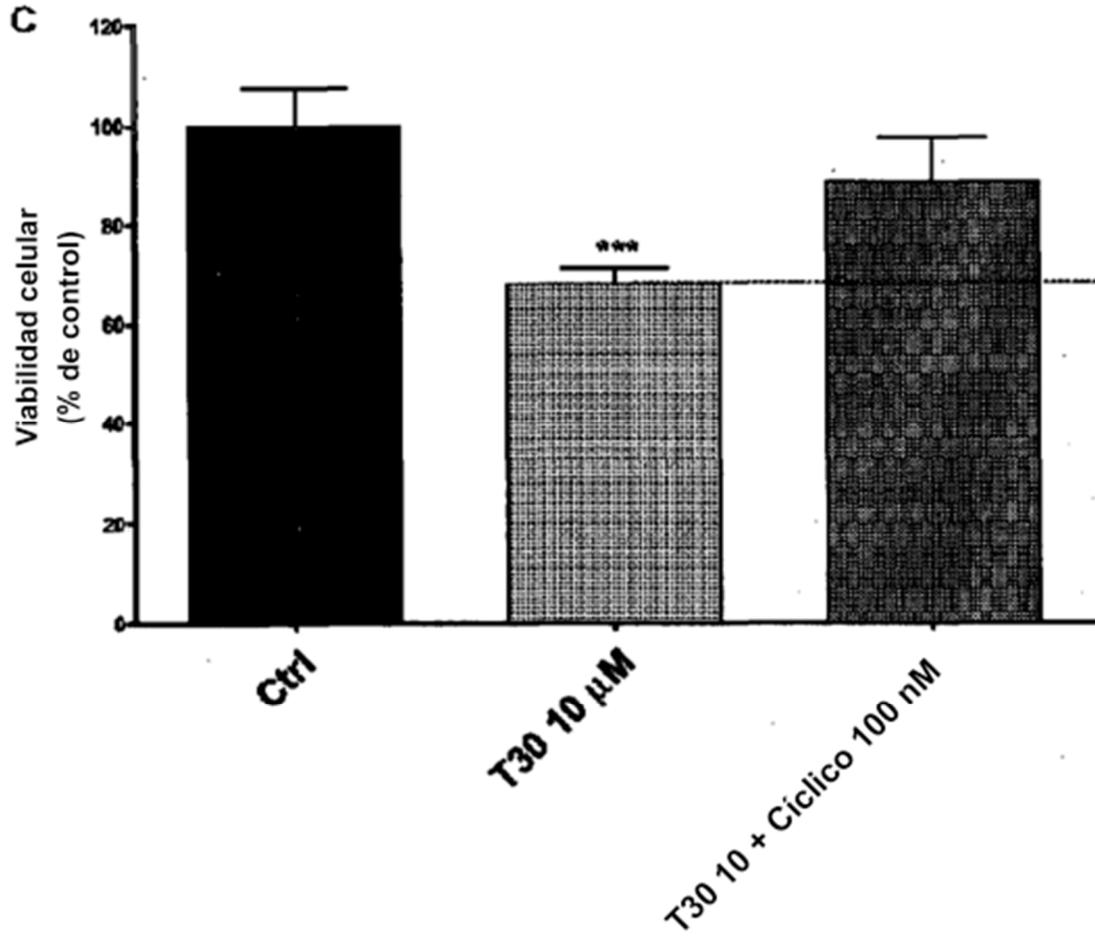


Figura 5

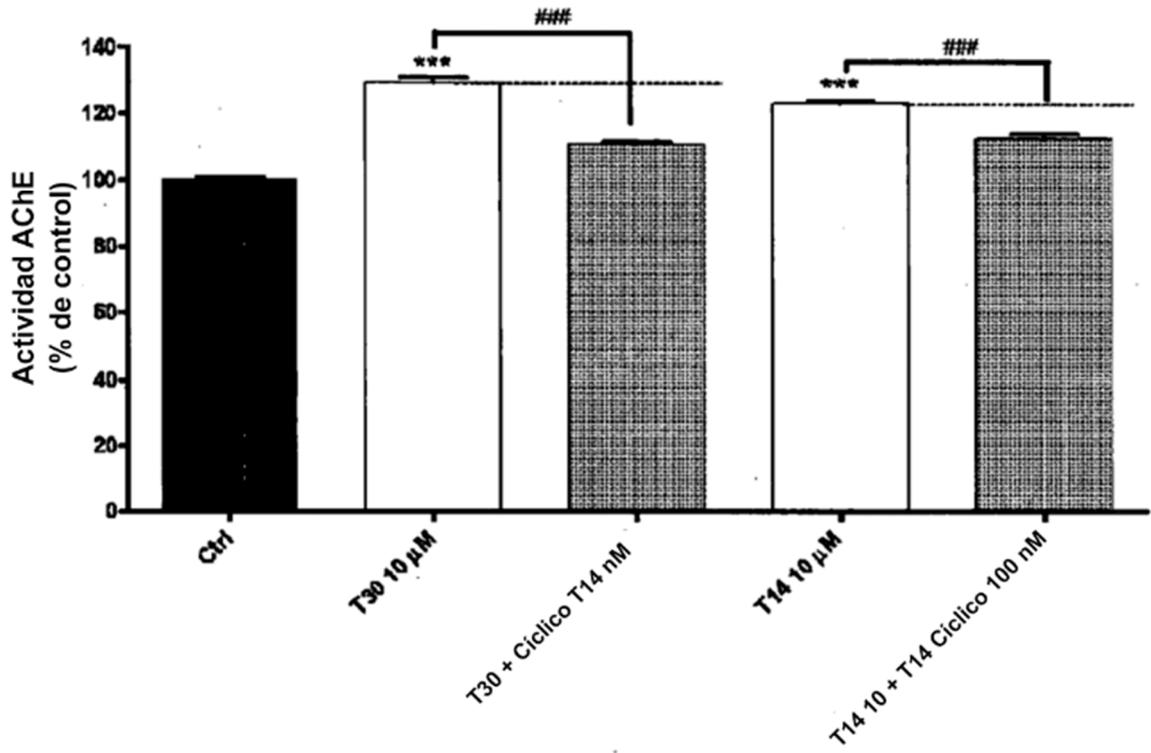


Figura 6

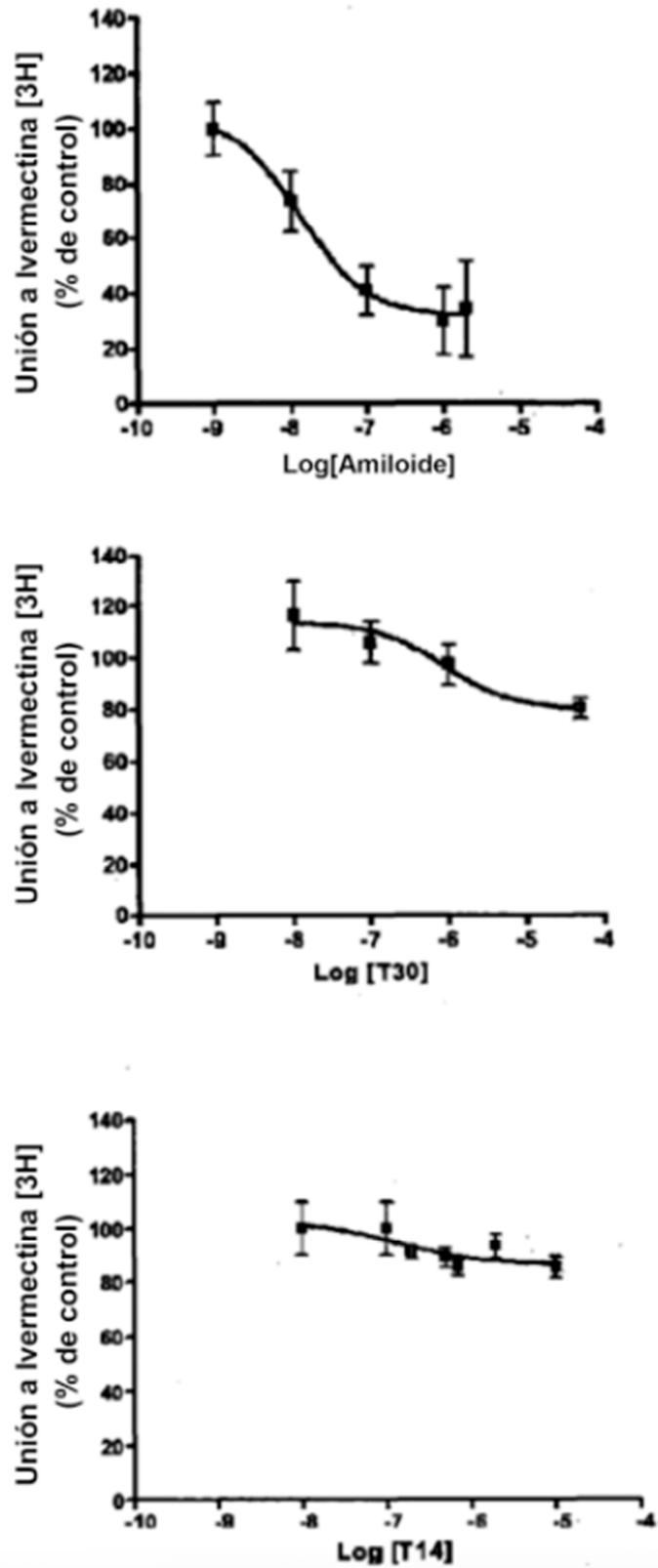


Figura 7

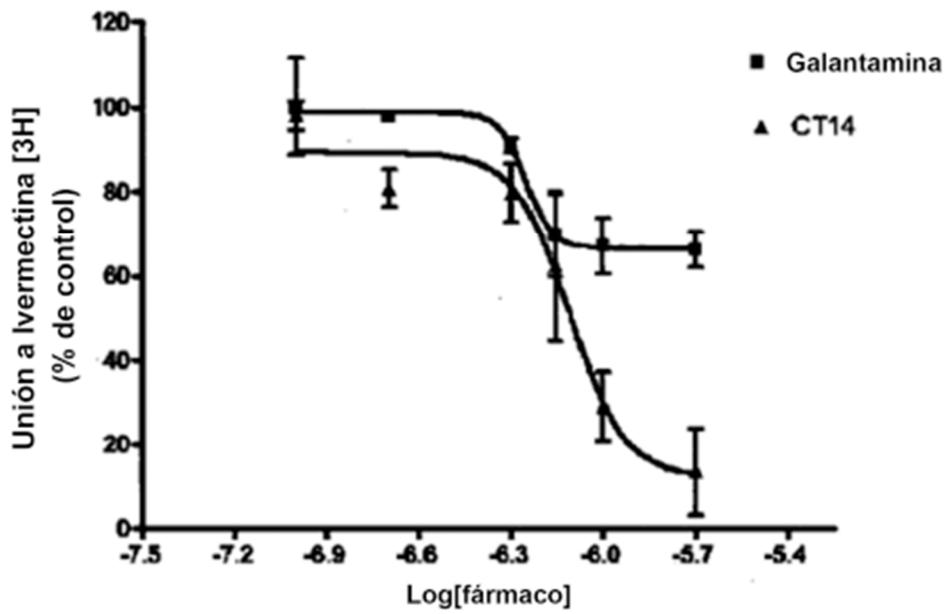


