

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 932**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08	(2006.01) A61P 9/10	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01) A61P 25/00	(2006.01)
C07K 14/00	(2006.01) A61P 25/28	(2006.01)
C07K 14/46	(2006.01) A61P 25/16	(2006.01)
C12N 15/12	(2006.01) A61K 38/17	(2006.01)
C12N 15/49	(2006.01) A61K 9/00	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)	
C12N 15/64	(2006.01)	
A61K 38/00	(2006.01)	
A61K 38/16	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2014 PCT/AU2014/050326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15061856**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2014 E 14858082 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3063168**

54 Título: **Péptidos neuroprotectores**

30 Prioridad:

30.10.2013 AU 2013904197
17.06.2014 AU 2014902319

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.09.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA (100.0%)
35 Stirling Highway
Crawley, Western Australia 6009, AU

72 Inventor/es:

MELONI, BRUNO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 724 932 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

Péptidos neuroprotectores

Campo de la invención

Esta invención se refiere a péptidos que tienen actividad neuroprotectora, siendo los péptidos útiles para tratar apoplejía u otras lesiones o trastornos neurales. La invención se refiere además a un método para tratar una lesión o trastorno neural usando los péptidos de la invención.

Antecedentes de la invención

Los péptidos penetrantes de células (CPP) son péptidos pequeños que se usan para facilitar la administración de cargas normalmente no permeables tales como otros péptidos, proteínas, ácidos nucleicos o fármacos en las células.

El desarrollo de péptidos penetrantes de células (CPP), también referidos como dominios de transducción peptídicos (PTD), como facilitadores de la administración de fármacos terapéuticos ha progresado significativamente desde el descubrimiento inicial de un PTD en el activador transcripcional que actúa en trans tipo 1 del virus de la inmunodeficiencia humana (Frankel y Pabo, 1988; Green y Loewenstein, 1988), referido comúnmente como TAT. Desde entonces, la parte transportadora activa de esta secuencia se ha aislado (TAT₄₈₋₅₈: referido como el péptido TAT), así como el descubrimiento y síntesis de más de 100 nuevos CPP (Milletti, 2012).

Se han evaluado agentes terapéuticos potenciales fusionados con CPP en sistemas de cultivo neuronal y modelos animales que mimetizan los mecanismos de lesión neural en una variedad de trastornos, incluyendo isquemia cerebral, epilepsia, enfermedad de Parkinson y enfermedades de Alzheimer (Lai et al. 2005; Liu et al. 2006; Arthur et al. 2007; Colombo et al. 2007; Nagel et al. 2008; Meade et al. 2009). El uso de CPP para trastornos neurológicos es especialmente atractivo debido a su capacidad de transportar carga a través de la barrera hematoencefálica y entrar entonces en las células neurales en el parénquima cerebral (Aarts et al. 2002; Zhang et al. 2013). Dos ejemplos de péptidos neuroprotectores fusionados a CPP que han entrado en ensayos clínicos son el péptido inhibidor de JNK (JNK1-1D-TAT o XG-102; ARAMIS, 2012) y el péptido inhibidor del receptor de NMDA/densidad postsináptica 95 (TAT-NR2B9c o NA-1; Dolgin, 2012). Ambos péptidos están fusionados a TAT.

Una característica importante de cualquier CPP es la toxicidad limitada a dosis clínicamente relevantes, y existe una gran necesidad de CPP de toxicidad limitada. De forma similar, existe una gran necesidad, cuando se tratan lesiones neurales, de péptidos que sean neuroprotectores. Las estructuras y contenido de aminoácidos de los CPP varían ampliamente y se ha mostrado recientemente que el péptido TAT, el CPP usado más ampliamente en experimentos de neuroprotección, parece poseer también propiedades neuroprotectoras intrínsecas. Estudios recientes (Xu et al. 2008; Vaslin et al. 2009; Meade et al. 2010a,b; Craig et al. 2011) han reportado que el péptido TAT presenta acciones neuroprotectoras *in vitro* después de la excitotoxicidad y privación de oxígeno-glucosa, e *in vivo* después de isquemia cerebral en ratas P12 después de inyección intraventricular. Aunque no se entienden completamente los mecanismos exactos de la acción neuroprotectora de TAT, se especula que interfiere con la activación del receptor de NMDA (Xu et al. 2008; Vaslin et al. 2009), aunque un estudio no fue capaz de detectar una interacción de unión (Li et al. 2008). Adicionalmente, en un estudio de ARNi usando CPP para administrar construcciones, se mostró que tanto los péptidos TAT como penetratina solos regulaban a la baja el ARNm de la quinasa MAP en el pulmón después de la administración intratraqueal (Moschos et al. 2007).

Las lesiones o trastornos neuronales o neurales tales como migraña, apoplejía, lesión cerebral traumática, lesión en la médula espinal, epilepsia y trastornos neurodegenerativos incluyendo Enfermedad de Huntington (HD), Enfermedad de Parkinson (PD), Enfermedad de Alzheimer (AD) y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) son las causas más importantes de morbilidad y discapacidad que surgen a partir de lesión cerebral o en la médula espinal a largo plazo. Las lesiones cerebrales implican generalmente un rango de procesos de muerte celular incluyendo apoptosis, autofagia, necroptosis y necrosis, y afectan a neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células microglia y del endotelio vascular (referidos colectivamente como la unidad neurovascular; NVU). Los desencadenantes dañinos implicados en la lesión neural implican diversas rutas que implican la excitotoxicidad del glutamato, sobrecarga de calcio, estrés oxidativo, enzimas proteolíticas y alteraciones mitocondriales.

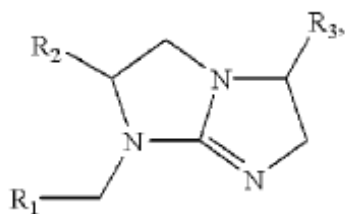
Tal y como se usa en la presente memoria, el término "apoplejía" incluye cualquier trastorno isquémico que afecta al cerebro o médula espinal, p. ej., oclusión tromboembólica en una arteria del cerebro o médula espinal, hipotensión grave, hipoxia-isquemia perinatal, un infarto de miocardio, hipoxia, hemorragia cerebral, vasoespasmo, un trastorno vascular periférico, una trombosis venosa, una embolia pulmonar, un ataque isquémico transitorio, isquemia pulmonar, angina inestable, un déficit neurológico isquémico reversible, actividad trombolítica auxiliar, afecciones con coagulación excesiva, lesión por reperusión cerebral, anemia de células estrelladas, un trastorno de apoplejía o un periodo isquémico inducido iatrogénicamente tales como angioplastia, o isquemia cerebral.

Los niveles extracelulares incrementados del neurotransmisor glutamato pueden causar la muerte de las células

neuronales a través de procesos de lesión aguda y retardada causados por excitotoxicidad. Una acumulación de glutamato extracelular sobreestimula los receptores de NMDA y AMPA lo que da como resultado un influjo de iones calcio y sodio extracelulares y la liberación del calcio unido de los almacenes intracelulares. La sobreactivación de los receptores de NMDA también puede desencadenar la producción de moléculas dañinas (p. ej., óxido nítrico, CLCA1; regulador del canal de cloro activado por calcio 1, calpaína, SREBP1: proteína de unión al elemento regulador de estero1) y rutas de señalización (p. ej., DAPK; proteína quinasa asociada con la muerte, CamKII: proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina II). Además, la despolarización y excitotoxicidad neuronal inducidas por el glutamato puede desencadenar un influjo adicional de calcio intracelular a través de canales de calcio regulados por voltaje (VGCC, p. ej., CaV2.2, CaV3.3), el intercambiador de sodio calcio (NCX), canales iónicos sensibles a ácido (ASIC), canales de cationes receptores de potencial transitorio 2 y 7 (TRPM2/7) y: receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR).

El incremento en el calcio intracelular inicia un rango de eventos dañinos para las células que implican fosfolipasas, proteasas, fosfatasas, quinasas, NADPH oxidasa y óxido nítrico sintasa, así como la activación de rutas que desencadenan la muerte celular (es decir, apoptosis, autofagia, necroptosis y necrosis).

Los ejemplos de compuestos usados para tratar los efectos neurodegenerativos de la isquemia cerebral incluyen la Pat. de EE.UU. No. 5,559,095, que describe un método para tratar lesiones neuronales relacionadas con isquemia usando péptidos omega-conotoxina y péptidos relacionados que se unen a y bloquean los canales de calcio regulados por voltaje, y la Pat. de EE.UU. No. 4,684,624, que describe el tratamiento usando determinados péptidos opioides. Los ejemplos adicionales incluyen US 2009/0281036 que describe el uso de péptidos de fusión ligados a otros péptidos para reducir los efectos dañinos de lesiones en las células de mamíferos mediante la inhibición de la interacción del receptor de NMDA y las proteínas que interaccionan con NMDAR. De forma similar, US2012/0027781 describe el uso de péptidos de direccionamiento ligados y otros péptidos para proporcionar un funcionamiento neuroprotector. US 6,251,854 describe compuestos que proporcionan protección frente a lesión neuronal excitotóxica que se seleccionan de oligopéptidos cortos ricos en arginina combinados con compuestos de fórmula 1:



Muchos agentes neuroprotectores potenciales también presentan toxicidad a dosis bajas a moderadas. Muchos CPP también presentan toxicidad a dosis bajas a moderadas. Existe así una necesidad de péptidos neuroprotectores que sean efectivos a dosis bajas, que presenten una toxicidad celular baja, y que proporcionen protección frente a más de un tipo de lesión neural.

Mitchell (Mitchell DJ, et al., Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. J Pept Res. 2000 56(5):318-25) examinó la eficacia de péptidos de poliarginina penetrantes de células (es decir, R3-R9, R15, R20, R25, R30 y R75) para entrar en células cultivadas (p. ej., línea de células-T humanas Jurkat). El estudio mostró que los péptidos de poliarginina $\geq$ R6 entraban en las células, y con R15 mostrando los mejores niveles de captación, mientras R25 y R30 presentaron bajos niveles de captación. Los péptidos de poliarginina de la isoforma D también fueron capaces de entrar en las células. R75 fue altamente tóxico de 0.8 μ M a 50 μ M. Aunque no presentan otros datos de toxicidad, los autores afirman que "la citotoxicidad celular se incrementa con la longitud de los péptidos. No hay datos que indiquen o demuestren que los péptidos de poliarginina también posean propiedades neuroprotectoras.

WO2013158739-A1 describe un péptido rico en arginina con hasta 9 residuos de arginina para usarse en el tratamiento de lesión neuronal.

Tünnemann (Tünnemann G, et al., Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. J Pept Sci. 2008 14(4):469-76) examinó la eficacia de péptidos de poliarginina penetrantes de células (es decir, R5 - R12) para entrar en diferentes tipos de células vivas cultivadas (p. ej., mieloblastos de ratón C2C12, células HeLa, MDCK y fibroblastos). El estudio mostró que la capacidad de transducción de los péptidos de poliarginina para entrar en las células se incrementó con el número de residuos de arginina consecutivos, con R9 a R12 teniendo el mejor comportamiento. Los estudios de toxicidad revelaron "toxicidad grave solo con R8, R10, R11, R12 a la mayor concentración de péptido ensayada (100 μ M)". Otros estudios de toxicidad usando R9D (isoforma-D) demostraron que la toxicidad de los péptidos se incrementa con concentración creciente de los péptidos. No hay datos que indiquen o demuestren que los péptidos de poliarginina también posean propiedades neuroprotectoras.

US2005/192210 se refiere a composiciones y métodos para el tratamiento de afecciones vasculares. La invención

proporciona polímeros de arginina y homopolímeros de arginina para el tratamiento y/o prevención de glaucoma, hipertensión pulmonar, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, disfunción eréctil, síndrome de Raynaud, sobredosis de heparina, vulvodinia, y cicatrización de heridas. La invención también proporciona polímeros de arginina y homopolímeros de arginina para uso en disoluciones de perfusión y conservación de órganos.

- 5 Esta discusión de la técnica anterior solo se pretende para facilitar una comprensión de la presente invención. No se pretende la aceptación o admisión de que cualquier material referido es, o fue, parte del conocimiento general común en el momento de la fecha de prioridad de la solicitud.

Resumen de la invención

- 10 La presente invención proporciona un péptido aislado de 12 a 32 residuos de aminoácidos de longitud para uso en el tratamiento o prevención de lesión neural, en donde el péptido aislado es un péptido de poliarginina. El péptido aislado puede ser un CPP.

El péptido puede tener una carga neta de 8 o mayor a pH 7, preferiblemente 10 o mayor a pH 7, lo más preferiblemente 11 o mayor a pH 7.

- 15 El péptido puede ser un péptido no natural. Como tal, el péptido de la invención puede ser un péptido preparado por el hombre.

El péptido aislado puede comprender 12 a al menos 22 residuos.

El péptido aislado puede ser un péptido de poliarginina de 12 a 18 residuos de arginina. En una realización preferida, el péptido aislado es R12, R15, o R18, lo más preferiblemente R15.

- 20 Específicamente, el péptido aislado puede comprender uno cualquiera o más de los péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS. 9, 10, 11, 12, 13.

El péptido aislado puede afectar los procesos endocitóticos de la célula; afectar la función de los receptores de la superficie celular para dar lugar a un influjo de calcio celular reducido; interaccionar con y/o estabilizar la membrana mitocondrial externa para preservar la función mitocondrial; o inhibir, regular a la baja, o afectar la enzima proproteína convertasa dependiente de calcio furina.

- 25 El péptido aislado puede ser un péptido sintético o un péptido preparado por el hombre. El péptido aislado puede estar incluido en, o fusionado con, otros polipéptidos. Los péptidos aislados pueden estar fusionados entre sí con al menos una secuencia conectora.

El péptido aislado puede presentar actividad neuroprotectora a niveles de CI50 de menos de 50 μ M, preferiblemente menos de 20 μ M, lo más preferiblemente menos de 10 μ M.

- 30 La invención se extiende a un péptido aislado que comprende una cualquiera o más de SEQ. ID. NOS 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, para uso en el tratamiento o prevención de lesión neural.

La composición farmacéutica o medicamento puede usarse para el tratamiento o prevención de una lesión neural, incluyendo la composición farmacéutica o medicamento el péptido aislado de la invención o la secuencia de polinucleótido de la invención.

- 35 La composición farmacéutica o medicamento puede usarse en el tratamiento o prevención de isquemia, hipoxia-isquemia perinatal, enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Huntington, Esclerosis Múltiple, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, apoplejía, neuropatía periférica, lesión en la médula espinal, o epilepsia.

La composición farmacéutica o medicamento puede comprender un transportador, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 40 Según otro aspecto de la invención, se proporciona una cantidad farmacéuticamente aceptable y/o farmacéuticamente efectiva del péptido de la invención o la composición farmacéutica o medicamento de la invención para uso en el tratamiento o prevención de lesión neural.

- 45 Según otro aspecto más de la invención, se proporciona una cantidad farmacéuticamente aceptable y/o farmacéuticamente efectiva del péptido de la invención o la composición farmacéutica o medicamento de la invención para inhibir la muerte de células neuronales en un sujeto.

La administración puede ser de 0.001 mg/kg a 50 mg/kg.

La invención se extiende a un kit que comprende la composición farmacéutica o medicamento de la invención en uno o más contenedores y un manual de instrucciones o folleto informativo sobre instrucciones y/o información con respecto a la aplicación de la composición farmacéutica.

Más específicamente, el péptido puede ser uno cualquiera o más de los péptidos que tienen las secuencias mostradas como SEQ. ID. NOS. SEQ. ID. NOS. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, teniendo dichos péptidos actividad neuroprotectora.

- 5 En una realización, el péptido se selecciona del grupo que comprende R12, R13, R14, R15, R16, R17, y R18. En una realización preferida, el péptido es R12. En otra realización preferida más, el péptido es R15. En otra realización preferida, el péptido es R18.

La mezcla de péptidos puede mezclarse con cloruro de sodio, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y agua.

La mezcla de péptidos puede estar en una formulación de administración que es inyectable o administrable intravenosamente.

- 10 Los péptidos pueden estar presentes en la formulación de administración en una concentración en un rango de 0.1 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente 1 mg/ml a 20 mg/ml, lo más preferiblemente 10 mg/ml.

En uso, la formulación de administración, cuando está en la forma de una formulación inyectable o intravenosa, puede administrarse por inyección intravenosa lenta durante un periodo de entre 1 y 30 minutos, preferiblemente entre 5 y 20 minutos, lo más preferiblemente durante un periodo de 10 minutos.

- 15 El péptido puede tener actividad penetrante de células. Como tal, el péptido puede ser un CPP.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el péptido de la invención, o una composición farmacéutica o medicamento que comprende el péptido para uso en el tratamiento de una lesión neural. La invención se extiende a mezclas de péptidos de la invención para uso en el tratamiento de lesión neural.

- 20 Según un aspecto adicional más de la invención, se proporciona el péptido o la composición farmacéutica de la invención para uso en afectar la función de los receptores de la superficie celular asociados con el influjo de calcio, más específicamente para interaccionar con los receptores de NMDA, AMPA, VGCC, NCX, TRMP2/7, ASIC y mGlu, más específicamente todavía para dar lugar a un influjo de calcio celular reducido. En otra realización de la invención, se proporciona el péptido o la composición farmacéutica de la invención para uso en la interacción con y/o estabilización de la membrana mitocondrial externa y, de esta manera, ayudar a preservar la función mitocondrial.

- 25 Según un aspecto adicional más de la invención, se proporciona el péptido o la composición farmacéutica de la invención para uso en la inhibición, regulación a la baja, o afectación de la enzima proproteína convertasa dependiente de calcio furina.

- 30 Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de una lesión neural, incluyendo la composición farmacéutica o medicamento el péptido aislado de la invención, o uno cualquiera o más de los péptidos aislados de la invención.

La composición farmacéutica o medicamento puede comprender un transportador, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 35 Según un aspecto adicional más de la invención, se proporciona el péptido de la presente invención para uso en la inhibición de la muerte de las células neuronales en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento, un péptido neuroprotector en una cantidad efectiva para inhibir la muerte de las células neuronales en el sujeto.

Se puede administrar al paciente una cantidad fisiológicamente aceptable de una mezcla de dos cualquiera o más péptidos de la invención.

- 40 El péptido de la invención puede proporcionar actividad neuroprotectora frente a antagonistas de los receptores de neurotransmisores. Los receptores de neurotransmisores pueden ser receptores que están unidos por, interaccionan con, o se ven afectados por NMDA, glutamato, ácido kaínico, o procesos isquémicos. El péptido de la invención puede estar incluido en otros polipéptidos o puede estar fusionado con otros polipéptidos. El péptido de la invención puede estar ligado o fusionado al extremo N o C de dichos otros polipéptidos. El péptido de la invención puede estar ligado o fusionado con dichos otros polipéptidos, de manera que se presenten los péptidos de la invención en una conformación adecuada para tratar una lesión neural.

- 45 Alternativamente, o adicionalmente, uno o más de los péptidos de la invención pueden estar fusionados entre sí con una secuencia conectora. La secuencia conectora puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos, incluyendo, pero no limitada a, secuencias conectoras ricas en aminoácidos básicos/catiónicos. Alternativamente, o adicionalmente, las secuencias conectoras pueden ser conectores escindibles. En una realización, el conector puede ser uno o más conectores de tipo MMP, conectores de calpaína, caspasa o tPA. Los conectores de tipo MMP se definen como la secuencia peptídica reconocida y escindida por metaloproteinasas de la matriz (MMP). De forma similar, un conector de calpaína, caspasa o tPA es una secuencia peptídica reconocida y escindida por estas enzimas proteasas (es decir, calpaína, caspasa o tPA, respectivamente). Los péptidos de la invención también
- 50

pueden estar fusionados con otros péptidos que tienen que transportarse al sitio de una lesión neural o que tienen que transportarse intracelularmente en o en el interior de las células neurales.