Figura 8

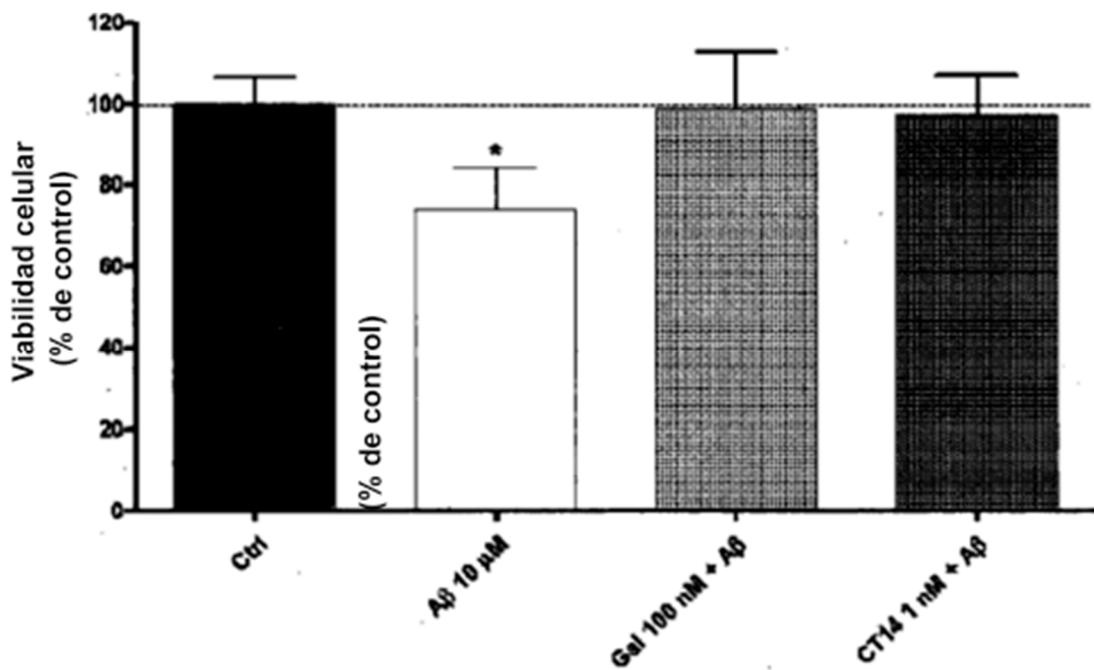


Figura 9

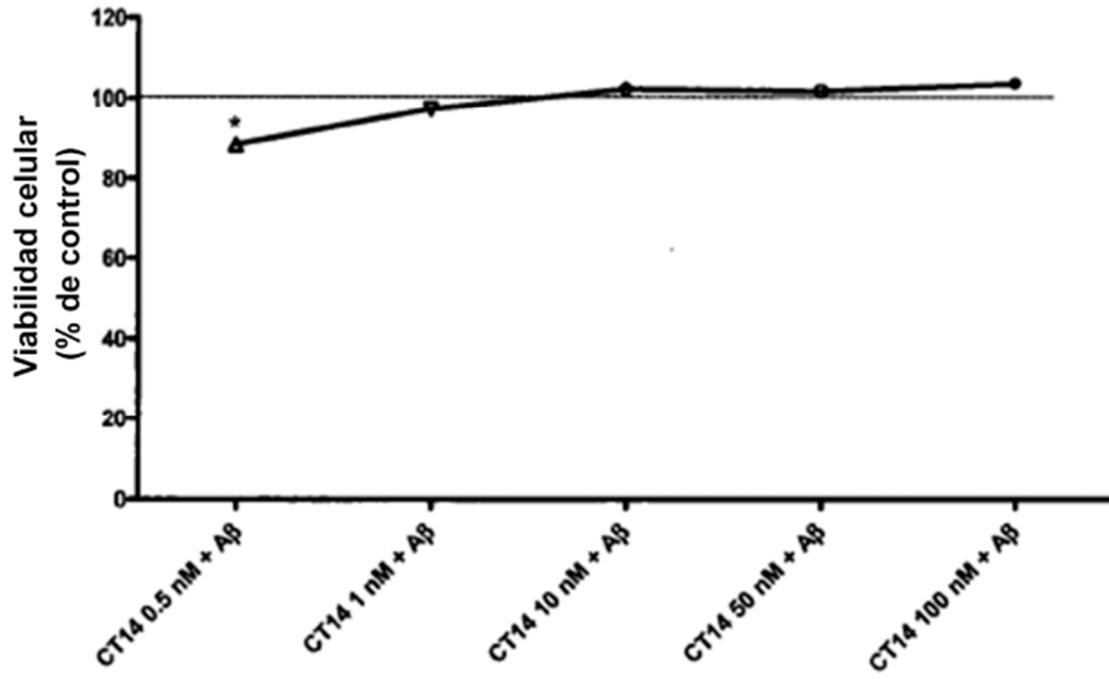


Figura 10

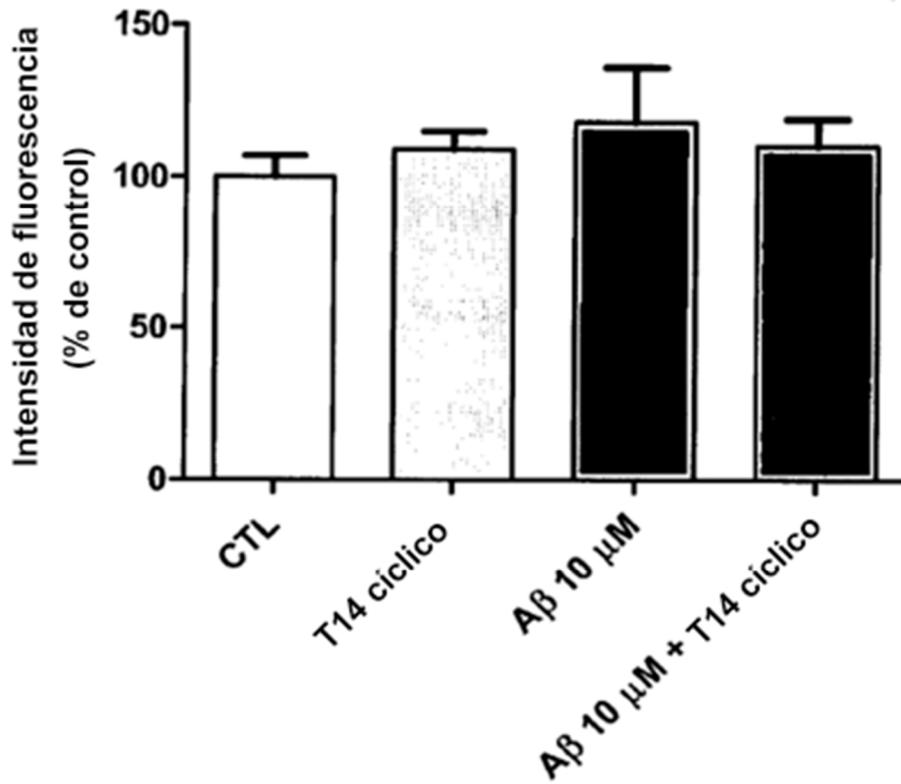


Figura 11

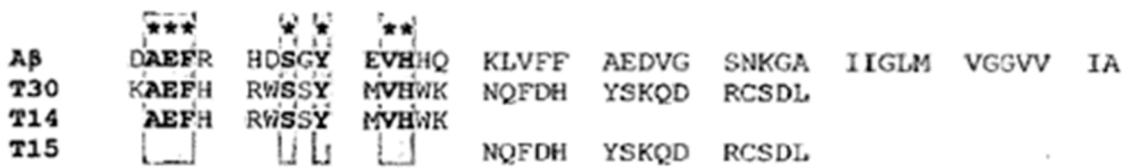


Figura 11

	***	* *	**						
Aβ	DAEFR	HDSGY	EVH HQ	KLVFF	AEDVG	SNKGA	IIGLM	VGGVV	IA
T30	KAEFH	RWSSY	MVHWK	NQFDH	YSKQD	RCSDL			
T14	AEFH	RWSSY	MVHWK						
T15				NQFDH	YSKQD	RCSDL			

Figura 12

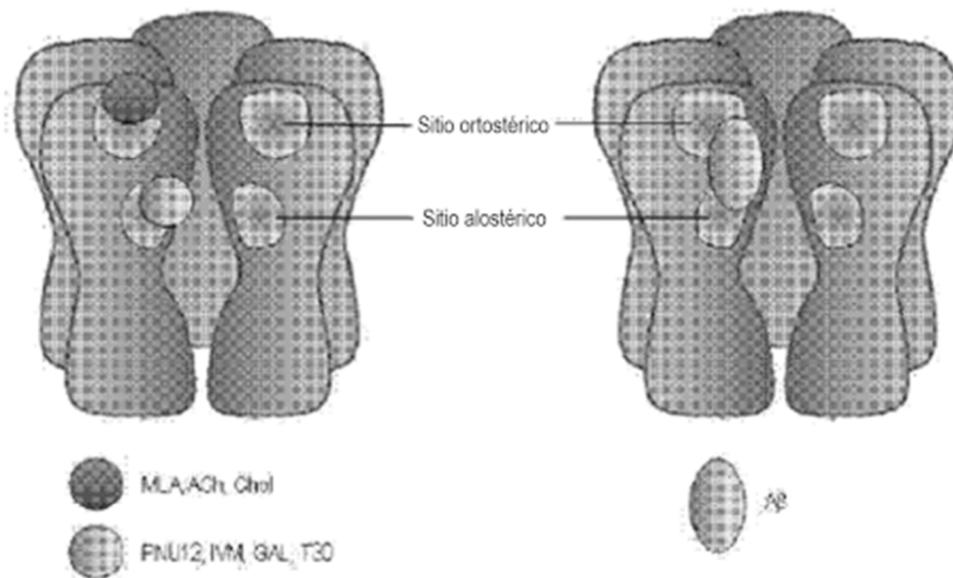


Figura 13

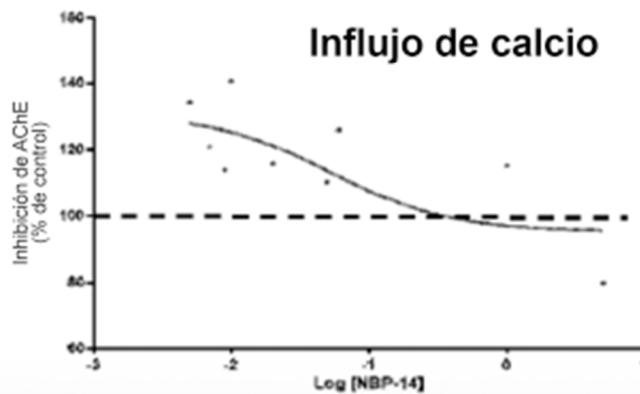


Figura 14

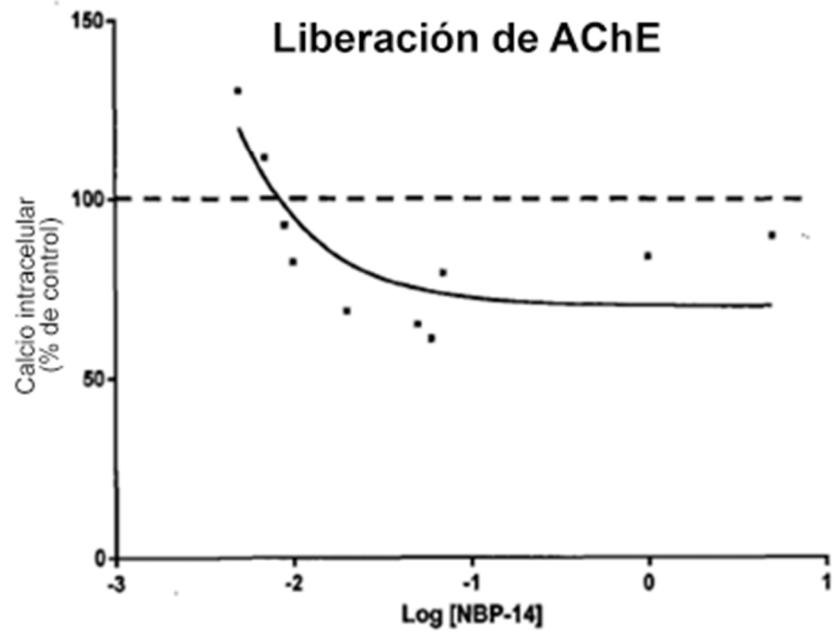


Figura 15