Los péptidos de la invención también pueden estar unidos a péptidos auxiliares que pueden unirse a o interaccionar con enzimas perjudiciales para la función neural, de manera que los péptidos auxiliares pueden funcionar como inhibidores competitivos de las enzimas después de su transporte a través de la membrana celular. Los péptidos auxiliares pueden seleccionarse de tPA, calpaína, y MMP, y pueden unirse al péptido de la invención usando un conector escindible tal como una secuencia de caspasa, de manera que el tPA, calpaína o MMP puedan liberarse del péptido de la invención y pueden funcionar entonces como un inhibidor competitivo intracelularmente para las enzimas perjudiciales para la función neural.

Como tal, la descripción se extiende a un péptido de la invención unido a un sitio de escisión de caspasa, en sí mismo, a su vez, unido a calpaína, tPA o MMP.

Los péptidos de la invención pueden presentar actividad neuroprotectora a niveles de CI50 de menos de 10 μ M, preferiblemente menos de 5 μ M, preferiblemente menos de 1 μ M, en algunos casos, tan bajos como, o menores de, 0.2 μ M, incluso tan bajos como 0.1 μ M.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una secuencia de polinucleótido aislada para uso en el tratamiento o prevención de lesión neural, que codifica un péptido de la invención, secuencias complementarias a la secuencia de polinucleótido aislada, y secuencias que tienen una homología de al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95%, 99%, o 100% con las secuencias de polinucleótidos aisladas. La secuencia de polinucleótido puede ser una o más secuencias aisladas y pueden ser secuencias que hibridan en condiciones astringentes con las secuencias de polinucleótidos de la invención. Las secuencias de polinucleótidos pueden ser secuencias de polinucleótidos no naturales o ADN. Como tales, pueden incluir construcciones artificiales, preparadas por el hombre, tales como ADNc. También se incluyen en la invención vectores, tales como vectores de expresión, que incluyen los ácidos nucleicos aislados anteriores, así como células transformadas con dichos vectores o secuencias de ADN. La secuencia de polinucleótido puede codificar protamina. Las secuencias de polinucleótidos pueden ser la secuencia de SEQ. ID. NO. 38.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan los péptidos aislados seleccionados del grupo que consiste en SEQ. ID. NOS. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 para uso en el tratamiento o prevención de lesión neural.

También se proporciona el uso de ácidos nucleicos aislados, vectores, o células en la preparación de una formulación farmacéutica o medicamento.

La presente invención proporciona además kits que comprenden la composición farmacéutica mencionada anteriormente (en uno o más contenedores) en al menos una de las formulaciones anteriores y un manual de instrucciones o folleto informativo sobre instrucciones y/o información con respecto a la aplicación de la composición farmacéutica.

En una realización, una composición farmacéutica que comprende el péptido de la invención como se ha definido anteriormente es para uso en el tratamiento de isquemia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, apoplejía, neuropatía periférica, lesión en la médula espinal o epilepsia.

En otra realización, la presente invención proporciona los péptidos de la invención, o combinaciones de los mismos, para uso en la estimulación de la supervivencia de neuronas, preferiblemente, *in vitro*. La invención, en otro aspecto de la misma, proporciona los péptidos de la invención, para uso en la protección de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica frente a OGD o isquemia.

Estos descubrimientos demuestran que los péptidos de la invención tienen la capacidad de, y pueden usarse en métodos para, inhibir o mejorar eventos/rutas neurodañinos asociados con lesiones excitotóxicas e isquémicas. Existen varios procedimientos quirúrgicos cerebrovasculares (p. ej., endarterectomía carótida) y cardiovasculares (p. ej., injerto de bypass de arterias coronarias) donde existe un riesgo de que los pacientes puedan padecer una isquemia cerebral o una apoplejía que da lugar a lesión cerebral.

Por lo tanto, el al menos un péptido, medicamento, o composición farmacéutica de la invención puede administrarse en una ventana de 0.25 horas a 4 horas, preferiblemente 0.5 a 3 horas, lo más preferiblemente 1 a 2 horas antes de dicho procedimiento para proteger el cerebro frente a cualquiera de dichos eventos isquémicos cerebrales.

La invención se extiende así a al menos un péptido de la invención para uso en el tratamiento o prevención de lesión neural, incluyendo agresiones o lesión cerebrovascular, agresiones o lesión cardiovascular, o procedimientos quirúrgicos donde los pacientes pueden estar en riesgo de padecer isquemia cerebral o una apoplejía

Descripción breve de los dibujos

Las características adicionales de la presente invención se describen más completamente en la siguiente

descripción de varias realizaciones no limitativas incluidas solamente para los propósitos de ejemplificar la presente invención. La siguiente descripción no es una restricción del resumen, divulgación o descripción amplios de la invención como se ha mostrado anteriormente y se hace con referencia a los dibujos adjuntos en los que el término "Protamina" o "Ptm" se refiere a sulfato de protamina disponible comercialmente (fabricado comercialmente por varios fabricantes, incluyendo Sanofi Aventis, típicamente como se especifica en Hoffman, 1990), mientras "Ptm1" a "Ptm" 5 se refieren a SEQ. ID. NOs 32, 33, 34, 35, y 36, respectivamente, y en las que:

La Fig. comparativa 1a muestra los resultados del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de péptido en μM . A: viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico y tratamiento con CPP, péptidos control positivo (JNKI-1D-TAT/PYC36L-TAT) y bloqueantes del receptor de glutamato (Btkrs; 5 μM : MK801/5 μM : CNQX). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4-6; *P <0.05).

La Fig. comparativa 1b muestra los resultados adicionales del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de péptido en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico y tratamiento con los péptidos TAT-L y TAT-D. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4-6; *P <0.05).

La Fig. comparativa 1c muestra los resultados adicionales del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico. Específicamente, la eficacia de los péptidos cuando se retiran por lavado antes de la agresión con ácido glutámico; concentración del péptido en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico cuando los CPP se retiran por lavado antes de la agresión. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4-6; *P <0.05).

La Fig. 1d muestra los resultados adicionales del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico. Eficacia de los péptidos cuando se añaden después de la agresión con ácido glutámico. Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico cuando se añadieron los péptidos Arg-9 y Arg-12 y los péptidos control JNKI-1D-TAT y NR29c 0 o 15 minutos después de la agresión; en este experimento la exposición a ácido glutámico dio lugar a menos muerte celular en los controles que en otros experimentos (60 % frente a 95 %). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4-6; *P <0.05).

La Fig. 1e muestra los resultados adicionales del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de péptido en μM . A: Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico y tratamiento con R9, R12, R15, R18 y R9/tPA/R9. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4; *P <0.05).

La Fig. comparativa 1f muestra los resultados adicionales del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de péptido en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico y tratamiento con R9, E9/R9, DAHK y PTD4. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4; *P <0.05).

La Fig. comparativa 1g muestra los resultados adicionales del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de péptido en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico y tratamiento con R9 y NR29c y el péptido control PCY36 (PYC36L-TAT). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4; *P <0.05).

La Fig. 1h muestra los resultados adicionales del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; agresión más leve; concentración de péptido en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico y tratamiento con R9, R12 y NR29c y el péptido control JNK (JNKI-1-TAT). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4; *P <0.05).

La Fig. 1i muestra los resultados adicionales del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico: agresión más leve; concentración de péptido en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico y tratamiento con R1, R3, R6, R9, R12 y el péptido control NR29c. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4; *P <0.05).

La Fig. 1j muestra los resultados adicionales del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de péptido = 5 μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido glutámico y tratamiento con R1, R3, R9 antiguo (Mimotopos), R9 nuevo (péptidos de China), R12. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; n = 4; *P <0.05).

La Fig. comparativa 2 muestra los resultados de un modelo de excitotoxicidad de ácido kaínico; concentración de

péptido en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de exposición a ácido kaínico y tratamiento con los CPP, péptidos de control positivo (JNKI-1D-TAT/PYC36L-TAT) y bloqueantes del receptor de glutamato (Blkrs; 5 μM : MK801/5 μM : CNQX). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; $n = 4$; $*P < 0.05$).

- 5 La Fig. comparativa 3a muestra los resultados de un modelo de isquemia *in vitro*. Péptidos presentes durante la isquemia *in vitro* y a una dosis del 50 % después de la isquemia: concentración de péptido en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de la isquemia *in vitro* y tratamiento con los CPP, péptido de control positivo (PYC36L-TAT) y bloqueantes del receptor de glutamato (Blkrs; 5 μM : MK801/5 μM : CNQX). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; $n = 4$; $*P < 0.05$).

La Fig. 3b muestra los resultados adicionales de un modelo de isquemia *in vitro*. Péptidos presentes después de la isquemia *in vitro*: concentración de péptido en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de la isquemia *in vitro* y tratamiento con R9, R12, R15 y R18. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SEM; $n = 4$; $*P < 0.05$).

- 15 La Fig. comparativa 3c muestra los resultados adicionales de un modelo de isquemia *in vitro*. Péptido R9 presente durante la isquemia *in vitro* y a una dosis del 50 % después de la isquemia: La dosis del péptido para las células bEND3 fue 10 μM durante/5 μM después de la isquemia *in vitro*. La dosis del péptido para las células SH-5YSY fue 5 μM durante/2.5 μM después de la isquemia *in vitro*. Viabilidad celular 24 horas después de la isquemia *in vitro* (datos de MTS media $\pm$ SEM; $n = 4$; $*P < 0.05$).

- 20 La Figura 4 muestra la viabilidad neuronal después de la exposición de cultivos a diferentes concentraciones de péptidos. Concentración de los péptidos mostrada en μM . Viabilidad neuronal 24 horas después de la exposición con los péptidos R3, R6, R9, R12, R15, R18, JNK (JNKI-1D-TAT) y NR29c. Datos de la viabilidad celular expresados como absorbancia de MTS a 490 nm (media $\pm$ SEM; $n = 4$).

- 25 La Fig. comparativa 5 muestra los resultados del ensayo piloto del modelo animal inicial, que muestra la eficacia del péptido R9D en el modelo de apoplejía por oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas. El péptido R9D se administró intravenosamente 30 min después de MCAO. El volumen de infarto (lesión cerebral) se midió 24h después de MCAO (media $\pm$ SD).

La Fig. 6 muestra un estudio de respuesta a la dosis usando R9, R10, R11, R12, R13 y R14 en el modelo del glutamato. Media $\pm$ SEM: $N = 4$; $*P < 0.05$. (Concentración del péptido en μM).

- 30 La Fig. 7 muestra un estudio de respuesta a la dosis usando R9D, R13, R14 y R15 en el modelo del glutamato. Media $\pm$ SEM: $N = 4$; $*P < 0.05$. (Concentración del péptido en μM).

La Fig. comparativa 8 muestra un estudio de respuesta a la dosis usando R6, R7, R8, y R9 en el modelo del glutamato. Media $\pm$ SEM: $N = 4$; $*P < 0.05$. (Concentración del péptido en μM).

- 35 La Fig. comparativa 9 muestra los resultados del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de protamina en μM . El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina fue durante 15 minutos antes de la exposición a ácido glutámico (100 μM), que fue durante 5 minutos a 37 °C. Viabilidad neuronal 24 horas después de la exposición a ácido glutámico y tratamiento con diferentes concentraciones de protamina o sin tratamiento (control Glut). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; $n = 4-6$; $*P < 0.05$).

- 40 La Fig. comparativa 10 muestra los resultados del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de protamina en μM . El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina fue durante 15 minutos antes de y durante la exposición a ácido glutámico (100 μM), que fue durante 5 minutos a 37 °C. Viabilidad neuronal 24 horas después de la exposición a ácido glutámico y tratamiento con diferentes concentraciones de protamina o sin tratamiento (control Glut). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; $n = 4-6$; $*P < 0.05$).

- 45 La Fig. comparativa 11 muestra los resultados del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de protamina en μM . El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina fue durante 5 o 10 minutos antes de la exposición a ácido glutámico (100 μM), (5 minutos a 37 °C) solo. Viabilidad neuronal 24 horas después de la exposición a ácido glutámico y tratamiento con diferentes concentraciones de protamina o sin tratamiento (Glut). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; $n = 4-6$; $*P < 0.05$).

La Fig. comparativa 12 muestra los resultados del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de protamina y protamina de bajo peso molecular (LMWP) en μM . El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina o LMWP fue durante 15 minutos antes de y durante la exposición a ácido glutámico (100 μM), que fue

durante 5 minutos a 37 °C. Viabilidad neuronal 24 horas después de la exposición a ácido glutámico y tratamiento con diferentes concentraciones de protamina o LMWP o sin tratamiento (control Glut). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

5 La Fig. comparativa 13 muestra los resultados del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de protamina y protamina de bajo peso molecular (LMWP) en μ M. El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina o LMWP fue durante 15 minutos antes de y durante la exposición a ácido glutámico (100 μ M), que fue durante 5 minutos a 37 °C. Viabilidad neuronal 24 horas después de la exposición a ácido glutámico y tratamiento con diferentes concentraciones de protamina o LMWP o sin tratamiento (control Glut). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

10 La Fig. comparativa 14 muestra los resultados del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de protamina y LMWP en μ M. El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina fue durante 10 minutos inmediatamente antes, o 1 o 2 horas antes de la exposición a ácido glutámico (100 μ M; 5 minutos a 37 °C) solo. Viabilidad neuronal 24 horas después de la exposición a ácido glutámico y tratamiento con diferentes concentraciones de protamina o LMWP o sin tratamiento (control Glut). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

15 La Fig. comparativa 15 muestra los resultados del modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico; concentración de protamina y péptidos de protamina 1 a 5 ("Ptm 1 a 5") en μ M. El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina y péptidos de protamina fue durante 15 minutos antes de la exposición a ácido glutámico (100 μ M), que fue durante 5 minutos a 37 °C. Viabilidad neuronal 24 horas después de la exposición a ácido glutámico y tratamiento con diferentes concentraciones de protamina y péptidos de protamina o sin tratamiento (control Glut). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

20 La Fig. comparativa 16 muestra los resultados del modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD); concentración de protamina en μ M. El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina fue inmediatamente después de 50 minutos de OGD y hasta el final del experimento (24h). Viabilidad neuronal 24 horas después de OGD y tratamiento con diferentes concentraciones de protamina o sin tratamiento (OGD). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin OGD tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

25 La Fig. comparativa 17 muestra los resultados del modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD); concentración de protamina en μ M. El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina fue inmediatamente después de 50 minutos de OGD y hasta el final del experimento (24h). Viabilidad neuronal 24 horas después de OGD y tratamiento con diferentes concentraciones de protamina o sin tratamiento (OGD). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin OGD tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

30 La Fig. comparativa 18 muestra los resultados del modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD); concentración de protamina y LMWP en μ M. El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina o LMWP fue durante 10 minutos, 1 hora antes de 50 minutos de OGD. Viabilidad neuronal 24 horas después de OGD y pretratamiento con diferentes concentraciones de protamina o sin tratamiento (OGD). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin OGD tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

35 La Fig. comparativa 19 muestra los resultados del modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD); concentración de protamina en μ M. El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina fue durante 15 o 30 minutos, después de 50 minutos de OGD. Viabilidad neuronal 24 horas después de OGD y postratamiento con diferentes concentraciones de protamina o sin tratamiento (OGD). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin OGD tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

40 La Fig. comparativa 20 muestra los resultados del modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD); concentración de protamina y LMWP en μ M. El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina o LMWP fue durante 15 minutos, después de 50 minutos de OGD. Viabilidad neuronal 24 horas después de OGD y postratamiento con diferentes concentraciones de protamina o LMWP o sin tratamiento (OGD). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin OGD tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

45 La Fig. comparativa 21 muestra los resultados del modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD); concentración de protamina y péptidos de protamina en μ M (5 μ M). El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina fue durante 15 minutos, después de 45 minutos de OGD. Viabilidad neuronal 24 horas después de OGD y postratamiento con diferentes concentraciones de protamina y péptidos de protamina o sin tratamiento (OGD). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin OGD tomado como 100 %

de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 5; *P < 0.05).

La Fig. comparativa 22 muestra los resultados del modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD); concentración de protamina, péptidos de protamina y protamina de bajo peso molecular (LMWP) en μ M (5 μ M). El tratamiento de los cultivos neuronales con protamina fue durante 15 minutos, después de 45 minutos de OGD. Viabilidad neuronal 24 horas después de OGD y postratamiento con diferentes concentraciones de protamina y péptidos de protamina o sin tratamiento (OGD). Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin OGD tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P < 0.05).

La Fig. comparativa 23 muestra los resultados del modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD) usando células endoteliales cerebrales (células bEND 3); concentración de protamina en μ M. El tratamiento de los cultivos de bEND3 con protamina fue de 15 minutos inmediatamente antes de 3 duraciones diferentes de OGD (2h15min, 2h30min y 2h45min) y hasta el final del experimento (24h). La viabilidad celular se midió 24 horas después de OGD. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin OGD tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P < 0.05).

La Fig. comparativa 24 muestra los resultados de la exposición de péptidos de protamina a células endoteliales cerebrales (células bEND3); concentración de protamina 1 μ M. Los péptidos de protamina 1-5 (Ptm1 - Ptm5), sulfato de protamina (Ptm), y protamina de bajo peso molecular (LMWP) se añadieron a los cultivos de las células bEND3 durante 15 min inmediatamente antes de OGD (duración de 2h30min). La viabilidad celular se evaluó 24 horas después de OGD usando el ensayo MTS. Los datos de MTS se expresaron como valores de absorbancia a 490nm (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P < 0.05).

La Fig. comparativa 25 muestra los resultados de la exposición de protamina a células endoteliales cerebrales (células bEND3); concentración de protamina en μ M. El tratamiento de los cultivos de bEND3 con protamina fue durante 0.5, 1 o 2 horas. Viabilidad celular 2 horas después de la exposición a protamina o sin tratamiento (Control). Los datos de MTS se expresaron como valores de absorbancia a 490nm (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P < 0.05).

La Fig. comparativa 26 muestra los resultados de la exposición de protamina a células endoteliales cerebrales (células bEND3); concentración de protamina en μ M. El tratamiento de los cultivos de bEND3 con protamina fue durante 2 horas. Viabilidad celular 2 horas después de la exposición a protamina o sin tratamiento (Control). Los datos de MTS se expresaron como valores de absorbancia a 490nm (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P < 0.05).

La Fig. 27 muestra los efectos neuroprotectores de los péptidos R12, R15, R18 y protamina (Ptm) en el modelo de apoplejía permanente por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) cuando se administran intravenosamente 30 min después de la oclusión. La dosis de los péptidos fue 1 μ moles/kg (600 μ l: IV) y la evaluación del infarto fue a las 24 h después de MCAO (media $\pm$ SE; n = 8-10; *P < 0.05). Los tratamientos de los animales se aleatorizaron y todos los procedimientos se realizaron a ciegas respecto al tratamiento.

La Fig. 28 muestra la eficacia neuroprotectora de R9, R12, R15 y R18 en el modelo de excitotoxicidad del glutamato cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales solo durante 5 min de exposición a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 h después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P < 0.05).

La Fig. 29 muestra la eficacia neuroprotectora de R9, R12, R15 y R18 en el modelo del glutamato cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales durante 10 min solo antes de la exposición a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 h después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P < 0.05).

La Fig. 30 muestra la eficacia neuroprotectora de R12 y R15 en el modelo del glutamato cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales durante 10 min solo a las 1 a 5 h antes de la exposición a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 h después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P < 0.05).