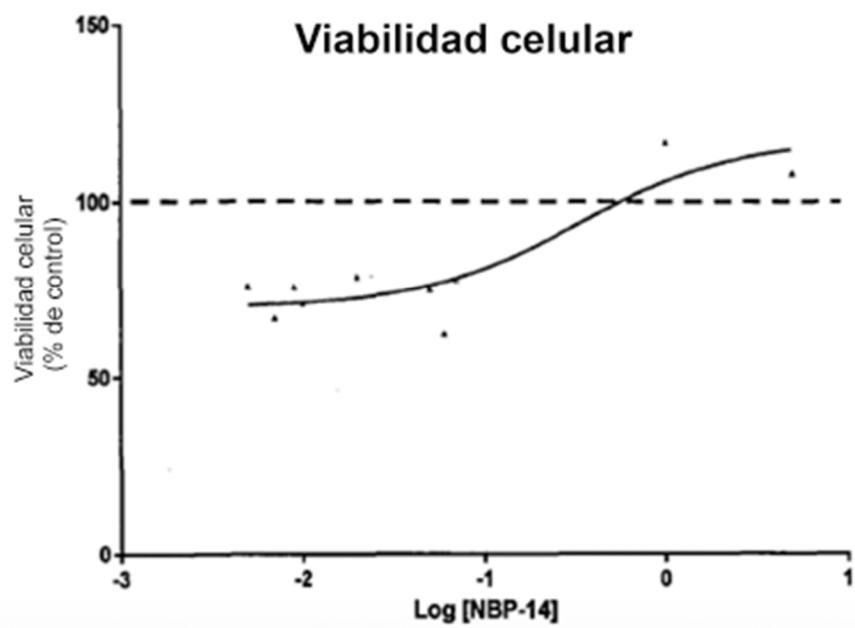


Figura 16

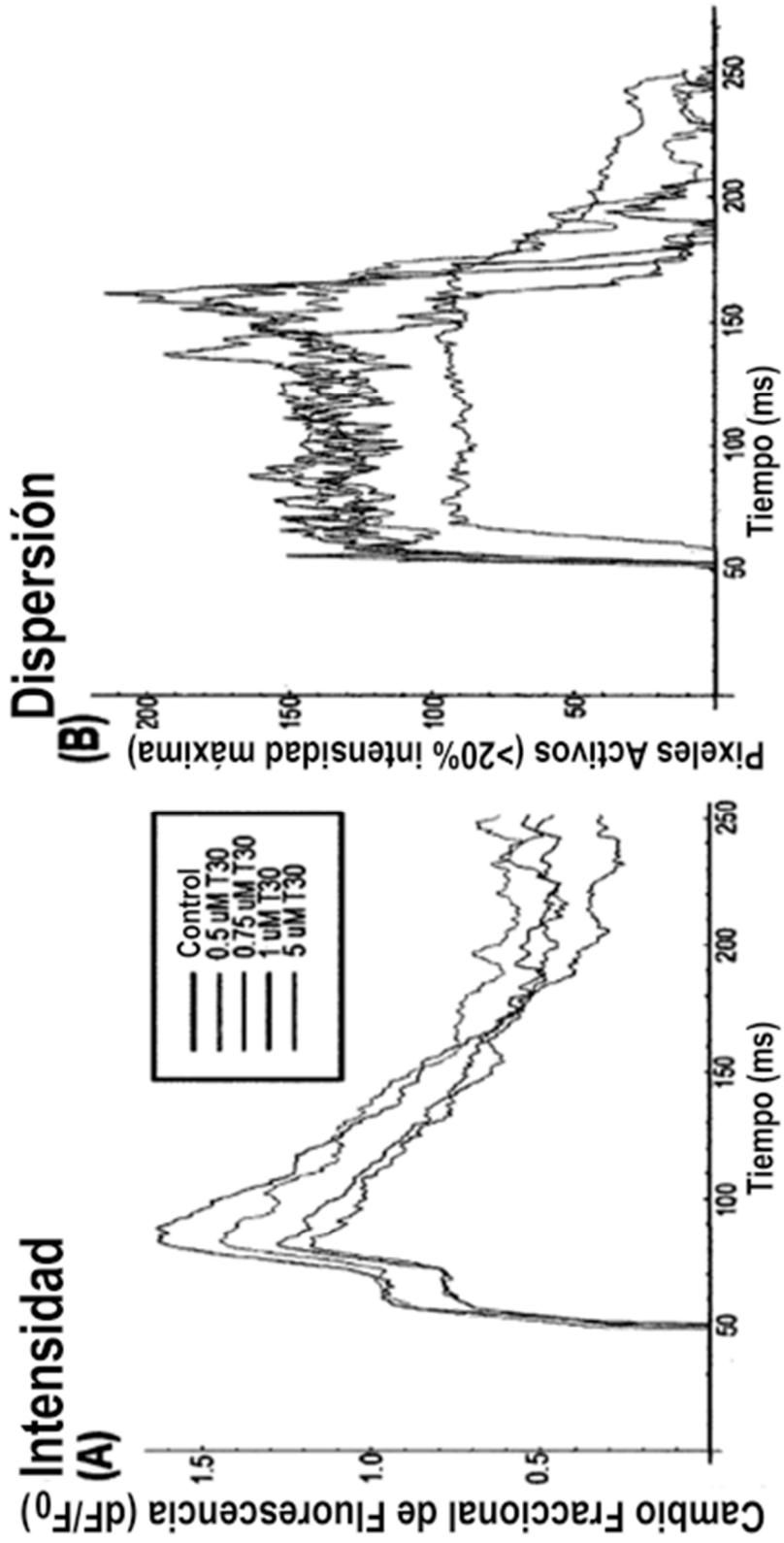


Figura 17 A

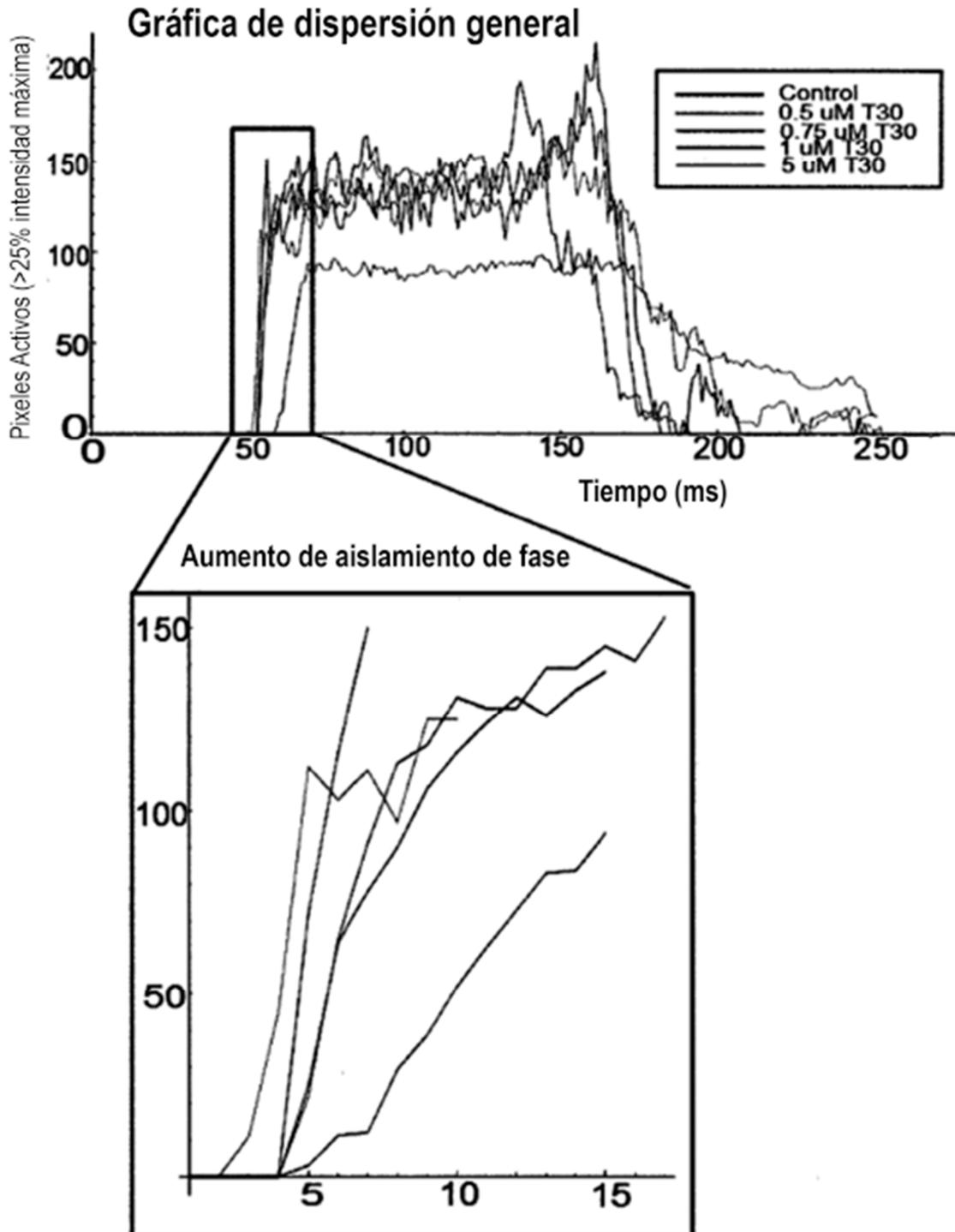
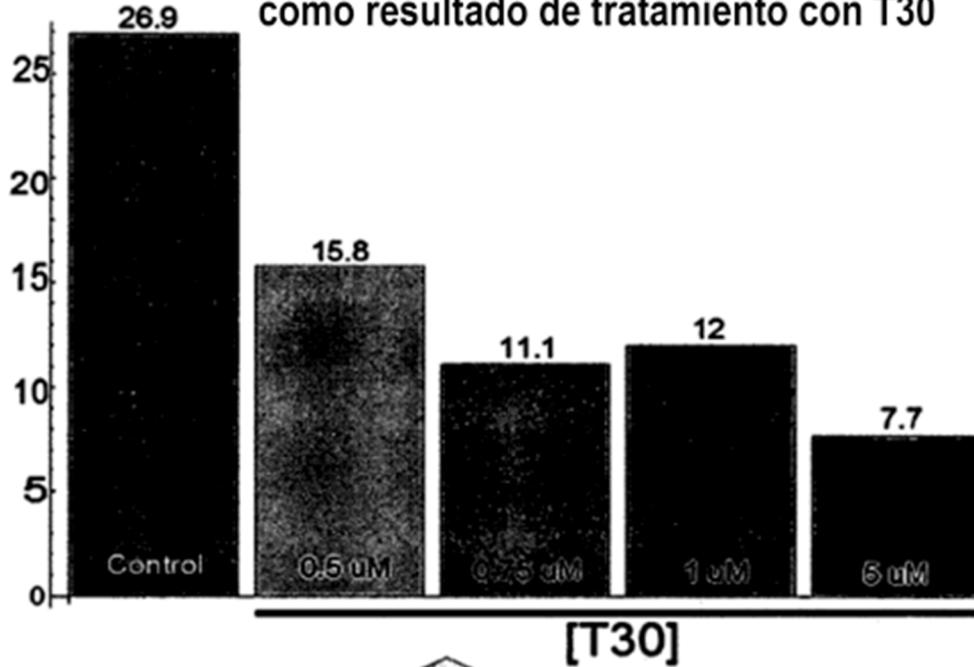


Figura 17 B

Comparación de alteraciones de velocidad de dispersión como resultado de tratamiento con T30



Ajuste de regresión lineal para aumentar curvas

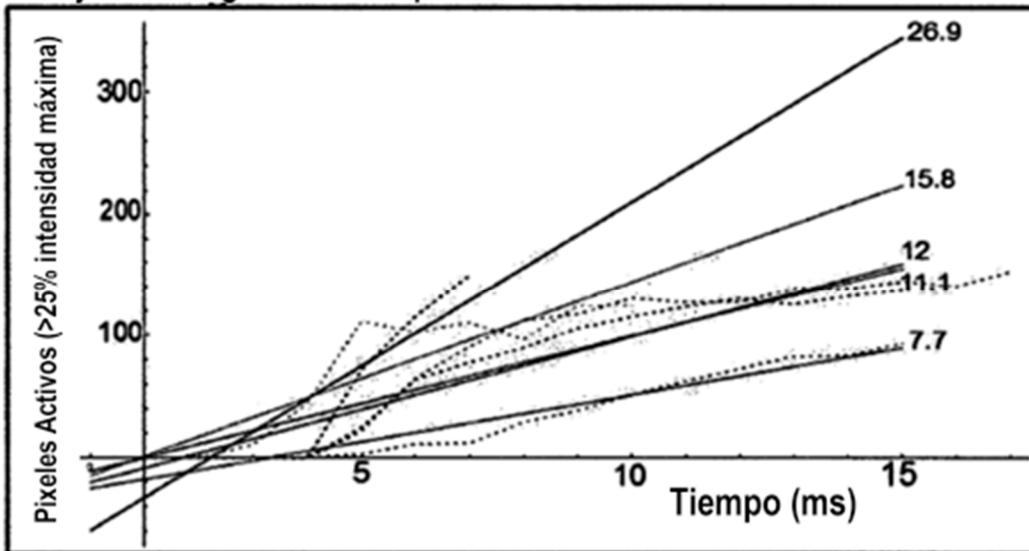


Figura 18 A