La Fig. 31 muestra la eficacia neuroprotectora de R9, R12, R15 y R18 en el modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD) cuando los péptidos se añadieron a los cultivos neuronales inmediatamente después de OGD y se retiraron después de 15 min. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después de OGD. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P < 0.05).

La Fig. 32 muestra la eficacia neuroprotectora de R9, R12, R15 y R18 en el modelo de la privación de oxígeno-glucosa cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales solo durante 10 min a las 1 a 3 h antes de OGD. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después de OGD. Concentración de péptido en μ M. Los datos

de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

La Fig. comparativa 33 muestra la eficacia neuroprotectora de PTD4, E9/R9 y R9 en el modelo excitotoxicidad del glutamato cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales durante 15 min antes y durante la exposición de 5 min a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P <0.05).

La Fig. comparativa 34 muestra la eficacia neuroprotectora de XIP y PYC36-TAT en el modelo excitotoxicidad del glutamato cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales durante 15 min antes y durante la exposición de 5 min a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P <0.05).

La Fig. comparativa 35 muestra la eficacia neuroprotectora de NCXBP3 en el modelo excitotoxicidad del glutamato cuando el péptido estaba presente en los cultivos neuronales durante 15 min antes y durante la exposición de 5 min a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P <0.05).

La Fig. comparativa 36 muestra la eficacia neuroprotectora de K10, R10 y TAT-NR2B9c en el modelo excitotoxicidad del glutamato cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales durante 15 min antes y durante la exposición de 5 min a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P <0.05).

La Fig. 37 muestra la eficacia neuroprotectora de R15 y TAT-NR2B9c en el modelo excitotoxicidad del NMDA cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales durante 15 min antes y durante la exposición de 5 min a NMDA. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P <0.05).

La Fig. comparativa 38 muestra la eficacia neuroprotectora de R8 y Cal/R9 en el modelo excitotoxicidad del glutamato cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales durante 15 min antes y durante la exposición de 5 min a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P <0.05).

La Fig. 39 muestra la eficacia neuroprotectora de los péptidos R9D, R12, R15 y PYC36-TAT incubados con $\pm$ heparina (20 UI/ml) durante 5 min a temperatura ambiente antes de ser añadidos a los cultivos neuronales durante 10 solo antes de la exposición a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P <0.05).

La Fig. 40 muestra la eficacia neuroprotectora de R9D, R12, y R15 y los bloqueantes del receptor de glutamato (Blks: 5 μ M MK801/5 μ M CNQX) cuando los cultivos neuronales se incuban $\pm$ heparina (40 UI/ml) durante 5 min a 37 °C antes de la adición de péptidos durante 10 min solo a 37 °C, y después se retiran antes de la exposición a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P <0.05).

La Fig. comparativa 41 muestra la eficacia neuroprotectora de kFGF, kFGF-JNKI-1, TAT-JNKI-1 y JNKI-1TATD en el modelo de excitotoxicidad del glutamato cuando los péptidos estaban presentes en los cultivos neuronales durante 15 min antes y durante la exposición de 5 min a ácido glutámico. La viabilidad neuronal se midió 20 - 24 horas después del ácido glutámico. Concentración de péptido en μ M. Los datos de MTS se expresaron como porcentaje de la viabilidad neuronal con el control sin agresión tomado como 100 % de viabilidad (media $\pm$ SD; n = 4; *P <0.05).

La Fig. 42 muestra los resultados de la preexposición de sulfato de protamina (Ptm) y péptidos R18 a astrocitos primarios de rata durante 15min antes de la privación de oxígeno-glucosa. Concentración de péptidos 2 μ M. La viabilidad celular se evaluó 24 horas después de OGD usando el ensayo de MTS. Los datos de MTS se expresaron como valores de absorbancia a 490nm (media $\pm$ SD; n = 4-6; *P <0.05).

La Fig. comparativa 43 muestra los resultados de la exposición de péptidos de protamina 1-5 (Ptm1 - Ptm5), sulfato de protamina (Ptm), y protamina de bajo peso molecular (LMWP) a astrocitos primarios de rata; concentración de protamina en μ M. El tratamiento de los cultivos de astrocitos con protamina fue durante 24 horas. Viabilidad celular

24 horas después de la exposición a protamina o sin tratamiento (Control). Los datos de MTS se expresaron como valores de absorbancia a 490nm (n = 4).

La Fig. 44 muestra la cinética del influjo de calcio intracelular para los bloqueantes del receptor de glutamato (MK801/CNQX a 5µM/5µM), R9D, R15, PYC36-TAT, TAT, TAT-NR2B9c JNKI-1-TATD, TAT-JNKI-1, kFGF-JNKI-1 y kFGF después de la exposición a ácido glutámico en cultivos neuronales. Se usó Fura-2 AM para la evaluación del calcio intracelular. Trazas representativas de Fura-2 AM fluorescentes; intensidad de fluorescencia (FI) de los cultivos neuronales 30 seg antes y después de la adición (flecha) de ácido glutámico (100 µM concentración final). Los péptidos o bloqueantes del receptor de glutamato se añadieron a los cultivos neuronales durante 10 min y se retiraron (tiempo = 0) antes del ácido glutámico. Los valores son media ± SE; n = 3. La concentración de los péptidos fue 5µM.

Fig. 45. Representación en diagrama del modelo propuesto de CPP ricos en arginina que inducen internalización endocítica de las estructuras de la superficie de las células neuronales. Nota: el modelo se aplica a membranas plasmáticas neuronales sinápticas y extrasinápticas y potencialmente a la membrana plasmática de astrocitos, pericitos, células endoteliales cerebrales, oligodendrocitos y microglia. NMDAR: receptores de N-metil-D-aspartato; AMPAR: receptores del ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; NCX: intercambiador de sodio y calcio; VGCC: canales de calcio regulados por voltaje (p. ej., CaV2.2, CaV3.3); ASIC: canales iónicos sensibles a ácido; TRPM2/7: canales catiónicos potenciales de receptor transitorios 2 y 7; mGluR: receptores de glutamato metabotrópicos; VR1: receptor vanilloide 1 o canal catiónico potencial de receptor transitorio subfamilia V miembro 1; TNFR: receptores del factor de necrosis tumoral; EAAT: transportadores de aminoácidos excitadores; AQP4: Acuaporina 4; Trk: receptores de la tropomiosina quinasa.

Las Figuras 46 y 47 son tablas de referencia de las secuencias descritas y usadas en esta memoria descriptiva.

Descripción de realizaciones

A lo largo de esta memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" o "incluye" o "que incluye", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

La invención se refiere a péptidos aislados y composiciones que comprenden péptidos aislados, y a los usos de los mismos. Los péptidos aislados se caracterizan porque pueden reducir los efectos neurodegenerativos de una lesión neural o evento isquémico cerebrovascular (p. ej., y especialmente, apoplejía) cuando se administran antes o después de la lesión neural o evento isquémico. Así, la administración de las composiciones de la invención reduce la pérdida de células neuronales que se produce después de una lesión neural o evento isquémico cerebrovascular. El Solicitante ha encontrado ahora, sorprendentemente, que determinados polipéptidos en la forma de CPP y polipéptidos que tienen cadenas contiguas de aminoácidos básicos/catiónicos (particularmente, residuos de arginina, pero que incluyen también residuos de lisina y triptófano), presentan actividad neuroactiva o neuroprotectora y pueden servir como agentes neuroprotectores (es decir, para el tratamiento de lesión neural) en sí mismos, es decir, sin tener que fusionarse con otros agentes o péptidos neuroprotectores. Como tal, la invención se refiere a péptidos de poliarginina de 12 a 32 residuos de aminoácidos de longitud para su uso en el tratamiento o prevención de lesión neural.

El término "aminoácido" o "residuo", tal y como se usa en la presente memoria, incluye uno cualquiera de los veinte aminoácidos naturales, la forma D de uno cualquiera de los aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, y derivados, análogos y miméticos de los mismos. Cualquier aminoácido, incluyendo aminoácidos naturales, puede adquirirse comercialmente o sintetizarse por métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen norleucina ("Nle"), norvalina ("Nva"), β-Alanina, L o D-napftalanina, ornitina ("Orn"), homoarginina (homoArg) y otros muy conocidos en la técnica peptídica, incluyendo los descritos en M. Bodanzsky, "Principles of Peptide Synthesis," 1ª y 2ª ed. revisadas., Springer-Verlag, Nueva York, N.Y., 1984 y 1993, y Stewart y Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1984.

Los aminoácidos comunes pueden referirse por su nombre completo, notación estándar de una letra (IUPAC), o notación estándar de tres letras, por ejemplo: A, Ala, alanina; C, Cys, cisteína; D, Asp, aspártico; E, Glu, ácido glutámico; F, Phe, fenilalanina; G, Gly, glicina; H, His, histidina; I, Ile isoleucina; K, Lys, lisina; L, Leu, leucina; M, Met, metionina; N, Asn, asparagina; P, Pro, prolina; Q, Gln, glutamina; R, Arg, arginina; S, Ser, serina; T, Thr, treonina; V, Val, valina; W, Trp, triptófano; X, Hyp, hidroxiprolina; Y, Tyr, tirosina. Cualquiera y todos los aminoácidos en las composiciones de la presente memoria pueden ser naturales, sintéticos, y derivados o miméticos de los mismos. Tal y como se usa en la presente memoria, "aislado" significa un péptido descrito en la presente memoria que no está en un estado natural (p. ej., está disociado de una molécula de proteína mayor o resto celular en el que está naturalmente o con el que está asociado normalmente), o es un fragmento no natural de una proteína natural (p. ej., el péptido comprende menos del 25 %, preferiblemente menos del 10 % y lo más preferiblemente menos del 5 % de la proteína natural). Aislado también significa que la secuencia de aminoácidos del péptido no aparece en la

naturaleza, por ejemplo, porque la secuencia está modificada a partir de una secuencia natural (p. ej., por la alteración de determinados aminoácidos, incluyendo aminoácidos básicos (es decir, catiónicos) tales como arginina, triptófano, o lisina), o porque la secuencia no contiene aminoácidos flanqueantes que están presentes en la naturaleza. El término "aislado" puede significar que el péptido o secuencia de aminoácidos es una secuencia o polipéptido preparado por el hombre y puede no ser natural.

Asimismo, "aislado", tal y como se usa en conexión con ácido nucleicos que codifican péptidos, engloba todo lo anterior, p. ej., los ácidos nucleicos aislados están disociados de nucleótidos adyacentes con los que están asociados en la naturaleza, y pueden producirse de forma recombinante, sintética, por purificación a partir de extractos biológicos, y semejantes. Los ácidos nucleicos aislados pueden contener una parte que codifica uno de los péptidos anteriores y otra parte que codifica otro péptido o proteína. Los ácidos nucleicos aislados también pueden estar marcados. Los ácidos nucleicos incluyen codones que son preferidos para uso en animales, bacterias, plantas, u hongos. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico aislado es un vector, tal como un vector de expresión, que incluye un ácido nucleico que codifica uno de los péptidos aislados anteriores. Un método general para la construcción de cualquier secuencia de ADN deseada se proporciona, p. ej., en Brown J. et al. (1979), *Methods in Enzymology*, 68:109; Sambrook J, Maniatis T (1989), *supra*.

También se contemplan análogos no peptídicos de péptidos, p. ej., los que proporcionan una estructura estabilizada o disminuyen la biodegradación. Los análogos miméticos de péptidos pueden prepararse sobre la base de un péptido seleccionado por el reemplazo de uno o más residuos por restos no peptídicos. Preferiblemente, los restos no peptídicos permiten al péptido retener su conformación natural, o estabilizan una conformación preferida, p. ej., bioactiva. Un ejemplo de métodos para la preparación de análogos miméticos no peptídicos a partir de péptidos se describe en Nachman et al., *Regul. Pept.* 57:359-370 (1995). El término "péptido", tal y como se usa en la presente memoria, engloba todo lo anterior.

Como se ha mencionado anteriormente, el péptido de la presente invención puede estar compuesto bien por aminoácidos naturales, es decir, L-aminoácidos, o por D-aminoácidos, es decir, por una secuencia de aminoácidos que comprende D-aminoácidos en orden retro-inverso comparado con la secuencia nativa. El término "retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el que la dirección de la secuencia está invertida y la quiralidad de cada residuo de aminoácido está invertida. Así, cualquier secuencia de la presente memoria, que está presente en la forma L, también se describe en la presente memoria de forma inherente como una secuencia peptídica D-enantiomérica (retro-inverso). Las secuencias peptídicas D-enantioméricas (retro-inverso) según la invención pueden construirse, p. ej., sintetizando una inversa de la secuencia de aminoácidos para la secuencia de L-aminoácidos nativa correspondiente. En los péptidos enantiómeros D-retro-inversos, p. ej., un componente del péptido aislado, se intercambian las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada uno de los enlaces amida, mientras se conserva la posición de los grupos de la cadena lateral en cada carbono alfa.

La preparación de un componente de los péptidos aislados de la invención como se han definido anteriormente que tienen aminoácidos D-enantioméricos puede conseguirse sintetizando químicamente una secuencia de aminoácidos inversa de la secuencia de aminoácidos en la forma L natural correspondiente o por cualquier otro método adecuado conocido por un experto en la técnica. Alternativamente, la forma D-retro-inversa-enantiomérica de un péptido o un componente del mismo puede prepararse usando síntesis química como se ha descrito anteriormente utilizando una forma L de un péptido o un componente del mismo como una matriz para la síntesis química de la forma D-retro-inversa-enantiomérica.

Un polipéptido rico en aminoácidos catiónicos (que también puede referirse como un polímero o copolímero de aminoácidos catiónicos) puede incluir un polipéptido u oligómero con una longitud de 10 a 32 aminoácidos. Como tal, por "rico en catiónico" se quiere decir cualquier péptido, oligopéptido, o polipéptido que comprende o incluye, típicamente, más del 30 % de residuos catiónicos, más del 50 %, o incluso más del 60 %. En determinadas realizaciones, esto puede conllevar péptidos que comprenden el 90 %, o incluso el 100% de residuos catiónicos tales como, preferiblemente, residuos de arginina. De acuerdo con esto, un polipéptido rico en arginina (que también puede referirse como un polímero o copolímero de aminoácidos de arginina) puede incluir un polipéptido u oligómero con una longitud de 10 a 32 aminoácidos. Como tal, por "rico en arginina" se quiere decir cualquier péptido, oligopéptido, o polipéptido que comprende o incluye 10 o más residuos de arginina, o más del 30 % de residuos de arginina, más del 50 %, o incluso más del 60 %. Como tal, determinadas realizaciones comprenden péptidos en los que el 100 % de los aminoácidos son residuos de arginina, con una eficacia y baja toxicidad adecuadas cuando se usan en el rango de R10 a R18 y a dosificaciones farmacéuticamente eficientes, mientras en otros casos, se refiere a otros péptidos (tales como CPP e incluyendo protamina y LMWP) que tienen cadenas intermitentes de residuos de arginina. Habitualmente, las cadenas de residuos de arginina comprenden 4 a 5 residuos de arginina consecutivos/contiguos, teniendo intercalados otros residuos de aminoácidos. En aspectos preferidos de la descripción, los aminoácidos intercalados son residuos de lisina (K), ya que estos también tienen una carga catiónica generalmente.

En determinadas realizaciones, un polímero o copolímero de arginina incluye al menos 12 residuos de arginina contiguos, más preferiblemente al menos 13 residuos de arginina contiguos, más preferiblemente al menos 14

residuos de arginina contiguos, más preferiblemente al menos 15 residuos de arginina contiguos, más preferiblemente al menos 16 residuos de arginina contiguos, más preferiblemente al menos 17 residuos de arginina contiguos y más preferiblemente al menos 18 residuos de arginina contiguos. En una realización preferida, se usa R15.

- 5 Pueden hacerse varios cambios incluyendo la adición de varios grupos laterales que no afectan la manera en la que el péptido funciona, o que afectan favorablemente la manera en la que el péptido funciona. Dichos cambios pueden implicar añadir o sustraer grupos cargados, sustituir aminoácidos, añadir restos lipofílicos que no afectan la unión pero que afectan las características de carga global de la molécula, facilitando la administración a través de la barrera hematoencefálica, etc. Para cada uno de dichos cambios, no se requiere más que experimentación rutinaria
- 10 para ensayar si la molécula funciona según la invención. Simplemente, se hace el cambio deseado o se selecciona el péptido deseado y se aplica de una forma como se describe con detalle en los ejemplos. Por ejemplo, si el péptido (modificado o no modificado) es activo en un ensayo de protección frente a ácido kaínico, o si dicho péptido compete con el neurotransmisor parental en un ensayo de función neurotransmisora, entonces el péptido es un péptido neurotransmisor funcional.
- 15 La descripción también engloba variantes funcionales del péptido aislado. Tal y como se usa en la presente memoria, una "variante funcional" o "variante" de un péptido aislado es un péptido que contiene una o más modificaciones en la secuencia primaria de aminoácidos del péptido aislado y retiene las propiedades descritas en la presente memoria. Las modificaciones que crean una variante funcional del péptido aislado pueden hacerse, por ejemplo, 1) para aumentar una propiedad de un péptido aislado, tal como la estabilidad del péptido en un sistema de expresión; 2) para proporcionar una nueva actividad o propiedad a un péptido aislado, tal como la adición de un epítipo antigénico o la adición de un resto detectable; o 3) para proporcionar una secuencia de aminoácidos diferente que da lugar a las mismas propiedades, o similares, en el péptido. Las modificaciones a un péptido aislado pueden hacerse a un ácido nucleico que codifica el péptido, y pueden incluir delecciones, mutaciones puntuales, truncamientos, sustituciones de aminoácidos y adiciones de aminoácidos. Alternativamente, las modificaciones pueden hacerse directamente al péptido, tal como por escisión, adición de una molécula conectora, preferiblemente un conector escindible tal como MMP, calpaína, tPA, adición de un resto detectable tal como biotina, adición de un ácido graso, sustitución de un aminoácido por otro y semejantes. Las modificaciones también engloban proteínas de fusión que comprenden todo o parte de la secuencia de aminoácidos del péptido aislado. En una realización, el conector se selecciona de uno o más conectores de tipo MMP, conectores de calpaína, caspasa o tPA. Los conectores de tipo MMP se definen como la secuencia peptídica reconocida y escindida por metaloproteinasas de la matriz (MMP). De forma similar, un conector de calpaína, caspasa o tPA es una secuencia peptídica reconocida y escindida por estas enzimas proteasas. En determinadas partes de la descripción, los péptidos de la invención también se fusionan con otros péptidos que tienen que transportarse al sitio de una lesión neural o que tienen que transportarse intracelularmente en las células neurales. Como tales, los péptidos de la invención también pueden estar unidos a péptidos auxiliares que pueden unirse a o interactuar con enzimas perjudiciales para la función neural, de manera que los péptidos auxiliares pueden funcionar como inhibidores competitivos de las enzimas después de su transporte a través de la membrana celular por el péptido de la invención. Los péptidos auxiliares son tPA, calpaína, y MMP, y están unidos al péptido de la invención usando un conector escindible tal como una secuencia de caspasa, de manera que el tPA, calpaína o MMP se libera del péptido de la invención para funcionar entonces como un inhibidor competitivo intracelularmente para las enzimas perjudiciales para la función neural.