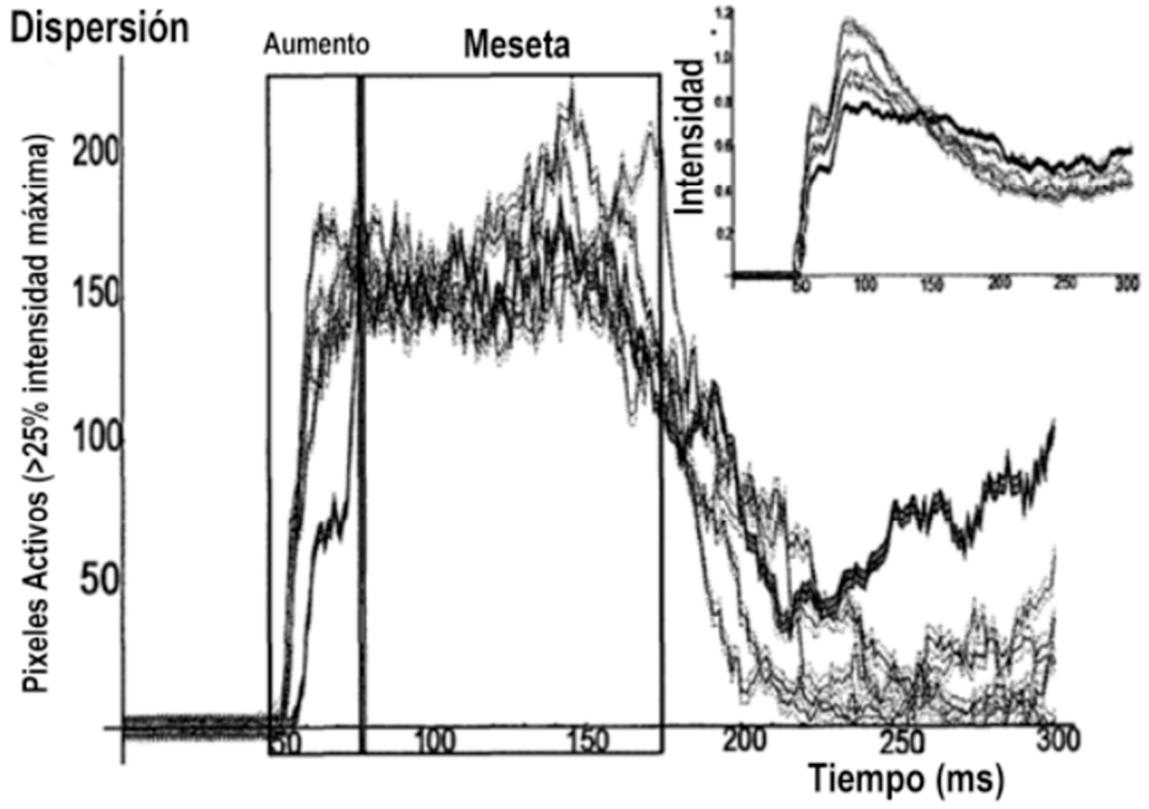


Figura 18 B

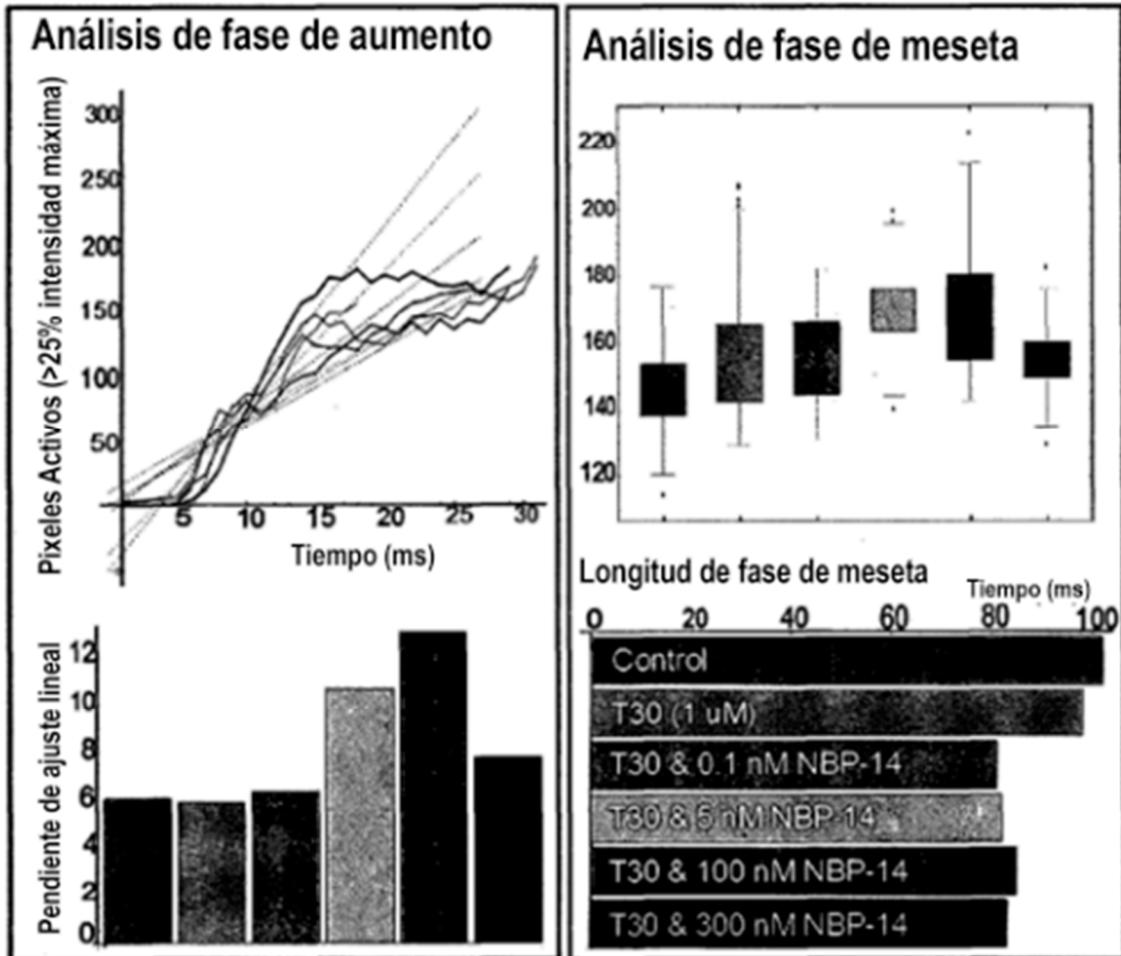


Figura 19

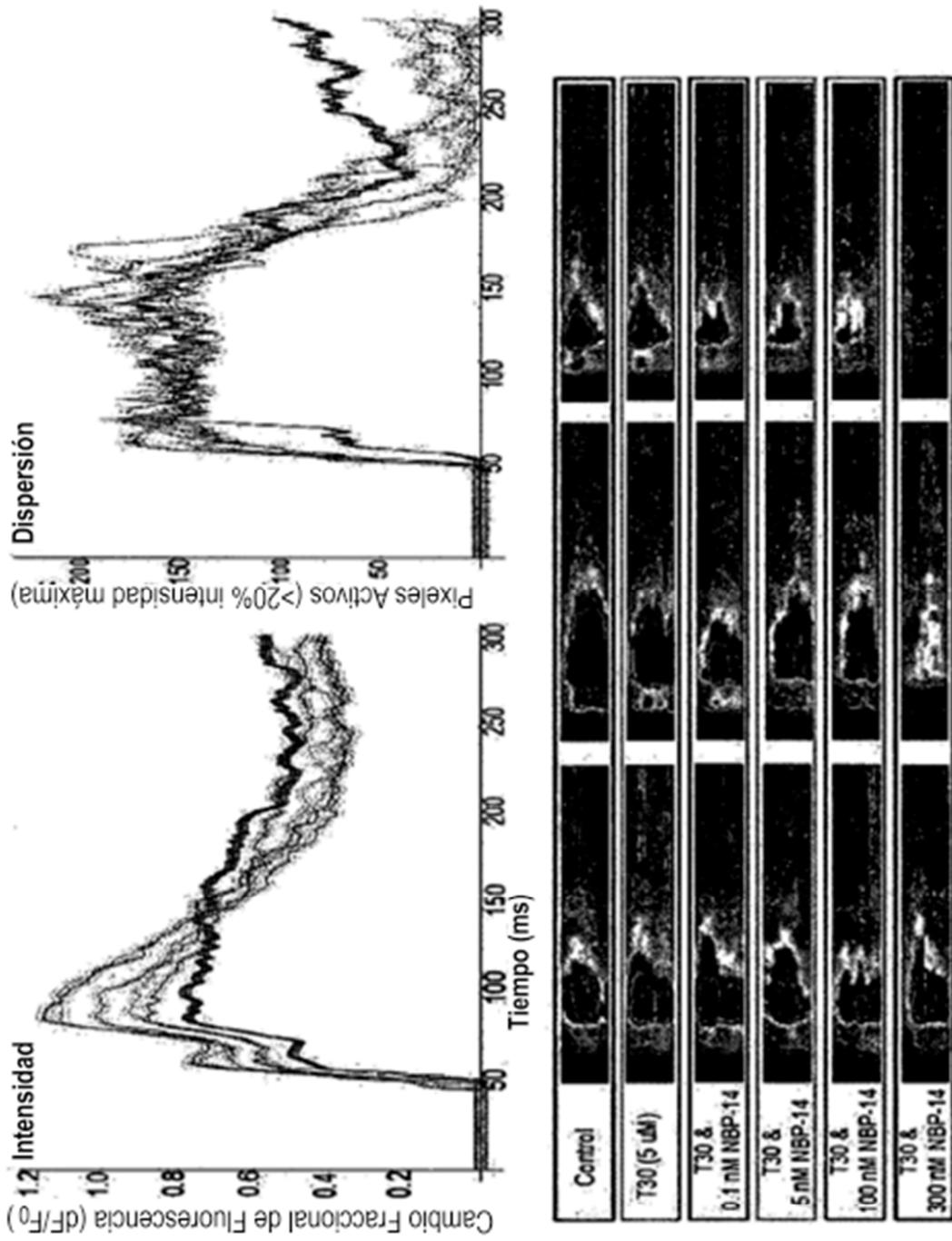


Figura 20

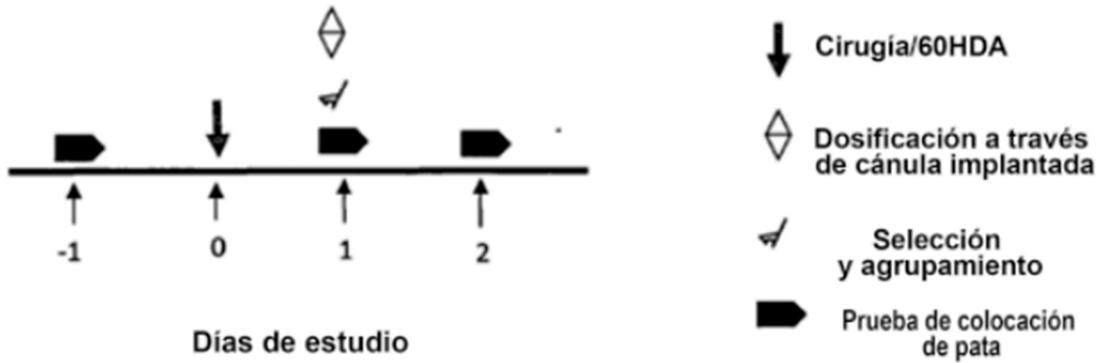


Figura 21