- El término "identidad de secuencia", como se define en la presente memoria, significa que las secuencias se comparan como sigue. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias pueden alinearse para propósitos de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos). Pueden compararse entonces los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias. Por ejemplo, cuando se dice que un péptido particular tiene un porcentaje de identidad específico con un polipéptido de referencia con una longitud definida, el porcentaje de identidad es relativo al péptido de referencia. Así, un péptido que es 50 % idéntico a un polipéptido de referencia que tiene una longitud de 100 aminoácidos puede ser un polipéptido de 50 aminoácidos que es completamente idéntico a una parte con una longitud de 50 aminoácidos del polipéptido de referencia. También podría ser un polipéptido con una longitud de 100 aminoácidos, que es 50 % idéntico al polipéptido de referencia en su longitud total. Dicha determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático.
- 55 Un ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin et al. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en el programa NBLAST, que puede usarse para identificar secuencias que tienen la identidad deseada respecto a la secuencia de aminoácidos de la invención. Para obtener alineamientos con huecos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., NBLAST). Las secuencias pueden alinearse además usando la Versión 9 del GAP del Genetic Computing Group (programa de alineamiento global), usando la matriz por defecto (BLOSUM62) (valores -4 a +11)

con una penalización por abertura de hueco de -12 (para el primer nulo de un hueco) y una penalización por extensión de hueco de -4 (por cada nulo consecutivo adicional en el hueco). Después del alineamiento, se calcula el porcentaje de identidad expresando el número de concordancias como un porcentaje del número de aminoácidos en la secuencia reivindicada. Los métodos descritos de determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos pueden aplicarse correspondientemente a secuencias de ácidos nucleicos.

El péptido de la invención puede estar unido directamente o mediante un conector. Un "conector" en el presente contexto es habitualmente un péptido, oligopéptido o polipéptido y puede usarse para conectar múltiples de los péptidos entre sí. Los péptidos de la invención seleccionados para ser conectados entre sí pueden ser secuencias idénticas, o se seleccionan de cualquiera de los péptidos de la invención. Un conector puede tener una longitud de 1-10 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de 1 a 5 aminoácidos y lo más preferiblemente una longitud de 1 a 3 aminoácidos. En determinadas realizaciones, no se requiere que el conector tenga ningunas propiedades de formación de estructura secundaria, es decir, no se requiere una tendencia a formar una estructura de hélice α o lámina β , p. ej., si el conector está compuesto por al menos el 35 % de residuos de glicina. Como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria, un conector puede ser un péptido escindible tal como un péptido MMP que puede escindirse intracelularmente por los procesos celulares normales, dando lugar de forma efectiva a la dosis intracelular de los péptidos previamente conectados, mientras se mantiene la dosis extracelular lo suficientemente baja como para no ser considerada tóxica. El uso de una secuencia de péptido, oligopéptido o polipéptido escindible intracelularmente/endógenamente permite que los péptidos se separen uno de otro después de la administración en la célula diana. Las secuencias de oligo o polipéptidos escindibles en este contexto también incluyen secuencias de oligo o polipéptidos escindibles por proteasas, en donde el sitio de escisión de la proteasa se selecciona típicamente dependiendo de la proteasa expresada endógenamente por la célula tratada. El conector como se ha definido anteriormente, si está presente como una secuencia de oligo o polipéptido, puede estar compuesto bien por D-aminoácidos o por aminoácidos naturales, es decir, L-aminoácidos. Como una alternativa a lo anterior, el acoplamiento o fusión de los péptidos puede conseguirse mediante un agente de acoplamiento o conjugación, p. ej., un reactivo de entrecruzamiento. Existen varios reactivos de entrecruzamiento intermolecular que pueden utilizarse, véase, por ejemplo, Means y Feeney, *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, 1974, pp. 39-43. Entre estos reactivos están, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenilen)bismaleimida; N,N'-etilen-bis-(yodoacetamida) u otro reactivo que tenga 6 a 11 puentes de carbono metileno; y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno. Otros reactivos de entrecruzamiento útiles para este propósito incluyen: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona; adipimidato de dimetilo; fenol-1,4-disulfonilcloruro; hexametildiisocianato o diisotiocianato, o azofenil-p-diisocianato; glutaraldehído y disdiazobencidina. Los reactivos de entrecruzamiento pueden ser homobifuncionales, es decir, tienen dos grupos funcionales que experimentan la misma reacción. Un reactivo de entrecruzamiento homobifuncional preferido es bismaleimidohexano (BMH). BMH contiene dos grupos funcionales maleimida, que reaccionan específicamente con compuestos que contienen sulfhidrilo en condiciones suaves (pH 6.5-7.7). Los dos grupos maleimida están conectados por una cadena de hidrocarburo. Por lo tanto, BMH es útil para el entrecruzamiento irreversible de proteínas (o polipéptidos) que contienen residuos de cisteína. Los reactivos de entrecruzamiento también pueden ser heterobifuncionales. Los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo, un grupo que reacciona con amina y un grupo que reacciona con tiol, que entrecruzarán dos proteínas que tienen aminas y tioles libres, respectivamente. Los ejemplos de reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales son 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), y 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida (SMPB), un análogo con cadena extendida de MBS. El grupo succinimidilo de estos reactivos de entrecruzamiento con una amina primaria, y las formas de maleimida que reaccionan con tiol, forma un enlace covalente con el tiol de un residuo de cisteína. Como los reactivos de entrecruzamiento tienen frecuentemente una baja solubilidad en agua, puede añadirse un resto hidrofílico, tal como un grupo sulfonato, al reactivo de entrecruzamiento para mejorar su solubilidad en agua. El sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de reactivos de entrecruzamiento modificados para aumentar su solubilidad en agua. Muchos reactivos de entrecruzamiento rinden un conjugado que es esencialmente no escindible en las condiciones celulares. Por lo tanto, algunos reactivos de entrecruzamiento contienen un enlace covalente, tal como un disulfuro, que es escindible en las condiciones celulares. Por ejemplo, el reactivo de Traut, ditiobis (succinimidilpropionato) (DSP), y 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) son agentes de entrecruzamiento escindibles muy conocidos. El uso de un reactivo de entrecruzamiento escindible permite que los péptidos se separen después de la administración en la célula diana, si se desea, siempre que la célula sea capaz de escindir una secuencia particular del reactivo de entrecruzamiento. Para este propósito, también puede ser útil la unión directa por disulfuro. El entrecruzamiento químico también puede incluir el uso de brazos espaciadores. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajuste de las distancias intramoleculares entre los restos conjugados y, de esta manera, puede ayudar a conservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede estar en la forma de un resto de proteína (o polipéptido) que incluye los aminoácidos del espaciador, p. ej., prolina. Alternativamente, un brazo espaciador puede ser parte del reactivo de entrecruzamiento, tal como en "SPDP de cadena larga" (Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., No. de cat. 21651H). Están disponibles comercialmente numerosos reactivos de entrecruzamiento, incluyendo los discutidos anteriormente. Las instrucciones detalladas para su uso están disponibles fácilmente a partir de proveedores comerciales. Una referencia general sobre el entrecruzamiento de proteínas y la preparación de conjugados es: Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press (1991).

Como una realización adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas o medicamentos que comprenden los péptidos como se definen en la presente memoria para su uso en el tratamiento o prevención de lesión neural. En determinadas partes de la descripción, dichas composiciones farmacéuticas o medicamentos comprenden los péptidos, así como un conector opcional, como se define en la presente memoria. Adicionalmente, dicha composición farmacéutica o medicamento puede comprender un transportador, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable. Un "transportador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable" según la invención se refiere a un transportador, adyuvante o vehículo no tóxico que no destruye la actividad farmacológica o direccionamiento fisiológico del péptido con el que se formula. Los transportadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero no están limitados a, los que pueden aplicarse cranealmente o intracranealmente, o que puedan cruzar la barrera hematoencefálica (BBB). A pesar de esto, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tamponadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como hidrógenofosfato de disodio, hidrógenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilen glicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilen glicol y grasa de lana.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse oralmente, parenteralmente, por pulverizador para inhalación, tópicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente, cerebralmente, o mediante un reservorio implantado.

El término parenteral, tal y como se usa en la presente memoria, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasínovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Las composiciones farmacéuticas se administran oralmente, intraperitonealmente o intravenosamente. Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas en la técnica usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están el agua, disolución de Ringer y disolución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean de manera convencional aceites fijos estériles como un disolvente o medio de suspensión.

Como tal, puede emplearse cualquier aceite fijado blando incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicérido son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas disoluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetil celulosa o agentes de dispersión similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos usados comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables también pueden usarse para los propósitos de la formulación.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente memoria pueden administrarse oralmente en una forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, pero no limitado a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los vehículos usados comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, saporíferos o colorantes.

Alternativamente, la composición farmacéutica como se define en la presente memoria puede administrarse en la forma de supositorio para administración rectal. Dicho supositorio puede prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilen glicoles.

La composición farmacéutica como se define en la presente memoria también puede administrarse tópicamente, especialmente cuando la diana del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por la aplicación tópica, incluyendo enfermedades del cerebro, otros tejidos intracraneales, el ojo o la piel. Las formulaciones adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos.

Para aplicaciones tópicas, la composición farmacéutica como se define en la presente memoria puede formularse en una pomada adecuada que contiene los péptidos como se identifican en la presente memoria, suspendidos o disueltos en uno o más vehículos. Los vehículos para administración tópica del péptido incluyen, pero no están limitados a, aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilen glicol, polioxietileno, compuesto polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica como se define en la presente memoria puede formularse en una loción o crema adecuada que contiene el péptido suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, pero no están limitados a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

La composición farmacéutica como se define en la presente memoria también puede administrarse por aerosol nasal o inhalación. Dicha composición puede prepararse según técnicas muy conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y puede prepararse como disoluciones en disolución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales. La composición farmacéuticamente aceptable o medicamento de la presente memoria se formula para administración oral o parenteral, p. ej., por inyección.

Para los propósitos de tratamiento, puede usarse una cantidad efectiva, no tóxica, reductora de la lesión, del péptido para la preparación de una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, puede combinarse una cantidad del péptido con el o los materiales vehiculares para producir una composición como se ha definido anteriormente. La composición farmacéutica se prepara típicamente en una forma de dosificación única (o múltiple), que variará dependiendo del huésped tratado y del modo de administración particular. Habitualmente, la composición farmacéutica se formula de manera que puede administrarse un rango de dosificación por dosis de 0.0001 a 100 mg/kg de peso corporal/día del péptido a un paciente que recibe la composición farmacéutica. Los rangos de dosificación preferidos por dosis varían de 0.01 mg/kg de peso corporal/día a 50 mg/kg de peso corporal/día, incluso los rangos de dosificación más preferidos por dosis varían de 0.1 mg/kg de peso corporal/día a 10 mg/kg de peso corporal/día. Sin embargo, los rangos de dosificación y regímenes de tratamiento como se ha mencionado anteriormente pueden adaptarse adecuadamente para cualquier paciente particular dependiendo de una variedad de factores, incluyendo la actividad del péptido específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de la administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, el criterio del médico responsable del tratamiento y de la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando. En este contexto, la administración puede llevarse a cabo con un rango de dosificación inicial, que puede variarse durante el tiempo del tratamiento, p. ej., mediante el incremento o disminución del rango de dosificación inicial dentro del rango como se ha mostrado anteriormente. Alternativamente, la administración puede llevarse a cabo de una manera continua mediante la administración de un rango de dosificación específico, manteniendo de esta manera el rango de dosificación inicial durante todo el tiempo del tratamiento. Ambas formas de administración pueden combinarse además, p. ej., si el rango de dosificación debe adaptarse (incrementarse o disminuirse) entre varias sesiones del tratamiento, pero manteniéndolo constante en la única sesión de manera que los rangos de la dosificación de las diferentes sesiones son diferentes entre sí.

La composición farmacéutica y/o el péptido de la invención puede usarse para el tratamiento, mejora o prevención de lesión neural, incluyendo enfermedades relacionadas con el efecto dañino de una lesión en las células, particularmente células de mamífero, como se describe en la presente memoria, incluyendo apoplejía cerebral o lesiones en la médula espinal, epilepsia, hipoxia-isquemia perinatal, lesiones isquémicas o traumáticas en el cerebro o médula espinal y lesiones en las neuronas del sistema nervioso central (SNC) incluyendo, sin estar limitado a ello, lesiones agudas en el SNC, apoplejía cerebral isquémica o lesiones en la médula espinal, así como anoxia, isquemia, lesión mecánica, dolor neuropático, excitotoxicidad, y lesiones relacionadas. Además, la composición farmacéutica y péptidos de la invención pueden emplearse para proporcionar un efecto neuroactivo o neuroprotector frente a, o tratamiento de, lesión excitotóxica e isquémica, excitotoxicidad, ausencia de soporte neurotrófico, desconexión, lesión en neuronas incluyendo, p. ej., epilepsia, afecciones neurodegenerativas crónicas, y semejantes. En este contexto, la excitotoxicidad puede estar implicada particularmente en la apoplejía, lesión cerebral traumática y enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC), tales como esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), dolor neuropático, fibromialgia, enfermedad de Parkinson (PD), hipoxia-isquemia perinatal, y enfermedad de Huntington, que pueden tratarse en la presente memoria. Otras afecciones comunes que causan concentraciones excesivas de glutamato alrededor de las neuronas y que pueden tratarse en la presente memoria son hipoglucemia, vasoespismo, abstinencia de benzodiazepinas y estado epiléptico, glaucoma/deterioro de las células ganglionares de la retina, y semejantes.

El tratamiento, mejora o prevención de enfermedades relacionadas con el efecto dañino de una lesión en células de mamíferos como se ha definido anteriormente, así como de enfermedades o trastornos adicionales como se menciona en la presente memoria se lleva a cabo típicamente mediante la administración de una composición farmacéutica o péptido o mezcla de péptidos de la invención en un rango de dosificación como se describe en la presente memoria. La administración de la composición farmacéutica o péptidos puede llevarse a cabo bien antes del inicio de la excitotoxicidad y/o lesión cerebral (isquémica), es decir, el efecto dañino de una lesión en células de mamíferos, o concurrente o subsecuente al mismo; por ejemplo, la administración de la composición farmacéutica o

péptidos puede llevarse a cabo en un tiempo de (hasta) 1 hora (0-1 horas), hasta 2 horas, hasta 3-5 horas o hasta 24 horas o más después de una apoplejía cerebral o lesiones en la médula espinal, lesiones isquémicas o traumáticas en el cerebro o médula espinal y, en general, lesiones en las neuronas del sistema nervioso central (SNC). En trastornos neurodegenerativos crónicos (AD, PD, ALS, MS, etc.), el tratamiento puede requerir un tratamiento diario durante toda la vida.

Cuando se usan terapéuticamente, los compuestos de la invención se administran en cantidades terapéuticamente efectivas. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad necesaria para retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, o parar completamente la afección particular que se está tratando. Las cantidades terapéuticamente efectivas serán específicamente aquellas que influyen de forma deseable en la supervivencia de las neuronas después de apoplejía u otra agresión isquémica cerebral. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva variará con la edad y afección del sujeto, así como con la naturaleza y grado de la enfermedad en el sujeto, todos los cuales pueden ser determinados por un experto en la técnica. La dosificación puede ajustarse por el médico individual, particularmente en el evento de experimentar cualquier complicación.

Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a secuencias de ácido nucleico y sus derivados que codifican un péptido aislado o variante del mismo y a otras secuencias de ácido nucleico que hibridan con una molécula de ácido nucleico que consiste en las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente, en condiciones astringentes. El término "condiciones astringentes", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a parámetros que son familiares en la técnica. Los parámetros de la hibridación de ácidos nucleicos pueden encontrarse en referencias que compilan dichos métodos, p. ej., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, o *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Más específicamente, las condiciones astringentes, tal y como se usan en la presente memoria, se refiere a hibridación a 65 °C. en tampón de hibridación (3.5xSSC, Ficoll al 0.02%, Polivinil pirrolidona al 0.02%, Albúmina de Suero Bovino al 0.02%, NaH₂PO₄ 25 mM (pH7), SDS al 0.5%, EDTA 2 mM). SSC es Cloruro de Sodio 0.15 M/Citrato de Sodio 0.15 M, pH 7; SDS es Dodecil Sulfato de Sodio; y EDTA es ácido etilen diaminotetraacético. Después de la hibridación, la membrana en la que se transfiere el ADN se lava 2xSSC a temperatura ambiente y después 0.1xSSC/0.1xSDS a 65 °C.

La presente invención proporciona además kits que comprenden la composición farmacéutica mencionada anteriormente (en uno o más contenedores) en al menos una de las formulaciones anteriores y un manual de instrucciones o folleto informativo sobre instrucciones y/o información con respecto a la aplicación de la composición farmacéutica.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a no ser que se afirme específicamente otra cosa o el contexto requiera otra cosa, la referencia a una única etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupos de composiciones de materia, debe considerarse que engloba una y una pluralidad (es decir, una o más) de esas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

Los expertos en el campo de la invención apreciarán que la invención descrita en la presente memoria es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. La descripción también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta memoria descriptiva, individualmente o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o dos cualquiera o más de dichas etapas o características. La presente invención no está limitada en el alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, que se pretenden solo para el propósito de ejemplificación. Además, la presente invención se realiza sin experimentación excesiva usando, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, neurobiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en disolución, síntesis de péptidos en fase sólida, e inmunología, o técnicas citadas en la presente memoria.

El Solicitante ha encontrado, sorprendentemente, que los péptidos de poliarginina de 12 a 32 residuos de aminoácidos de longitud presentan eficacia neuroprotectora sin el requerimiento tradicional de estar fusionados con péptidos neuroprotectores identificados previamente. Estos péptidos también presentan toxicidad baja y son funcionales a dosis o concentraciones bajas. Más sorprendentemente, sin embargo, el Solicitante también ha encontrado que las cadenas largas de aminoácidos básicos (es decir, catiónicos) tales como péptidos de poliarginina de entre 12 y 20 residuos (inclusive) de longitud, preferiblemente 12 a 18 residuos (inclusive) de longitud, presentan una actividad neuroprotectora aumentada en gran medida cuando se comparan con estos CPP, y especialmente cuando se comparan a concentraciones similares con secuencias ricas en arginina más cortas, tales como R1 a R8. En particular, R12, R15, R18, cuando se ensayan en modelos de ácido glutámico y/o de lesión por isquemia *in vitro*, proporcionaron una neuroprotección aumentada cuando se comparan con los CPP mencionados anteriormente. Los dos modelos de lesión neuronal diferentes probablemente activen diferentes rutas celulares dañinas y, de esta manera, proporcionarán una percepción adicional respecto al espectro neuroprotector y modo posible de acción de los péptidos de la invención.

En esta memoria descriptiva, la abreviatura "Arg" seguida de un número entero, indica el número de repeticiones de arginina en un péptido. Así, Arg-15 (abreviado como R15, según la abreviatura de una letra de la IUPAC para la arginina) se refiere a residuos de arginina consecutivos en una formación peptídica. Hasta donde sea practicable, sin embargo, esta memoria descriptiva se referirá al código de aminoácidos de una letra, es decir, R15, en lugar de Arg-15, por ejemplo.

Trastornos neuronales que implican la muerte de células neuronales

Los trastornos neuronales tales como migraña, apoplejía, lesión cerebral traumática, lesión en la médula espinal, epilepsia, hipoxia-isquemia perinatal y trastornos neurodegenerativos incluyendo Enfermedad de Huntington (HD), Enfermedad de Parkinson (PD), Enfermedad de Alzheimer (AD) y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) son las causas más importantes de morbilidad y discapacidad que surgen a partir de lesión cerebral a largo plazo. Las lesiones cerebrales implican generalmente un rango de procesos de muerte celular incluyendo apoptosis, autofagia, necroptosis y necrosis, y afectan a las neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células microglia y del endotelio vascular (referidos colectivamente como la unidad neurovascular; NVU). Los desencadenantes dañinos implicados en la lesión neural implican diversas rutas que implican la excitotoxicidad del glutamato, sobrecarga de calcio, estrés oxidativo, enzimas proteolíticas y alteraciones mitocondriales. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "apoplejía" incluye cualquier trastorno isquémico que afecta al cerebro o médula espinal, p. ej., oclusión tromboembólica en una arteria del cerebro o médula espinal, hipotensión grave, hipoxia-isquemia perinatal, un infarto de miocardio, hipoxia, hemorragia cerebral, vasoespasmo, un trastorno vascular periférico, una trombosis venosa, una embolia pulmonar, un ataque isquémico transitorio, isquemia pulmonar, angina inestable, un déficit neurológico isquémico reversible, actividad trombolítica auxiliar, afecciones con coagulación excesiva, lesión por reperfusión cerebral, anemia de células estrelladas, un trastorno de apoplejía o un periodo isquémico inducido iatrogénicamente tales como angioplastia, o isquemia cerebral.