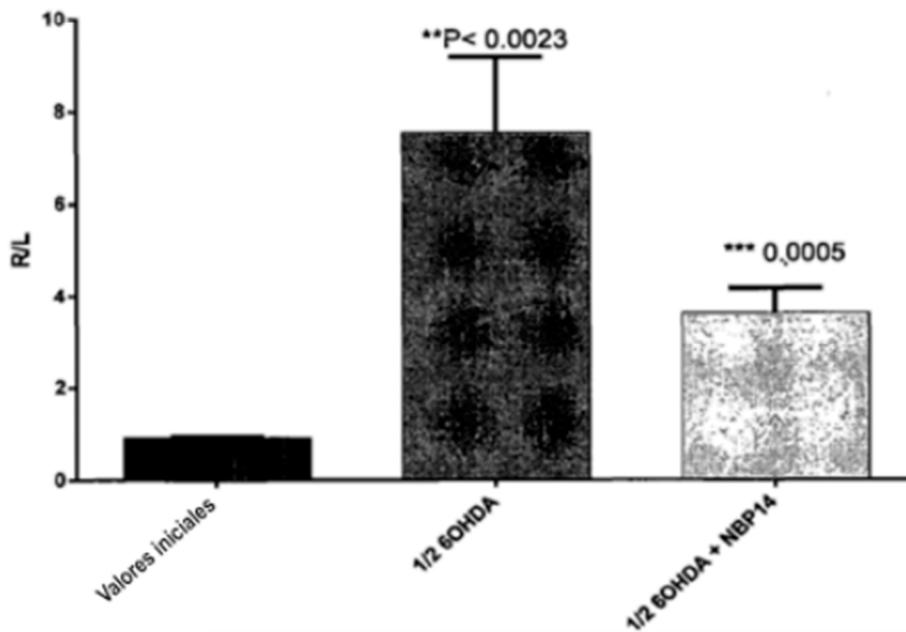


Figura 22

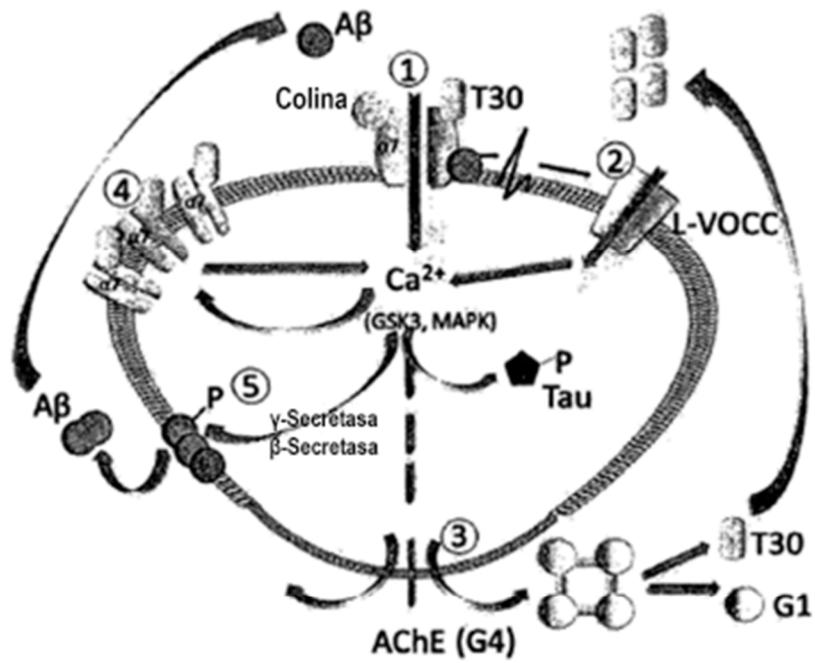


Figura 23

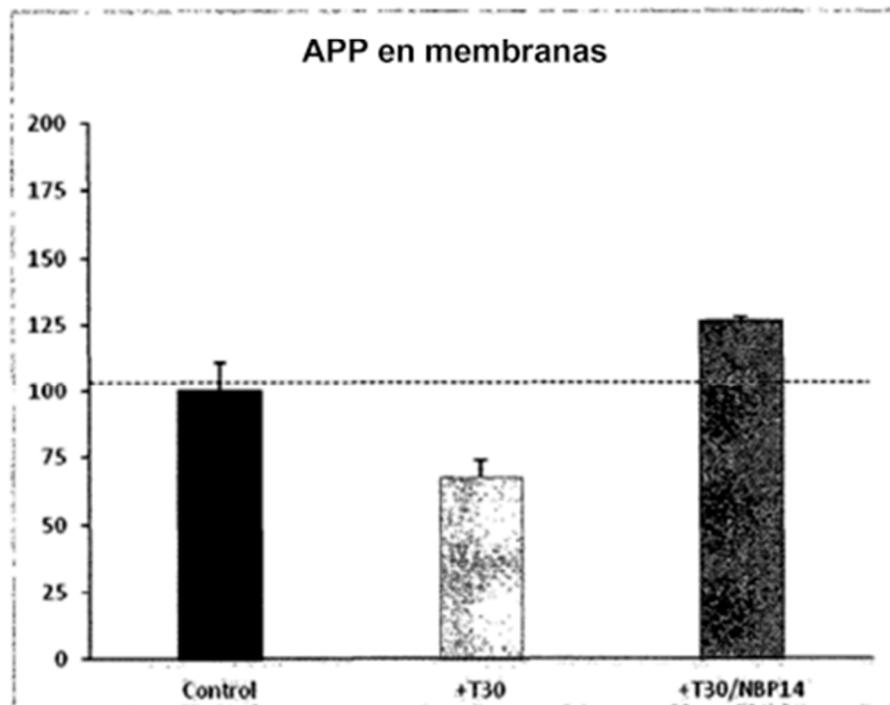


Figura 24

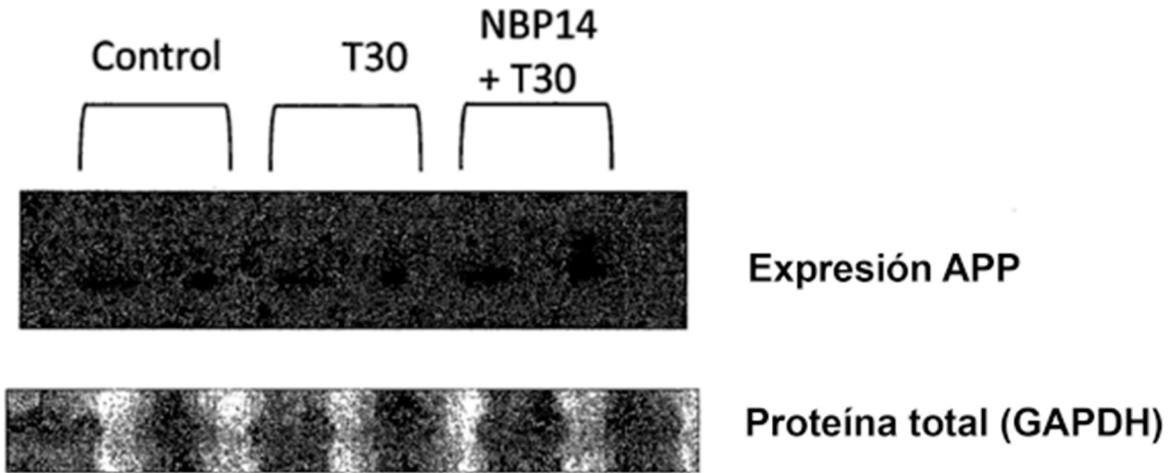


Figura 25