Los niveles extracelulares incrementados del neurotransmisor glutamato pueden causar la muerte de las células neuronales a través de procesos de lesión aguda y retardada causados por excitotoxicidad. Una acumulación de glutamato extracelular sobreestimula los receptores de NMDA y AMPA y subsecuentemente los receptores de VGCC, NCX, TRMP2/7, ASIC y mGlu, lo que da lugar a un influxo de iones calcio y sodio extracelulares y la liberación de calcio unido de los almacenes intracelulares. La sobreactivación de los receptores de NMDA también puede desencadenar la producción de moléculas dañinas (p. ej., óxido nítrico, CLCA1; regulador del canal de cloro activado por calcio 1, calpaína, SREBP1: proteína de unión al elemento regulador de estero-1) y rutas de señalización (p. ej., DAPK; proteína quinasa asociada con la muerte, CamKII: proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina II). El incremento en el calcio intracelular inicia un rango de eventos dañinos para las células que implican fosfolipasas, proteasas, fosfatasas, quinasas y óxido nítrico sintasa, así como la activación de rutas que desencadenan la muerte celular (es decir, apoptosis, autofagia, necroptosis y necrosis).

Como en la presente memoria se muestra que los péptidos de la invención protegen a las neuronas de la muerte, la descripción contenida en WO2009133247 y EP 1969003 muestra que los péptidos de la invención también encuentran aplicación en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, apoplejía, neuropatía periférica, o epilepsia y, de acuerdo con esto, otras patologías asociadas descritas en la presente memoria. De acuerdo con esto, la presente invención está dirigida a un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, apoplejía, neuropatía periférica, epilepsia, lesión en la médula espinal, diabetes o drogadicción, en donde una cantidad farmacéuticamente efectiva de uno cualquiera o más de los péptidos de la invención se administra a un paciente. En otras palabras, los péptidos según la presente invención son para uso en el tratamiento de lesiones asociadas con isquemia, así como la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), esclerosis múltiple (MS), encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), apoplejía, neuropatía periférica, epilepsia, lesión en la médula espinal y otras patologías relacionadas descritas en la presente memoria.

En aplicaciones farmacéuticas, los péptidos también pueden englobarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences. Esto también puede conseguirse usando preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el péptido, matrices que están en la forma de artículos conformados, p. ej., películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles como se describe en Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982) o polivinilalcohol, poliláctidas (Pat. de EE.UU. No. 3,773,919, EP 58,481), o etileno-acetato de vinilo no degradable.

En una realización, una composición farmacéutica que comprende el péptido de la invención como se ha definido anteriormente es para uso en el tratamiento de lesión isquémica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de

Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, apoplejía, neuropatía periférica, o epilepsia. En otra realización, los péptidos de la invención, o combinaciones de los mismos, pueden usarse para estimular la supervivencia de las neuronas. Los compuestos para usarse pueden usarse *in vitro* como se muestra en la presente memoria.

5 La presente invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplos (péptidos de poliarginina y ricos en arginina y de protamina ricos en arginina de las Tablas 1, 2 y 5 a continuación).

Sulfato de protamina, péptidos de protamina y otros péptidos

10 Péptidos listados en la Tabla 5. El sulfato de protamina (protamina; Ptm) se obtuvo de Sanofi Aventis. La protamina de bajo peso molecular (LMWP) fue sintetizada por Mimotopes Pty Ltd (Australia). Los péptidos de protamina 1 - 5 (Ptm1, Ptm2, Ptm3, Ptm4, Ptm5) fueron sintetizados por Pepmic Co Ltd (China). Los péptidos se purificaron por HPLC a más del 90 - 98 %. Todos los péptidos se prepararon como preparaciones madre 100x (500 µM) en disolución salina normal y se evaluaron en un rango de concentración de 0.1 - 10 µM, dependiendo del modelo de lesión.

15 Debe indicarse que el sulfato de protamina (protamina; Ptm) es una mezcla de Ptm1 - Ptm4¹. Los péptidos de protamina (Ptm, Ptm1-5, LMWP) son ricos en arginina.

Métodos (péptidos de poliarginina y ricos en arginina)

Cultivos corticales neuronales primarios

20 El establecimiento de los cultivos corticales fue como se ha descrito previamente (Meloni et al. 2001). Brevemente, el tejido cortical de ratas Sprague-Dawley E18-E19 se disoció en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Australia) suplementado con L-cisteína 1.3 mM, NaHCO₃ 0.9 mM, 10 unidades/ml de papaína (Sigma, EE.UU.) y 50 unidades/ml de ADNasa (Sigma) y se lavó en DMEM/suero de caballo al 10 % frío. Las neuronas se resuspendieron en Neurobasal (Invitrogen) que contenía suplemento B27 al 2 % (B27; Invitrogen). Antes de la siembra, los pocillos de vidrio de tamaño de 96 pocillos (6 mm de diámetro, ProTech, Australia) o placas de plástico de 96 pocillos (ProSciTech, Australia) se recubrieron con poli-D-lisina toda la noche (50 ml/pocillo: 50 mg/mL; 70 - 150 K, Sigma). El exceso de disolución de poli-D-lisina se retiró entonces y se reemplazó con Neurobasal (que contenía B27 al 2 %; suero fetal bovino al 4 %; suero de caballo al 1 %; glutamato 62.5 mM; 2-mercaptoetanol 25 mM; y 30 mg/mL de estreptomycin y 30 mg/mL de penicilina). Las neuronas se sembraron en placas para obtener ≈ 10,000 neuronas viables para cada pocillo en el día *in vitro* 11-12. Los cultivos neuronales se mantuvieron en un incubador con CO₂ (CO₂ al 5%, equilibrio de aire al 95%, 98 % de humedad) a 37 °C. En el día *in vitro* 4, un tercio del medio del cultivo se retiró y se reemplazó con Neurobasal/B27 al 2 % fresco que contenía el inhibidor mitótico, arabinofuranósido de citosina (concentración final 1 mM; Sigma). En el día *in vitro* 8, la mitad del medio del cultivo se reemplazó con Neurobasal/B27 al 2 %. Los cultivos se usaron en el día *in vitro* 11 o 12, tiempo después del cual consistían rutinariamente en >97 % de neuronas y 1-3 % de astrocitos (Meloni et al. 2001).

35 Otras líneas celulares usadas

También se usaron una línea celular endotelial de cerebro (bEND3) y una línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y) para algunos experimentos. Las células bEND3 y SH-SY5Y se cultivaron usando técnicas estándar en DMEM más suero fetal de ternera al 5 o 15 %. Los astrocitos primarios de rata se obtuvieron y cultivaron como se describe para las neuronas corticales, excepto que se usó DMEM más suero fetal de ternera al 10 % en lugar de Neurobasal/B27 al 2%, y no se usó el inhibidor mitótico, arabinofuranósido de citosina.

Péptidos penetrantes de células y péptidos control

45 Los péptidos listados en la Tabla 1 fueron sintetizados por Mimotopes Pty Ltd (Australia), excepto TAT-L, que fue sintetizado por Pepscan Presto (Países Bajos), y R9/tPA/R9, NCXBP3 y R9/X7/R9, que fueron sintetizados por China Peptide Co., Ltd. Los péptidos listados en la Tabla 2 fueron sintetizados por China Peptides (China). Los péptidos se purificaron por HPLC a más del 88 - 96 %. TAT-L, penetratina, R9 y Pep-1 fueron sintetizados en la isoforma L y TAT-D y Arg9-D en la forma D-retro-inverso resistente a proteasas, sintetizados a partir de D-aminoácidos en secuencia inversa (referida como isoforma D de aquí en adelante) (Brugidou et al. 1995) (Tabla 1). Se usaron como controles positivos un péptido inhibidor de JNK fusionado con TAT (JNKI-1D-TAT) en la isoforma-D y un péptido inhibidor de AP-1 fusionado con TAT (PYC36L-TAT) en la isoforma L (Tabla 1; Borsello et al. 2003; Meade et al. 2010b). Todos los péptidos se prepararon como preparaciones madre 100x (500 µM) en disolución salina normal y se evaluaron en un rango de concentración de 0.1 - 15 µM, dependiendo del modelo de lesión. El péptido TAT-L solo se usó en el modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico.

Tabla 1: secuencias de aminoácidos, pesos moleculares y carga de los péptidos

Péptido	SEQ ID NO.	Secuencia	No. de aminoácidos/No. de residuos de arginina: peso molecular (Da)	Carga neta a pH 7	Propiedades físico-químicas
R1: Arg-1	1	H-R-OH	1/1: 174	1	Catiónico
R3: Arg-3	2	H-RRR-OH	3/3: 487	3	Catiónico
R6: Arg-6	3	H-RRRRRR-OH	6/6: 955	6	Catiónico
R7: Arg-7	4	H-RRRRRRR-OH	7/7: 1,111	7	Catiónico
R8: Arg-8	5	H-RRRRRRRR-OH	8/8: 1,267	8	Catiónico
R9: Arg-9	6	H-RRRRRRRRR-OH	9/9: 1,424	9	Catiónico
R10: Arg-10	7	H-RRRRRRRRRR-OH	10/10: 1,580	10	Catiónico
R11: Arg-11	8	H-RRRRRRRRRRR-OH	11/11: 1,736	11	Catiónico
R12: Arg-12	9	H-RRRRRRRRRRRR-OH	12/12: 1,892	12	Catiónico
R13: Arg-13	10	H-RRRRRRRRRRRRR-OH	13/13: 2,048	13	Catiónico
R14: Arg-14	11	H-RRRRRRRRRRRRRR-OH	14/14: 2,204	14	Catiónico
R15: Arg-15	12	H-RRRRRRRRRRRRRRR-OH	15/15: 2,360	15	Catiónico
R18: Arg-18	13	H-RRRRRRRRRRRRRRRR-OH	18/18: 2,829	18	Catiónico
PTD-4 ^a	14	H-YARAAARQARA-OH	11/3: 1,204	3	Catiónico
E9/R9 (R9/E9)	15	H-EEEEEEEE-RRRRRRRR-OH	18/9: 2,586	0	Neutro
R9/tPA/R9 o R9/X7/R9	16	H-RRRRRRRRR-PGRVVGG-RRRRRRRRR-OH	25/19: 3,452	19	Catiónico
DAHK	17	H-DAHK-OH	4/0: 469.5	0.1	N/A
NR2B9c-TAT ^b	18	H-GRKKRRQRRR-KLSSIESDV-NH ₂	19/6: 2,355		Catiónico
D-R9	19	H-rrrrrrrr-NH ₂	9/9: 1423.73	10	Catiónico
TAT-D	20	H-GrrrqrkrG-NH ₂	10/6: 1,453	9	Catiónico

Péptido	SEQ ID NO.	Secuencia	No. de aminoácidos/No. de residuos de arginina: peso molecular (Da)	Carga neta a pH 7	Propiedades físico-químicas
TAT-L	21	Ac-GRKKRRQRRRG-NH2	10/6: 1,494	8	Catiónico
Penetratina	22	H-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH2	16/3: 2,246	7	Catiónico
Pep-1	23	H-KETWWETWWTEWSQPK KKRKV-NH2	21/1: 2,847	4	Anfílico
PYC36L-TAT ^c	24	H-GRKKRRQRRR-GGLQRRRQGYQSIKP-NH2	26/10: 3,180	13	Catiónico
JNKI-1D-TAT ^d	25	H-tdqsrpvqpflnltprkprpp-rrrqrrkrG-NH2	32/: 3,925	12	Catiónico
TAT-JNKI-1 ^d	26	H-GRKKRRQRRR-PPRPKRPTTLNLFQVPRSQD T-OH	32/9: 3,924.6	11	Catiónico
kFGF-JNKI-1	27	H-AAVALLPAVLLALLAP-PPRPKRPTTLNLFQVPRSQD T-OH	38/3: 4,043.9	3	Hidrofóbico
kFGF	28	H-AAVALLPAVLLALLAP-OH	16/0: 1515.96	0	Hidrofóbico
XIP ^e	29	H-RRLLFYKYVYKRYRAGKQ RG-OH	20/5: 2621.14	8	Catiónico
NCXBP3 ^f	30	H-RRERRRRSCAGCSRARGS CRSCRR-NH2	24/11: 2881.34	10.8	Catiónico
Cal/R9	31	Ac-PLFAE-RRRRRRRRR-NH2	15/9: 2022.41	8	Catiónico

En el extremo N, H indica amino libre, y Ac indica acetilo. En el extremo C OH indica ácido libre y NH2 indica amida. AA = aminoácidos. El código de una letra en minúsculas indica la isoforma D del aminoácido. ^aPéptido descrito en Ho et al (2001), ^bNR2B9c-TAT también conocido como NA-1 (Aarts et al., 2002; Hill et al 2012), ^cpéptido descrito en Meade et al. 2010ab y aislado por Phylogical Ltd, ^dpéptido descrito en Borsello et al. 2003, ^eXIP descrito por He et al., 1997, ^f péptido aislado por Jane Cross/Bruno Meloni de biblioteca de filómeros (Phylogica Pty Ltd).

Modelos de excitotoxicidad de ácido glutámico y ácido kaínico y NMDA e incubación de los péptidos

Los péptidos se añadieron a los pocillos del cultivo (formato de placas de 96 pocillos) 15 minutos antes de la exposición a ácido glutámico o ácido kaínico mediante la retirada de medio y la adición de 50 µl de Neurobasal/B27 al 2 % que contenía CPP, péptidos control o MK801/CNQX. Para inducir la excitotoxicidad, se añadieron 50 µl de Neurobasal/B27 al 2 % que contenía ácido glutámico (200 µM) o ácido kaínico (400 µM) o NMDA (200 µM) a los pocillos del cultivo (ácido glutámico 100 µM, ácido kaínico 200 µM y NMDA 100µM, concentración final). Los cultivos se incubaron a 37 °C en el incubador de CO₂ durante 5 minutos para para la exposición a ácido glutámico, 45 minutos para ácido kaínico y 10 minutos para NMDA, tiempo después del cual el medio se reemplazó con 100 µl de suplemento Neurobasal/N2 al 2 % al 50 % (Invitrogen) y disolución salina equilibrada al 50 % (BSS; véase más adelante). Los cultivos se incubaron durante 24 horas más a 37 °C en el incubador de CO₂. Los controles no tratados con o sin tratamiento con ácido glutámico o ácido kaínico recibieron las mismas etapas de lavado y adiciones de medio.

En un experimento, después de una incubación con CPP de 15 minutos (5 o 10 µM), el medio en los pocillos se retiró y los pocillos se lavaron una vez en 300 µl de BSS antes de la adición de Neurobasal/B27 al 2 % que contenía

ácido glutámico (100 μM /100 μl). Después de esta etapa, los cultivos se trataron como se ha descrito anteriormente. Los controles no tratados con o sin exposición al ácido glutámico recibieron las mismas etapas de lavado y adiciones de medio. Además, se realizó un experimento de tratamiento con CPP después de la exposición a ácido glutámico (5 μM) para el péptido R9 y el péptido control JNKI-1D-TAT. En este experimento, las neuronas se expusieron a ácido glutámico (100 μM) en 100 μl de Neurobasal/B27 al 2 % durante 5 minutos como se ha descrito anteriormente, tiempo después del cual el medio se retiró y se reemplazó con 50 μl de suplemento Neurobasal/N2 al 2 %, seguido de la adición de péptido (10 μM /50 μl en BSS) a los 0 y 15 minutos después de la exposición a ácido glutámico.

Para los experimentos de preexposición antes del ácido glutámico, las neuronas se expusieron al o a los péptidos durante un periodo de 10 minutos, inmediatamente antes o 1, 2, 3, 4 o 5 horas antes de la exposición a ácido glutámico. Esto se realizó retirando el medio y añadiendo 50 μl de Neurobasal/B27 al 2% que contenía el péptido. Después de los 10 minutos a 37 °C en el incubador de CO₂, el medio se retiró y se reemplazó con 100 μl de Neurobasal/B27 al 2 % (para el medio de exposición inmediata a ácido glutámico contenía ácido glutámico; 100 μM). En el tiempo de pretratamiento con el péptido relevante, el medio se retiró y se reemplazó con 100 μl de Neurobasal/B27 al 2 % que contenía ácido glutámico (100 μM). Después de una exposición a ácido glutámico de 5 minutos, los pocillos de los cultivos neuronales se trataron como se ha descrito anteriormente. Para todos los experimentos, los controles no tratados con o sin tratamiento de ácido glutámico se sometieron a las mismas etapas de incubación y adiciones de medio.

Experimentos con heparina

La heparina (para inyección) se obtuvo de Pfizer (1000 UI/ml). Se realizaron dos experimentos diferentes con heparina: 1. Los péptidos se incubaron con heparina (20 UI/ml) en Neurobasal/B27 durante 5 minutos a temperatura ambiente, antes de la adición a los pocillos del cultivo (50 μl) durante 15 minutos a 37 °C en el incubador de CO₂. Después del periodo de incubación, el medio de los pocillos se retiró y se reemplazó con 100 μl de Neurobasal/B27 al 2 % que contenía ácido glutámico (100 μM), y posteriormente se trató como se ha descrito anteriormente; 2. El medio en los pocillos se reemplazó con Neurobasal/B27 al 2 % que contenía heparina (50 μl ; 40 UI/ml) y se incubó durante 5 minutos a 37 °C en el incubador de CO₂. Después del periodo de incubación, los péptidos o bloqueantes del receptor de glutamato (MK801/CNQX) en Neurobasal/B27 al 2 % (50 μl) se añadieron a los pocillos del cultivo y los cultivos se incubaron durante 10 minutos más a 37 °C en el incubador de CO₂. Después del periodo de incubación, el medio de los pocillos se retiró y se reemplazó con 100 μl de Neurobasal/B27 al 2 % que contenía ácido glutámico (100 μM), y posteriormente se trató como se ha descrito anteriormente. Para todos los experimentos, los controles de péptido no tratados con heparina con tratamiento de ácido glutámico se sometieron a las mismas etapas de incubación y adiciones de medio.

Modelos de isquemia/OGD *in vitro* e incubación con los péptidos

El modelo de isquemia *in vitro* usado para los cultivos neuronales corticales primarios se realizó como se ha descrito previamente (Meloni et al. 2011). Brevemente, el medio de los cultivos se retiró de los pocillos (formato de placa de 96 pocillos de vidrio) y se lavó con 315 μl de disolución salina equilibrada sin glucosa (BSS; mM: 116 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 0.8 MgSO₄, 1 NaH₂PO₄; pH 6.9) antes de la adición de 60 μl de BSS que contenía péptidos penetrantes de células o control (véase la Tabla 1). También se incluyó un control positivo no de péptido que consistía en los bloqueantes del receptor de glutamato (MK801 5 μM /6-ciano-7-nitroquinoxalina 5 μM : MK801/CNQX). La isquemia *in vitro* se inició poniendo pocillos en un incubador anaeróbico (Don Whately Scientific, Inglaterra; atmósfera de CO₂ al 5 %, H₂ al 10 % y argón al 85 %, humedad del 98 %) a 37 °C durante 55 minutos. Después de la retirada del incubador anaeróbico, se añadieron 60 μl de suplemento Neurobasal/N2 al 2 % a los pocillos y los cultivos se incubaron durante 24 horas más a 37 °C en el incubador de CO₂. Los cultivos control recibieron los mismos procedimientos de lavado con BSS y adiciones de medio que los cultivos isquémicos tratados antes de la incubación a 37 °C en el incubador de CO₂.

Para los experimentos de preexposición antes de OGD, el procedimiento fue el mismo que el descrito en el modelo del ácido glutámico, excepto que el pretratamiento de 10 minutos con los péptidos se realizó usando 100 μl de Neurobasal/B27 al 2%. Los cultivos control se sometieron a los mismos procedimientos de lavado con BSS y adiciones de medio que los cultivos tratados OGD.

El modelo de isquemia *in vitro* también se usó para las células bEND3, células SH-SY5Y, y astrocitos. Para las células bEND3, la incubación anaeróbica se prolongó a 2-3 horas y después de la retirada del incubador anaeróbico, se añadieron 60 μl de DMEM/FCS al 2 % a los pocillos. Para las células SH-SY5Y, la primera etapa de lavado con BSS (315 μl) se omitió y la incubación anaeróbica se prolongó a 2-5 horas. Después de la retirada del incubador anaeróbico, se añadieron 60 μl de DMEM/FCS al 2 % a los pocillos. Para los astrocitos, la incubación anaeróbica se prolongó a 1:15 a 2:00 horas y después de la retirada del incubador anaeróbico, se añadieron 60 μl de DMEM/FCS al 2 % a los pocillos.

Modelo de toxicidad neuronal, en bEND3 y astrocitos *in vitro* e incubación con los péptidos

Para los cultivos neuronales, los péptidos se añadieron a los pocillos del cultivo (formato de placa de 96 pocillos)

retirando el medio y añadiendo 100 µl de suplemento al 50 % de Neurobasal/N2 al 2 % y BSS al 50 % que contenía CPP, JNKI-1D-TAT o TAT-NR2B9c. Los cultivos control recibieron suplemento de 50 % de Neurobasal/N2 al 2 % y medio BSS al 50 % solo. Los cultivos se incubaron a 37 °C en el incubador de CO₂ durante 20 horas, tiempo después del cual se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo MTS. Para los cultivos de bEND3, los péptidos se añadieron a los pocillos del cultivo (formato de placa de 96 pocillos) retirando el medio y añadiendo 100 µl de DMEM/FCS al 2 % que contenía el péptido. Los cultivos control recibieron 100 µl de DMEM/FCS al 2 % solo. Los cultivos se incubaron a 37 °C en el incubador de CO₂ durante 0.5, 1 o 2 horas, tiempo después del cual se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo MTS. Para los cultivos de astrocitos, los péptidos se añadieron a los pocillos del cultivo (formato de placa de 96 pocillos) retirando el medio y añadiendo 100 µl de DMEM/FCS al 2 % que contenía el péptido. Los cultivos control recibieron 100 µl de DMEM/FCS al 2 % solo. Los cultivos se incubaron a 37 °C en el incubador de CO₂ durante 24 horas, tiempo después del cual se evaluó la viabilidad celular usando el ensayo MTS.

Evaluación de la viabilidad celular y análisis estadístico

Veinticuatro horas después de la agresión, los cultivos neuronales se examinaron por microscopía óptica para la evaluación cualitativa de la viabilidad de las células neuronales. La viabilidad neuronal se midió cuantitativamente por el ensayo de la sal 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) (Promega, Australia). El ensayo de MTS mide la conversión celular de la sal de tetrazolio a una sal de formazán marrón soluble en agua, que se detecta espectrofotométricamente a 490nm. Los datos de absorbancia de MTS se convirtieron para reflejar la viabilidad celular proporcionalmente respecto tanto a los controles no tratados como tratados, con el control no tratado tomado como el 100 % de viabilidad, y presentados como media ± SEM. Para los estudios usando astrocitos, células bEND3, y SH-Y5Y, los datos brutos de MTS se usaron para generar gráficos. Los datos de viabilidad se analizaron por ANOVA, seguido de ensayo post-hoc de Fischer PLSD, considerando los valores P <0.05 como estadísticamente significativos. Se usaron cuatro a seis pocillos en todos los ensayos.

Modelos de isquemia cerebral focal permanente en la rata - grupos y tratamientos experimentales

Todos los tratamientos se aleatorizaron y administraron de una manera ciega. La administración de la disolución de tratamiento del péptido (DR9: rrrrrrrr-NH₂; R12, R15, R18, sulfato de protamina; protamina) o vehículo (disolución salina: NaCl al 0.9%) se realizó a los 30 min después de MCAO. El tratamiento con los péptidos comprendió DR9 en disolución salina (600 µl) para proporcionar una dosis de carga intravenosa de 1 µmol/kg o 1000 nmoles/kg proporcionada durante 5-6 min a través de la vena yugular derecha.

Modelo de isquemia cerebral focal permanente en la rata

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la University of Western Australia. Se mantuvieron ratas macho Sprague Dawley que pesaban 270 g a 350 g en condiciones controladas de estabulación con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad con acceso libre a alimento y agua. Los animales experimentales ayunaron toda la noche y se sometieron a oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) permanente como sigue.

Se indujo la anestesia con isoflurano al 4 % y una mezcla 2:1 de N₂O y O₂ mediante una máscara. La anestesia se mantuvo con isoflurano al 1.7 - 2 %. El flujo sanguíneo cerebral (CBF) se monitorizó continuamente usando flujometría láser Doppler (Blood FlowMeter, AD Instruments, Sydney, Australia). La sonda se localizó 1 mm caudal y 4 mm lateral (derecha) respecto al bregma. Se insertó una cánula en la arteria femoral derecha para monitorizar continuamente la presión sanguínea y para proporcionar muestras para las lecturas de glucosa sanguínea y gas en sangre. La glucosa sanguínea se midió usando un glucómetro (MediSense Products, Abbott Laboratories, Bedford, MA, EE.UU.) y los gases en sangre se midieron usando un analizador de gas en sangre (ABL5, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). La presión sanguínea se mantuvo a 80-100 mmHg. Durante la cirugía, la temperatura rectal se mantuvo a 37 ± 0.5 °C y se aplicó calor con un calefactor ventilador cuando fue necesario. Para las infusiones intravenosas, se ató en posición una longitud de línea PVC cebada con disolución salina heparinizada en la vena yugular derecha, después se externalizó a través de una incisión dorsal escapular media a un sistema anclaje/giratorio (Instech Laboratories, Filadelfia, EE.UU.) diseñado para permitir movimiento libre.

La arteria carótida común (CCA) derecha se expuso a través de una incisión en el cuello ventral. La arteria carótida externa (ECA) se aisló después de cauterización de las arterias tiroideas superior y occipital. La sección aislada de la ECA se ligó y cauterizó para crear un muñón. El cuerpo carótido se retiró y la arteria pterigopalatina se ligó. Se insertó un microfilamento de nilón 4-0 con una punta de silicona con un diámetro de 0.39 mm (Doccol, Redlands, CA, EE.UU.) a través del muñón de la ECA en la CCA y se hizo avanzar rostralmente en la arteria carótida interna (ICA) hasta que la flujometría láser Doppler registró una disminución >30 % desde la línea base del flujo sanguíneo cerebral. El monofilamento se aseguró en dos lugares (en la base del muñón de la ECA y en la ICA) para el resto del experimento. Se proporcionó a los animales analgesia posoperatoria que consistió en petidina (3 mg/kg intramuscular) y bupivacaína (1.5 mg/kg subcutáneamente) en los sitios de incisión de la cabeza y pierna.

Se dejó que después de la cirugía los animales se recuperaran en una cámara con clima controlado y su temperatura corporal central se monitorizó y mantuvo a 37 ± 0.5 °C mediante un ventilador de enfriamiento/calentamiento cuando se requirió durante 3 - 4 horas.

Procesamiento de los tejidos y medición del volumen del infarto

Los animales se sacrificaron 24 horas después de MCAO con inyecciones intraperitoneales de pentobarbitona de sodio (900 mg/kg). Después de la eutanasia, el cerebro se retiró y se puso en un contenedor estéril de NaCl al 0.9 % y se puso entonces en un congelador a -80 °C durante 7 minutos. Se hicieron cortes coronales del cerebro desde la unión del cerebelo y el cerebro hasta 12 mm rostral respecto a este punto en cortes con un grosor de 2 mm. Los cortes se tiñeron inmediatamente con cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio al 1 % (TTC, Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) a 37 °C durante 20 minutos, seguido de fijación en formalina al 4 % a temperatura ambiente durante al menos 18 - 24 horas antes de la medición del volumen del infarto. Los cortes se escanearon y las imágenes se analizaron por un operador ciego al estado del tratamiento usando ImageJ 3ª edición (NIH, EE.UU.). El volumen total del infarto se determinó sumando las áreas del tejido infartado de ambos lados de las secciones de 2 mm. Estas áreas medidas se multiplicaron por la mitad del grosor de los cortes (1 mm), y se corrigió para edema cerebral multiplicando la relación de áreas de hemisfera afectadas a normales.

Análisis estadístico

Para las mediciones del volumen del infarto, el grupo de tratamiento con los péptidos se comparó con el grupo de control de vehículo por un ensayo de la t de student (ensayo de R9D) o ANOVA, seguido de ensayo post-hoc de Fischer PLSD (ensayo de R12, R15, R18 y Ptm).

Ejemplo experimental 1

Neuroprotección después de exposición a ácido glutámico

Los CPP comparativos TAT-D, R9, y penetratina proporcionaron una neuroprotección significativa de una manera de respuesta a la dosis (Fig. 1a, Tabla 3). La evaluación visual de los cultivos después de la lesión también confirmó el efecto neuroprotector que varió de ≈ 5 % para los cultivos expuestos a ácido glutámico no tratados al 100 % de supervivencia para los cultivos tratados con R9. R9 fue el péptido más potente con un valor de CI50 de 0.78 μ M, seguido de penetratina (CI50: 3.4 μ M) y TAT-D (CI50: 13.9 μ M). El péptido Pep-1 fue inefectivo. Los bloqueantes de los receptores de glutamato y los péptidos control (JNKI-1D-TAT, PYC36L-TAT) también fueron altamente efectivos en este modelo (Fig. 1a).

Además, el péptido comparativo TAT-D presentó un nivel de neuroprotección similar al péptido TAT-L (Fig. 1b). Cuando los CPP se retiraron por lavado antes de la exposición a ácido glutámico, solo el R9 comparativo (en este experimento) presentó un alto nivel de neuroprotección (Fig. 1c).

Los péptidos R9 y R12 también fueron altamente efectivos cuando se añadieron inmediatamente después de la exposición a ácido glutámico, y el R9 comparativo fue moderadamente efectivo cuando se añadió a los 15 minutos después de la agresión. Por el contrario, los péptidos comparativos JNKI-1D-TAT y NR29c (también referido como TAT-NR2B9c) no incrementaron significativamente la supervivencia neuronal cuando se añadieron inmediatamente después, o a los 15 minutos después de la exposición a glutamato (Fig 1d).

Las Figuras 1e-j proporcionan datos adicionales de eficacia en el modelo de glutamato para los péptidos comparativos R1, R3, R6, R9, R9/E9 (también referido como E9/R9), R9/tPA/R9 (también referido como R9/X7/R9) péptidos R12, R15, R18 de la presente invención, así como los péptidos control JNKI-1D-TAT y NR29c.

En los estudios de respuesta a la dosis usando R1, R3, R6, R7, R8, R9, R12, R15 y R18 en el modelo de glutamato revelaron que: i) los R1, R3, R6 y R7 comparativos presentaron una neuroprotección de nula a pequeña; ii) el R8 comparativo presentó neuroprotección a 5 μ M, (iii) el orden de la potencia para los demás péptidos fue R15 > R18 > R12 > R9 comparativo; y iv) la eficacia neuroprotectora para R15 y R18 se redujo a la mayor concentración (5 μ M); véase la Tabla 4, Fig 1e, 1f, 1g, 6, 7, y 8.

En un estudio de respuesta a la dosis usando el R9 comparativo, DAHK (últimos cuatro aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína albúmina) PTD4 (péptido TAT modificado con una capacidad de penetración en células incrementada 33x; (Ho et al, 2001), R9/E9 (Arg-9/Glu-9; péptido neutro) y R9/tPA/R9 (sitio de escisión peptídico de la enzima del activador de plasminógeno tisular flanqueado por R9) en el modelo de glutamato revelaron que: i) PTD4 y R9/E9 presentaron una neuroprotección de nula a pequeña; DAHK tuvo un nivel de neuroprotección bajo; y ii) R9/tPA/R9 tuvieron una potencia entre R12 y R18. También, el péptido TAT-NR29C (péptido de la subunidad del receptor NR2B NMDRA C-terminal; bloquea la señalización de NMDAR con la proteína PSD-95 para bloquear la producción de NO (óxido nítrico); Aarts et al 2002) fue inefectivo. Véase la Tabla 4 y las Fig 1d, g, h.

El péptido R12 fue más efectivo que el R9 comparativo (sobre la base de la neuroprotección a una concentración de 0.625 μ M) y ambos fueron más efectivos comparado con PCY-36-TAT comparativo, en el modelo de ácido glutámico, mientras el NR29c comparativo fue inefectivo (Fig 1g). El péptido R12 fue más efectivo que R9 (sobre la base de la neuroprotección a concentraciones 0.5 μ M y 1 μ M, mientras los R1, R3, R6 y NR29c comparativos fueron inefectivos (Fig 1i). El péptido R9 sintetizado por dos empresas diferentes también tuvo una eficacia similar en el

modelo de glutamato (Fig 1j).

El péptido comparativo R9, y los péptidos R12, R15 y R18 de la invención, fueron efectivos cuando se añadieron a cultivos neuronales solo durante la agresión de 5 minutos de ácido glutámico (Fig 28), o se retiraron de los cultivos antes de la agresión después de una preexposición de 10 minutos (Fig 29).

- 5 Los péptidos R12 y R15 fueron efectivos cuando se añadieron a los cultivos neuronales durante 10 minutos, 1 a 4 horas antes de la agresión de ácido glutámico (Fig 30).

Los péptidos comparativos PTD4 muestran un bajo nivel de neuroprotección, y el péptido comparativo E9/R9 no muestra protección en el modelo de ácido glutámico (Fig. 33), mientras los péptidos comparativos ricos en arginina XIP y NCXBP3 muestran altos niveles de neuroprotección (Fig. 34, 35). El péptido comparativo polilisina-10 (K10) y los péptidos TAT-NR2B9c muestran un bajo nivel de neuroprotección en los modelos de ácido glutámico (Fig. 36) y NMDA (Fig. 37), respectivamente. Los R8 y R9 comparativos fusionados con el sitio de escisión de calpaína (Cal/R9) muestran un nivel de neuroprotección moderado a alto en ácido glutámico (Fig. 38). Las Figuras 39 y 40 muestran que la molécula cargada negativamente heparina bloquea las acciones neuroprotectoras de R9D, R12, R15, y PYC36-TAT, pero no de los bloqueantes de los receptores de glutamato (K801 5 μ M /CNQX 5 μ M) en el modelo de ácido glutámico. La Figura comparativa 41 muestra que el péptido JNKI-1 cuando se fusiona con el CPP kFGF (sin arginina), que no se basa en la endocitosis para la captación, no fue neuroprotector en el modelo de ácido glutámico; el péptido kFGF también fue inefectivo. Por el contrario, los TAT-JNKI-1 y JNKI-1-TATD comparativos fueron neuroprotectores. La Figura 44 muestra que los péptidos R9D, R12, R15, y PYC36-TAT, TAT, TAT-NR2B9c, TAT-JNKI-1 y JNKI-1-TATD y los bloqueantes de los receptores de glutamato (K801 5 μ M/ CNQX 5 μ M) redujeron en varios grados el influjo de calcio en los cultivos neuronales después del tratamiento con ácido glutámico.

Ejemplo experimental 2

Neuroprotección después de exposición a ácido kaínico

Después de la exposición a ácido kaínico, el TAT-D comparativo, R9 y penetratina fueron neuroprotectores, pero menos efectivos que en el modelo de ácido glutámico, y no presentaron siempre un patrón de respuesta a la dosis típico (Fig. 2, Tabla 2). Pep-1 fue inefectivo. R9 fue el péptido más potente, incrementando la supervivencia neuronal desde $\approx$ 20 % hasta un máximo de $\approx$ 80 %. Los valores de CI50 respectivos para R9, penetratina, y TAT-D fueron 0.81, 2.0 y 6.2 μ M. Los bloqueantes de los receptores de glutamato, JNKI-1D-TAT y PYC36L-TAT también fueron efectivos en este modelo (Fig. 2).

Ejemplo experimental 3

- 30 Neuroprotección después de isquemia/privación de oxígeno glucosa (OGD) *in vitro*

Después de la isquemia *in vitro*, los cuatro CPP presentaron efectos neuroprotectores (Fig. 3, Tabla 2). La neuroprotección con Arg-9 comparativo (CI50: 6.0 μ M) y TAT-D comparativo (CI50: 7.1 μ M) fue similar; la eficacia siguió un patrón de respuesta a la dosis y supervivencia neuronal incrementada de $\approx$ 10 % a 40 - 50 %. La eficacia neuroprotectora se perdió con concentraciones crecientes de la penetratina comparativa ($\geq$ 5 μ M), mientras el Pep-1 comparativo solo fue neuroprotector a concentraciones más bajas (1 - 5 μ M). Los bloqueantes de los receptores de glutamato y PYC36L-TAT también fueron efectivos en este modelo (Fig. comparativa 3a).

Además, cuando se añadieron después de la isquemia *in vitro*, el R9 comparativo, y R12, R15 y R18 de la invención presentaron efectos neuroprotectores, sin embargo, concentraciones más altas de R15 y R18 redujeron la eficacia (Fig 3b).

- 40 R9 también redujo la muerte de las células bEND3 y SH-5YSY cuando se expusieron a isquemia *in vitro* (Fig 3c). R18 también redujo la muerte de células de astrocitos cuando se expusieron a isquemia *in vitro* (Fig. 42).

La Fig. 6 muestra un estudio de respuesta a la dosis usando R9, R10, R11, R12, R13 y R14 en el modelo de glutamato, que reveló que todos los péptidos presentaron una neuroprotección significativa entre 1 y 5 μ M, excepto R11 que presentó una neuroprotección significativa a 2 y 5 μ M. Media $\pm$ SEM: N =4; * P<0.05. (Concentración del péptido en μ M).

La Fig. 7 muestra un estudio de respuesta a la dosis usando R9D, R13, R14 y R15 en el modelo de glutamato, que reveló que todos los péptidos presentaron neuroprotección entre 1 y 5 μ M. Media $\pm$ SEM: N =4; * P<0.05. (Concentración del péptido en μ M).

- 50 Como se muestra en la Figura comparativa 8, en un estudio de respuesta a la dosis usando R6, R7, R8, y R9 en el modelo de glutamato, se reveló que los péptidos R8 y R9 presentaron una neuroprotección significativa a concentraciones de 5 μ M y 1 μ M y 5 μ M, respectivamente, mientras R6 y R7 no presentaron una neuroprotección significativa. Media $\pm$ SEM: N =4; * P<0.05. (Concentración del péptido en μ M). La Figura 31 muestra un estudio de respuesta a la dosis usando R9, R12, R15 y R18 cuando los péptidos se añadieron durante 15 minutos después de

OGD. R12, R15 y R18 presentaron neuroprotección, pero no R9 a 1 μM y 5 μM .

Los péptidos R12 y R18 fueron efectivos cuando se añadieron a los cultivos neuronales durante 10 minutos, 1 a 3 horas antes de OGD (Fig 32).

Tabla Comparativa 3: valores de CI50 de péptidos penetrantes de células y control para los tres modelos de lesión

5

Péptido	SEQ ID NO.	CI50: modelo del ácido glutámico (μM)	CI50: modelo del ácido kaínico (μM)	CI50: modelo de isquemia <i>in vitro</i> (μM)
Arg-9 (R9)	6	0.78	0.81	6.0
TAT-D	20	13.9	6.2	7.1
Penetratina	22	3.4	2.0	N/A
Pep-1	23	N/A	N/A	>15
PYC36L-TAT#	24	1.5	-	-
JNKI-1 D-TAT#	25	2.1	6.5	-
* Sobre la base de los gráficos de respuesta a la dosis mostrados en la Fig 1a, Fig 2 y Fig 3a. # Valores de CI50 para los péptidos JNKI-1D-TAT y PYC36L-TAT de Meade <i>et al.</i> (2010a,b). N/A = no aplicable porque los péptidos fueron bien inefectivos o incrementaron la muerte celular a dosis más altas. - = datos no disponibles.				

Tabla 4: valores de CI50 de péptidos de poliarginina para los modelos de ácido glutámico*

Péptido	SEQ ID NO.	CI50: modelo del ácido glutámico (μM)	Intervalos de confianza del 95% (μM)
Arg-1 (R1)	1	>5 μM	N/A
Arg-3 (R3)	2	>5 μM	N/A
Arg-6 (R6)	3	>5 μM	N/A
Arg-9 (R9)	6	0.83	0.16 - 4.1
Arg-12 (R12)	9	0.44	0.16 - 1.2
Arg-15 (R15)	12	0.19	0.06 - 0.6
Arg-18 (R18)	13	0.24	0.08 - 0.75
R9/tPA/R9	16	0.29	0.06 - 1.4
* Sobre la base del gráfico de respuesta a la dosis mostrado en la Fig 1e. N/A = no aplicable porque los péptidos			

Péptido	SEQ ID NO.	CI50: modelo del ácido glutámico (μM)	Intervalos de confianza del 95% (μM)
tuvieron un efecto nulo o pequeño a la concentración más alta ensayada (5 μM).			

Ejemplo experimental 4

Ensayo con animales

En un ensayo inicial con animales que se llevó a cabo, se mostró que Arg-9 (R9), R18 y protamina (Ptm) poseían una actividad neuroprotectora *in vivo*. Estos ensayos mostraron la eficacia del péptido R9D en el modelo de apoplejía por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) permanente. El péptido R9D se administró intravenosamente 30 min después de MCAO. El volumen de infarto (lesión cerebral) se midió 24h después de MCAO (media ± SEM). Esto se muestra en la Figura comparativa 5 y Figura 27 donde puede observarse que (Ns = 8-12 animales para cada grupo) el tratamiento con R9D, R18 y protamina (Ptm) mostró un efecto neuroprotector significativo mediante la reducción del volumen del infarto (lesión cerebral) aproximadamente un 20 % después de una apoplejía MCAO.

Observaciones generales y discusión

El Solicitante evaluó TAT como un ejemplo neuroprotector conocido y tres otros CPP comparativos (penetratina, R9, y Pep-1) para determinar sus propiedades neuroprotectoras en cultivos neuronales corticales después de la exposición a ácido glutámico, ácido kainico o isquemia *in vitro* (privación de oxígeno-glucosa).

Además, también se evaluaron péptidos de poliarginina (R9, R12, R15, R18) y/o péptido protamina rico en arginina en cultivos de astrocitos, una línea celular endotelial cerebral (bEND3), y/o una línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y) usando el modelo de isquemia *in vitro*.

El R9 comparativo, penetratina y TAT-D presentaron un nivel de actividad neuroprotectora consistente y alto tanto en los modelos de lesión por ácido glutámico (CI50: 0.78, 3.4, 13.9 μM) como ácido kaínico (CI50: 0.81, 2.0, 6.2 μM), mientras Pep-1 fue inefectivo.

La isoforma TAT-D presentó una eficacia similar a la isoforma TAT-L en el modelo de ácido glutámico. R9 presentó eficacia cuando se retiró por lavado antes de la exposición a ácido glutámico. Sin embargo, R9 fue significativamente más efectivo que los péptidos que previamente se había mostrado que eran neuroprotectores, es decir, TAT-D, TAT-L, PYC36L-TAT, y JNKI-1D-TAT.

La neuroprotección después de isquemia *in vitro* fue más variable, con todos los péptidos proporcionando algún nivel de neuroprotección (CI50; R9: 6.0 μM, TAT-D: 7.1 μM, penetratina/Pep-1: >10 μM). Los péptidos de control positivo JNKI-1D-TAT (péptido inhibidor de JNK) y/o PYC36L-TAT (péptido inhibidor de AP-1) fueron neuroprotectores en todos los modelos.

En un experimento de tratamiento posterior al ácido glutámico, R9 fue altamente efectivo cuando se añadió inmediatamente después, y levemente efectivo cuando se añadió 15 minutos después de la agresión, mientras el péptido control JNKI-1D-TAT fue inefectivo cuando se añadió después de la agresión.

En un ensayo inicial con animales que se llevó a cabo, se mostró que R9, R12, R18, y protamina poseían una actividad neuroprotectora *in vivo*.

En un estudio de respuesta a la dosis usando R1, R3, R6, R9, R12, R15 y R18 en el modelo de glutamato se reveló que: i) R1, R3, R6 y R7 presentaron una neuroprotección de nula a pequeña; ii) el orden de la potencia para los demás péptidos fue R15 > R18 > R12 > R9; y iii) la eficacia neuroprotectora para R15 y R18 se redujo a la mayor concentración ensayada (5 μM).

En un estudio de respuesta a la dosis usando R9, DAHK (últimos cuatro aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína albúmina) PTD4 (péptido TAT modificado con una capacidad de penetración en células incrementada 33x; Ho et al, 2001), R9E9 (R9/Glu-9; péptido neutro) y R9/tPA/R9 (sitio de escisión peptídico de la enzima del activador de plasminógeno tisular flanqueado por R9) en el modelo de glutamato revelaron que: i) PTD4 y R9/E9 presentaron una neuroprotección de nula a pequeña; DAHK tuvo un nivel de neuroprotección bajo; y ii) R9/tPA/R9 tuvieron una potencia entre R12 y R18. También, el péptido TAT-NR2B9C (péptido de la subunidad del receptor NR2B NMDRA C-terminal bloquea la señalización de NMDAR con la proteína PSD-95 para bloquear la producción de NO; Aarts et al., 2002). Los péptidos de poliarginina y ricos en arginina (protamina) también pudieron reducir la muerte de células de astrocitos, bEND3, y SH-SY5Y después de la isquemia *in vitro*.

Estos descubrimientos demuestran que los péptidos de la invención tienen la capacidad de inhibir los eventos/rutas

neurodañinos asociados con lesiones excitotóxicas e isquémicas. Los péptidos de poliarginina con ≥ 9 residuos del aminoácido arginina son particularmente neuroprotectores. La presente invención se refiere a péptidos de poliarginina con una longitud de 12 a 32 residuos de aminoácidos.

5 Las propiedades citoprotectoras de los péptidos de la invención sugieren que son moléculas vehiculares ideales para administrar fármacos neuroprotectores al SNC después de la lesión y/o para servir como neuroprotectores potenciales en sí mismos.

10 Los péptidos de la invención presentan así propiedades neuroprotectoras en diferentes modelos de lesión *in vitro* que se ha mostrado que se pueden trasladar a modelos *in vivo*. Esto se ve apoyado adicionalmente por el efecto neuroprotector mostrado en los ensayos iniciales con animales que se llevaron a cabo. La acción neuroprotectora superior de R9 comparativo fue sorprendente; sobre la base de los valores de CI50, R9 fue 17 y 7 veces más potente que TAT-D en los modelos de ácido glutámico y ácido kaínico, respectivamente, y fue el único péptido efectivo incluso cuando se retiró por lavado antes de la exposición a ácido glutámico. Este descubrimiento sugiere que los residuos de arginina incrementados y/o la carga neta ligeramente mayor (10 frente a 9 a pH 7) de R9 son factores importantes para la neuroprotección después de la excitotoxicidad. Además, aunque no está clara la razón exacta de la pérdida de eficacia de TAT y penetratina, pero no de R9 después de la retirada por lavado antes de la exposición a ácido glutámico, puede estar relacionada con la velocidad de captación intracelular de R9, en lugar de con un mecanismo extracelular. Esto se ve apoyado por el descubrimiento de que R9 fue efectivo cuando se añadió después de la exposición a ácido glutámico, mientras que el péptido JNKI-1D-TAT fue inefectivo.

20 Además, cuando el o los péptidos de arginina y poliarginina R1, R3, R6, R9, R12, R15 y R18 se evaluaron en el modelo de lesión de ácido glutámico solo el péptido comparativo R9 y los péptidos R12, R15 y R18 mostraron una neuroprotección significativa a las dosis ensayadas; R15 pareció ser el péptido más potente. Un péptido comparativo híbrido de R9 (R9/tPA/R9) que contenía el sitio de conector de escisión tPA también fue altamente efectivo en el modelo de ácido glutámico. R9 también fue más efectivo que R12 cuando se añadió después de la exposición a ácido glutámico. De forma interesante, PTA4 (péptido TAT modificado con una eficacia en la transducción mejorada 33x cuando se compara con TAT regular; Ho et al, 2001), el híbrido R9/E9 y el NR29c (un péptido fusionado con TAT que bloquea la producción de NO inducida por el receptor de NMDA/glutamato) y DAHK (últimos cuatro aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína albúmina) fueron muy inefectivos después de la exposición a ácido glutámico.

30 El péptido comparativo R9 y los péptidos R12, R15 y R18 también fueron efectivos en el modelo de isquemia *in vitro* cuando se añadieron después de la incubación anaeróbica (es decir, durante la fase de reperfusión de la lesión). R9 también fue capaz de proteger a las células endoteliales cerebrales (células bEND3) y las células de neuroblastoma (células SH-5YSY) después de isquemia *in vitro*.

35 Como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria, un resultado del estudio fue la demostración de que la penetratina comparativa y Pep-1 también presentaron propiedades neuroprotectoras. Los péptidos penetratina y Pep-1 no portan secuencias de aminoácidos relacionadas entre sí, o con los péptidos TAT/R9. De forma interesante, la penetratina fue altamente neuroprotectora en los modelos de excitotoxicidad (CI50: 3.4 y 2 μ M), pero fue menos efectiva en el modelo de isquemia *in vitro*, con concentraciones crecientes reduciendo la eficacia. El péptido Pep-1 fue generalmente inefectivo en los modelos de excitotoxicidad y, en algunos experimentos, pareció incrementar la muerte neuronal (datos no mostrados), pero fue neuroprotector después de la isquemia *in vitro* a concentraciones más bajas. De forma interesante, cuando la penetratina se retiró por lavado de los cultivos neuronales antes de la exposición a ácido glutámico, las observaciones visuales revelaron que el péptido presentó algunos efectos neuroprotectores tempranos (datos no mostrados). Por lo tanto, tanto la penetratina como Pep-1 se comportaron de forma diferente entre sí y con los péptidos TAT/R9 en los modelos de lesión.

45 Las respuestas neuroprotectoras diferenciales para los cuatro CPP en los modelos de lesión excitotóxica e isquémica están relacionadas, probablemente, con las propiedades físico-químicas de los péptidos, y más específicamente, con sus propiedades inductoras endocíticas. Además, es probable que la acción neuroprotectora de los CPP esté mediada en la membrana celular (p. ej., receptores, canales iónicos). Xu et al (2008), han sugerido que TAT puede alterar la membrana celular y de esta manera afectar la función de los receptores de la superficie celular, tal como el receptor de NMDA, lo que da lugar a un influjo de calcio reducido.

50 Se contempla, sin embargo, que el péptido o los péptidos de la invención pueden actuar bloqueando el funcionamiento del receptor de NMDA y/o bloqueando, regulando a la baja, o desacelerando el influjo de calcio. Un mecanismo alternativo es que los CPP interaccionen y estabilicen la membrana mitocondrial externa y de esta manera ayuden a conservar la función mitocondrial. Los beneficios potenciales son el mantenimiento de la síntesis de ATP, producción reducida de las especies de oxígeno reactivas, y manejo de calcio mejorado. Para este fin, el Solicitante ha observado que el Arg-9 comparativo puede incrementar los niveles de absorbancia de MTS por encima de los niveles de la línea base en neuronas normales y después de lesión (p. ej., Fig. 1A, 15 μ M). Como la reducción de MTS a su producto formazán ocurre principalmente en las mitocondrias, la capacidad de Arg-9 de incrementar los niveles de formazán apoya que el péptido está mejorando la función mitocondrial. Otro mecanismo

potencial especialmente en relación con R9 y TAT, es que estos péptidos ricos en arginina estén inhibiendo la enzima proproteína convertasa dependiente de calcio, furina (Kacprzak et al. 2004), y de esta manera estén bloqueando la activación de proteínas potencialmente dañinas.

La invención demuestra que el CPP rico en aminoácidos catiónicos, particularmente los CPP ricos en arginina o péptidos vehiculares (p. ej., R12, R15, protamina), presentan un alto nivel de neuroprotección, a diferencia de los CPP en general. Esto hace que surja la posibilidad de que el mecanismo de acción de un péptido neuroprotector fusionado con un CPP es en gran medida, si no exclusivamente, el resultado de un efecto neuroprotector aumentado del péptido vehicular. Además, el mecanismo por el que los CPP ricos en arginina ejercen su acción neuroprotectora puede estar ligado a la endocitosis, una ruta de captación celular predominante de péptidos vehiculares, en lugar de a una interacción con una diana citoplásmica específica. Por el contrario, un péptido neuroprotector fusionado con un péptido vehicular que entra en una célula por endocitosis debe escapar en primer lugar del endosoma, que se sabe que es un proceso altamente ineficiente (Al-Taei et al., 2006; El-Sayed et al., 2009; Appelbaum et al., 2012; Qian et al., 2014), antes de que pueda interactuar con su diana citoplásmica, siendo así altamente improbable que el péptido pueda actuar a través de la interacción con su diana pretendida.

Con respecto a la entrada intracelular de los CPP, se considera que el mecanismo predominante es la endocitosis (macropinocitosis) (Palm-Apergi et al. 2012). Aunque menos relevante para la presente invención, un reporte reciente ha demostrado que las propiedades de carga también pueden estimular un mecanismo de entrada directa en la célula por determinados CPP (Hirose et al. 2012). Sin embargo, lo que es potencialmente altamente relevante es cómo cargas, péptidos u otros específicos, pueden afectar a los CPP mediante el aumento de su acción neuroprotectora, mejorando la eficiencia de la traslocación y/o como demuestran Cardozo et al (2007) incrementando su toxicidad. Esto es especialmente importante cuando la carga en sí mismo es neuroprotectora, porque como se ha mencionado anteriormente, esto hace que sea muy difícil discernir entre el efecto neuroprotector del CPP y la carga. Por ejemplo, en un estudio previo (Meade et al. 2010a), la adición de tres residuos de aminoácidos (Pro, Lys, Ile) del péptido PYC36 al péptido TAT-D (AM8D-TAT) produjo valores de CI50 que disminuyeron de >15 μ M para TAT-D a 1.1 μ M para AM8D-TAT en el modelo de ácido glutámico.

No siempre se ha observado un efecto positivo con el péptido control comparativo TAT. Existen varias posibles explicaciones y para abordar esta cuestión: es necesario en primer lugar diferenciar los estudios que usan el péptido TAT solo (es decir, GRKKRRQRRRG), de los estudios que usan TAT fusionado con una proteína informadora (p. ej., GFP, β -gal) o péptido (p. ej., HA y/o etiqueta 6X HIS, péptido desorganizado) como un control. Con respecto a los estudios que han usado el péptido TAT por sí mismo como un control, es posible que TAT fuera inefectivo a la dosis usada y/o el modelo de lesión fuera demasiado grave como para descubrir un efecto neuroprotector. Por ejemplo, Boresello et al. (2003) no detectaron un efecto neuroprotector con el péptido TAT después de una exposición de 12, 24 o 48 horas de cultivos neuronales corticales a NMDA 100 μ M. Por el contrario, el péptido L-JNKI-1 fue efectivo a las 12 y 24 horas, mientras el péptido resistente a proteasas D-JNKI-1 fue efectivo en todos los puntos de tiempo. Dada la eficacia superior de los péptidos JNKI-1 comparado con el péptido TAT, es posible que, a la concentración ensayada, TAT no fuera neuroprotector o que cualesquiera efectos neuroprotectores fueran pasados por alto debido a la gravedad de la agresión de NMDA. En un estudio por Ashpole y Hudmon (2011), se observó un efecto protector modesto con el péptido TAT en cultivos neuronales corticales después de la exposición a ácido glutámico. Además, los autores concluyeron que como el péptido TAT proporcionó poca protección, la neuroprotección observada para su péptido inhibidor CAMKII no era debida a la "secuencia de importación" (es decir, TAT). Sin embargo, no puede descartarse que el péptido inhibidor CAMKII incrementara la potencia del péptido TAT. Por último, es posible que el péptido TAT solo sea neuroprotector en modelos de lesión y tipos de células específicos.

En estudios que usan TAT fusionado con una proteína informadora o péptido control, además de los puntos indicados anteriormente, también es probable que la proteína/péptido control pueda actuar para disminuir o anular las propiedades neuroprotectoras del péptido TAT. Sobre la base de muchos estudios que han usado proteínas/péptidos fusionados con TAT como controles y no mostraron efectos neuroprotectores, este podría ser el caso (p. ej., Kilic et al. 2003; Doeppner et al. 2009). Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que el mero hecho de que una proteína sea un CPP no significa necesariamente que será neuroprotector, lo que se confirma por el hecho de que el péptido PTD-4 (un péptido TAT modificado con una eficiencia de transducción 33x mejor que TAT en sí mismo; Ho et al, 2001) tiene propiedades neuroprotectoras pequeñas a nulas.

Tabla Comparativa 5: secuencias de aminoácidos de diferentes péptidos de protamina (salmón); residuos de aminoácidos/residuos de arginina y pesos moleculares.

SEQ ID NO.:	Nombre de la secuencia	Tipo	Otra información	Secuencia	residuos de aa/arg	PM (da)
-------------	------------------------	------	------------------	-----------	--------------------	---------

SEQ ID NO.:	Nombre de la secuencia	Tipo	Otra información	Secuencia	residuos de aa/arg	PM (da)
-	Mezcla de sulfato de protamina; Ptm	Mezcla de polipéptidos	Forma inyectable/I V	Protamina 1 - Protamina 4 ¹	32/21	≈4,500
32	Protamina 1; Ptm1	Polipéptido	Pico 1 HPLC ^a	PRRRRRSSSRPIRRRRR PRASRRRRRGGRRRR	32/21	4,236
33	Protamina 2; Ptm2	Polipéptido	Pico 2 HPLC ^a	PRRRRSSRRPVRRRRR PRVSRRRRRGGRRRR	31/21	4,163
34	Protamina 3; Ptm3	Polipéptido	Pico 3 HPLC ^a	PRRRRSSSRPVRRRRR PRVSRRRRRGGRRRR	31/20	4,094
35	Protamina 4; Ptm4	Polipéptido	Pico 4 HPLC ^a	PRRRRASRRIRRRRRRPR VSRRRRRGGRRRR	30/21	4,064
36	Protamina 5; Ptm5	Polipéptido	SwissProt ^c	PRRRRSSSRPVRRRRR PRVSRRRRRGGRRRR	32/21	4,250
37	Protamina de bajo peso molecular (LMWP)	Polipéptido	Derivado de protamina ^b	VSRRRRRRGGRRRR	14/10	1,880
38	Secuencia de nucleótidos de la protamina 5	Ptm 5, secuencia codificadora de ADN	SwissProt ^c	5'ATGCCCAGAAGACGC AGATCCTCCAGCCGAC CTGTCCGCAGGCGCCG CCGCCCTAGGGTGTCC CGACGTCGTCGCAGGA GAGGAGGCCGCAGGA GGCGT-3'	N/A	N/A

(Secuencias de péptido de protamina (salmón) presentes en sulfato de protamina para uso clínico o base de datos SwissProt. [a = Picos 1 - 4 identificados después de HPLC de sulfato de protamina¹; b = Secuencia en SwissProt (Swissprot:P14402). (1) Hoffmann JA1, Chance RE, Johnson MG. 1990. Purification and analysis of the major components of chum salmon protamine contained in insulin formulations using high-performance liquid chromatography. Protein Expr Purif. 1(2):127-33. (2) Chang LC, Lee HF, Yang Z, Yang VC. 2001. Low molecular weight protamine (LMWP) as nontoxic heparin/low molecular weight heparin antidote (I): preparation and characterization. PharmSci. 3(3): E17).

Ejemplo experimental comparativo 1

Neuroprotección después de exposición a ácido glutámico

El sulfato de protamina (protamina; Ptm) proporcionó una neuroprotección significativa de una manera de respuesta a la dosis (Fig. comparativas 9, 10, 12, 13, 15). La evaluación visual de los cultivos después de la lesión también confirmó el efecto neuroprotector que varió de ≈ 5 % para los cultivos expuestos a ácido glutámico no tratados al 85-100 % de supervivencia para los cultivos tratados con protamina. Además, una preexposición a protamina de 5 o 10 minutos también fue altamente neuroprotectora dando lugar al 100 % de supervivencia neuronal (Fig. 11). En los experimentos de respuesta a la dosis, los péptidos de protamina de bajo peso molecular (LMWP), protamina 1 (Ptm1), protamina 2 (Ptm2), protamina 3 (Ptm3), protamina 4 (Ptm4), protamina 5 (Ptm5), también fueron neuroprotectores (Fig. comparativas 12, 13, 15).

En los experimentos de preexposición a protamina y LMWP, la protamina fue neuroprotectora cuando las neuronas se expusieron a protamina inmediatamente antes y 1 o 2 horas antes de la agresión de ácido glutámico, mientras LMWP solo fue neuroprotectora cuando la exposición fue inmediatamente antes de la agresión de ácido glutámico (Fig. comparativa 14).

5 Ejemplo experimental comparativo 2

Neuroprotección después de privación de oxígeno-glucosa (OGD)

En el modelo de OGD, la protamina fue neuroprotectora cuando las neuronas se trataron con el péptido 1 hora antes de la agresión (Fig. comparativa 18) o después de la agresión (Fig. comparativa 16, 17). Además, cuando se añadió durante 15 o 30 minutos, después de OGD la protamina también fue neuroprotectora (Figs. comparativas 19, 20, 21, 22). LMWP no fue neuroprotectora cuando las neuronas se preexpusieron al péptido 1 hora antes de OGD, pero fue neuroprotectora cuando se añadió durante 15 minutos después de OGD. Además, cuando los péptidos de protamina (Ptm1 - Ptm5) y LMWP se añadieron durante 15 minutos después de OGD, los péptidos Ptm2, Ptm4, Ptm5 y LMWP fueron neuroprotectores (Fig. 22).

Ejemplo experimental comparativo 3

15 Protección de células bEND3 después de privación de oxígeno-glucosa (OGD)

En el modelo de OGD, la protamina y protamina 4 (ptm4) fueron neuroprotectoras para las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (bEND3) cuando se trataron con el péptido 15 minutos antes de OGD (Fig. comparativa 23, 24). Además, la exposición de bEND3 a protamina a concentraciones que variaron de 1.25 a 15 μ M durante entre 0.5 a 2 horas no causó ninguna toxicidad significativa sobre la base del ensayo MTS (Fig. comparativa 25, 26). La Figura 43 muestra que Ptm1 - Ptm5, y la protamina de bajo peso molecular (LMWP) a una concentración de 2.5 a 10 μ M no causaron muerte de células de astrocitos significativa después de una exposición de 24 horas.

Observaciones comparativas generales y discusión

El Solicitante evaluó el sulfato de protamina rico en arginina (protamina; Ptm), péptidos de protamina 1 - 5 (Ptm1 - Ptm5, SEQ. ID. Nos. 32 a 36, respectivamente), y protamina de bajo peso molecular (LMWP, SEQ. ID. NO. 37) para determinar sus propiedades neuroprotectoras en cultivos neuronales corticales después de una exposición a ácido glutámico o isquemia *in vitro* (privación de oxígeno-glucosa - OGD). Ambos modelos de lesión se usan comúnmente para mimetizar los efectos de la apoplejía isquémica.

El Solicitante también evaluó el uso de péptidos de protamina en la protección de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (bEND3) frente a OGD.

La protamina presentó un nivel de actividad neuroprotectora consistente y alto en ambos modelos de lesión, ácido glutámico y OGD, mientras la protamina también proporcionó protección en las células bEND3. LMWP fue ligeramente menos efectiva (sobre la base de las concentraciones de dosis para conseguir neuroprotección equivalente a la de la protamina) en los modelos de lesión neuronal de ácido glutámico y OGD. Esto se debe, lo más probablemente, a que el péptido LMWP contiene menos residuos de arginina. Los péptidos de protamina 1 - 5 (Ptm1 - Ptm5) también fueron altamente neuroprotectores en el modelo de ácido glutámico, mientras Ptm2, Ptm4 y Ptm5 fueron neuroprotectores en el modelo de OGD.

En un estudio de OGD usando células bEND3, una preexposición de 15 minutos con protamina incrementó significativamente la viabilidad celular y así la protección, después de diferentes duraciones de OGD (2h:15min, 2h:30min o 2h:45min). Además, una preexposición de 15 minutos con Ptm4 también incrementó significativamente la viabilidad celular y así la protección, en el modelo de OGD.

En un estudio de toxicidad en bEND3 usando protamina a concentraciones variadas, se reveló que la protamina no es tóxica incluso a concentraciones tan altas como 15 μ M.

Estos descubrimientos demuestran que los péptidos de protamina comparativos tienen la capacidad de inhibir los eventos/rutas neurodañinos asociados con lesiones excitotóxicas e isquémicas. También, debido a los efectos de la protamina en los estudios de preexposición, un nuevo descubrimiento clave fue que el tratamiento con protamina de neuronas 1 a 2 horas antes de la exposición a ácido glutámico o OGD puede inducir una respuesta neuroprotectora, mediante la reducción de la muerte celular. Esto es significativo porque existen varios procedimientos quirúrgicos cerebrovasculares (p. ej., endarterectomía carótida) y cardiovasculares (p. ej., injerto de bypass de arterias coronarias) donde existe un riesgo de que un paciente pueda padecer una isquemia cerebral o una apoplejía que da lugar a lesión cerebral. Por lo tanto, los péptidos de protamina pueden proporcionarse 1-2 horas antes de dicho procedimiento para proteger al cerebro frente a cualquiera de dichos eventos isquémicos cerebrales.

Las propiedades citoprotectoras de los péptidos de la invención sugieren que son fármacos neuroprotectores ideales para el tratamiento de lesiones en el SNC. Además, como también es probable que tengan propiedades penetrantes

de células [la protamina está aprobada por la FDA para administración de terapia génica (ADN, vectores virales; Sorgi et al, 1997) y LMWP se usa como un péptido penetrante de células; Park et al, 2005] son moléculas vehiculares ideales para administrar fármacos neuroprotectores al SNC después de lesión.

Los efectos neuroprotectores de los péptidos de la invención están relacionados probablemente con las propiedades físico-químicas de los péptidos. Además, puede ser perfectamente que la acción neuroprotectora de los péptidos de protamina ricos en arginina comparativos esté mediada en la membrana celular (p. ej., receptores, canales iónicos). Los estudios han sugerido que los péptidos ricos en arginina incluyendo TAT (Xu et al, 2008), R6 (Ferrer-Montiel et al 1988) y R9-CBD3 (Feldman y Khanna 2013) y TAT-CBD3 (Brustovetsky et al 2014) pueden afectar la función de los receptores de la superficie celular y los canales iónicos, tales como el receptor de NMDA, dando lugar a un influjo de calcio reducido. Se contempla, sin embargo, que el péptido o los péptidos de la invención pueden actuar bloqueando el funcionamiento del receptor de NMDA y/o bloqueando, regulando a la baja, o desacelerando el influjo de calcio. Un mecanismo alternativo es que los péptidos de protamina interaccionen y estabilicen la membrana mitocondrial externa y de esta manera ayuden a conservar la función mitocondrial. Los beneficios potenciales son el mantenimiento de la síntesis de ATP, producción reducida de las especies de oxígeno reactivas, y manejo de calcio mejorado. Para este fin, el Solicitante ha observado que la protamina comparativa puede incrementar los niveles de absorbancia de MTS por encima de los niveles de la línea base en neuronas normales y después de lesión (p. ej., Fig. 11, 12; 5 μ M). Como la reducción de MTS a su producto formazán ocurre principalmente en las mitocondrias, la capacidad de la protamina de incrementar los niveles de formazán apoya que el péptido está mejorando la función mitocondrial. Otro mecanismo potencial es que estos péptidos ricos en arginina estén inhibiendo la enzima proprotein convertasa dependiente de calcio, furina (Kacprzak et al. 2004), y de esta manera estén bloqueando la activación de proteínas potencialmente dañinas.

Con respecto a la entrada intracelular del péptido de protamina comparativo, se considera que el mecanismo predominante para los péptidos ricos en arginina es por endocitosis (macropinocitosis) (Palm-Apergi et al. 2012). Por lo tanto, es probable que, durante la endocitosis del péptido a través de la membrana plasmática, se produzca la internalización endosomal de estructuras de la superficie celular (véase la Fig. 46). En el entorno de la excitotoxicidad neuronal y la isquemia, la regulación a la baja de los canales iónicos sería beneficiosa ya que reduce el influjo normalmente neurodañino del calcio y otros iones.

El Solicitante tiene la opinión de que han identificado una nueva clase o grupo de péptidos que pueden servir como CPP, así como como péptidos neuroprotectores. El Solicitante ha encontrado que R12 a R32 de poliarginina poseen nuevas propiedades neuroprotectoras o neuroactivas. Existe evidencia de que los péptidos descritos en la presente memoria como parte de la invención poseen el mismo rango de propiedades neuroprotectoras o neuroactivas cuando se usan *in vivo* (Vaslin et al. 2009) y encuentran uso en el tratamiento de lesiones neurales.

El Solicitante ha encontrado así que los péptidos ricos en arginina y CPP no relacionados con TAT poseen nuevas propiedades neuroprotectoras, en particular, las secuencias de poliarginina con una longitud de entre 12 y 32 aminoácidos. Existe evidencia de que los CPP de la invención poseen el mismo rango de propiedades neuroprotectoras cuando se usan *in vivo* (Vaslin et al. 2009) y encuentran uso en el tratamiento de lesiones neurales.

REFERENCIAS

- Aarts M, Liu Y, Liu L, Besshoh S, Arundine M, Gurd JW, Wang YT, Salter MW, Tymianski M (2002) Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298:846-850.
- ARAMIS (2011) Número de proyecto: 8909.1. <http://www.aramis.admin.ch>.
- 5 Arthur PG, Matich GP, Pang WW, Yu DY, Bogoyevitch MA (2007) Necrotic death of neurons following an excitotoxic insult is prevented by a peptide inhibitor of c-jun N-terminal kinase. *J Neurochem* 102:65-76.
- Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* 9:1180-1186.
- 10 Brugidou J, Legrand C, Méry J, Rabié A (1995) The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system. *Biochem Biophys Res Commun* 214:685-693.
- Colombo A, Repici M, Pesaresi M, Santambrogio S, Forloni G, Borsello T (2007) The TAT-JNK inhibitor peptide interferes with beta amyloid protein stability. *Cell Death Differ* 14:1845-1848.
- 15 Craig AJ, Meloni BP, Watt PM, Knuckey NW (2011) Attenuation of neuronal death by peptide inhibitors of AP-1 activation in acute and delayed in vitro ischaemia (oxygen/glucose deprivation) models. *Int J Pept Res Ther* 17: 1-6.
- Doeppner TR, Nagel F, Dietz GPH, Weise J, Tönges L, Schwarting S, Bähr M (2009) TAT-HSP70-mediated neuroprotection and increased survival of neuronal precursor cells after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1187-1196.
- Dolgin E (2012) To serve and neuroprotect. *Nat Med* 18:1003-1006.
- 20 Frankel AD, Pabo CO (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189-1193.
- Green M, Loewenstein PM (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55:1179-1188.
- 25 Hirose H, Takeuchi T, Osakada H, Pujals S, Katayama S, Nakase I, Kobayashi S, Haraguchi T, Futaki S (2012) Transient focal membrane deformation induced by arginine-rich peptides leads to their direct penetration into cells. *Mol Ther* 20:984-993.
- Ho A, Schwarze SR, Mermelstein SJ, Waksman G, Dowdy SF (2001) Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61:474-477.
- 30 Kacprzak MM, Peinado JR, Than ME, Appel J, Henrich S, Lipkind G, Houghten RA, Bode W, Lindberg I (2004) Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine. *J Biol Chem* 279:36788-36794.
- Kilic Ü, Kilic E, Dietz GPH, Bähr M (2003) Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 34:1304-1310.
- 35 Lai Y, Du L, Dunsmore KE, Jenkins LW, Wong HR, Clark RS (2005) Selectively increasing inducible heat shock protein 70 via TAT-protein transduction protects neurons from nitrosative stress and excitotoxicity. *J Neurochem* 94:360-366.
- Liu X, M, Pei DS, Guan QH, Sun YF, Wang XT, Zhang QX, Zhang GY (2006) Neuroprotection of Tat-GluR6-9c against neuronal death induced by kainate in rat hippocampus via nuclear and non-nuclear pathways. *J Biol Chem* 281:17432-17445.
- 40 Meade AJ, Meloni BP, Mastaglia FL, Knuckey NW (2009) The application of cell penetrating peptides for the delivery of neuroprotective peptides/proteins in experimental cerebral ischemia studies. *J Exp Stroke Transl Med* 2:22-40.
- Meade AJ, Meloni BP, Mastaglia FL, Watt PM, Knuckey NW (2010a) AP-1 inhibitory peptides attenuate in vitro cortical neuronal cell death induced by kainic acid. *Brain Res* 1360:8-16.
- 45 Meade AJ, Meloni BP, Cross J, Bakker AJ, Fear MW, Mastaglia FL, Watt PM, Knuckey NW (2010b) AP-1 inhibitory peptides are neuroprotective following acute glutamate excitotoxicity in primary cortical neuronal cultures. *J Neurochem* 112:258-270.
- Meloni BP, Majda BT, Knuckey NW (2001) Establishment of neuronal in vitro models of ischemia in 96-well microtiter

strip-plates that result in acute, progressive and delayed neuronal death. *Neuroscience* 108:17-26.

Meloni BP, Meade AJ, Kitikomsuk D, Knuckey NW (2011) Characterisation of neuronal cell death in acute and delayed in vitro ischemia (oxygen/glucose deprivation) models. *J Neurosci Methods* 195:67-74.

Milletti F (2012) Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17:850-860.

- 5 Moschos SA, Jones SW, Perry MM, Williams AE, Erjefalt JS, Turner JJ, Barnes PJ, Sproat BS, Gait MJ, Lindsay MA (2007) Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug Chem* 18:1450-1459.

- 10 Nagel F, Falkenburger BH, Tönges L, Kowsky S, Pöppelmeyer C, Schulz JB, Bähr M, Dietz GP (2008) Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 105:853-864.

Nath A, Psooy K, Martin C, Knudsen B, Magnuson DS, Haughey N, Geiger JD (1996) Identification of a human immunodeficiency virus type 1 Tat epitope that is neuroexcitatory and neurotoxic. *J Virol* 70:1475-1480.

Palm-Apergi C, Lönn P, Dowdy SF (2012) Do cell-penetrating peptides actually "penetrate" cellular membranes? *Mol Ther* 20:695-697.

- 15 Vaslin A, Rummel C, Clarke PG (2009) Unconjugated TAT carrier peptide protects against excitotoxicity. *Neurotox Res* 15:123-126.

Xu W, Zhou M, Baudry M (2008) Neuroprotection by cell permeable TAT-mGluR1 peptide in ischemia: synergy between carrier and cargo sequences. *Neuroscientist* 14:409-414.

- 20 Zhang S, Taghibiglou C, Girling K, Dong Z, Lin SZ, Lee W, Shyu WC, Wang YT (2013) Critical role of increased PTEN nuclear translocation in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *J Neurosci* 33:7997-8008.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA

<120> PÉPTIDOS NEUROPROTECTORES

<130> P00066WO

5 <160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1

<212> PRT

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARG-1

<400> 1

Arg

1

15 <210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

20 <223> ARG-3

<400> 2

Arg Arg Arg

1

<210> 3

<211> 6

25 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARG-6

<400> 3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

30 1

5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

35 <220>

<223> ARG-7

<400> 4

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

<210> 5

40 <211> 8

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARG-8

<400> 5
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

 <210> 6
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> ARG-9

 <400> 6
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 10 1 5

 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 15 <220>
 <223> ARG-10

 <400> 7
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

 <210> 8
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> ARG-11

 25 <400> 8
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> ARG-12

 <400> 9
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

 35 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 40 <223> ARG-13

 <400> 10
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

 <210> 11
 <211> 14
 45 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> ARG-14

 <400> 11
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

 5 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 10 <223> ARG-15

 <400> 12
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

 <210> 13
 <211> 18
 15 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> ARG-18

 <400> 13
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

 20 Arg Arg

 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 25 <220>
 <223> PTD-4

 <400> 14
 Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
 1 5 10

 <210> 15
 30 <211> 18
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> E9/R9

 35 <400> 15
 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

 Arg Arg

 <210> 16
 <211> 25
 <212> PRT
 40 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> R9/tPA/R9

<400> 16
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Gly Arg Val Val Gly Gly
 1 5 10 15

 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 20 25

 <210> 17
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> DAHK

 <400> 17
 Asp Ala His Lys
 10 1

 <210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 15 <220>
 <223> NR2B9c-TAT

 <400> 18
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
 1 5 10 15

 Ser Asp Val

 20 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> D-R9

 25 <400> 19
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

 <400> 20
 Gly Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly
 1 5 10

 <210> 21
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

 <400> 21
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
 1 5 10

 <210> 22
 40 <211> 16

<212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster

<400> 22
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

5 <210> 23
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 10 <223> PEP-1

<400> 23
 Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
 20

<210> 24
 <211> 26
 15 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> PYC36L-TAT

<400> 24
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Leu Gln Gly Arg
 1 5 10 15

Arg Arg Gln Gly Tyr Gln Ser Ile Lys Pro
 20 25

20 <210> 25
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>
 <223> JNKI-1D-TAT

<400> 25
 Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro
 1 5 10 15

Arg Lys Pro Arg Pro Pro Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly

30 20 25 30

<210> 26
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

35 <220>
 <223> TAT-JNKI-1

ES 2 724 932 T3

<400> 26

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Arg Pro Lys Arg
1 5 10 15

Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val Pro Arg Ser Gln Asp Thr
20 25 30

<210> 27

<211> 38

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> kFGF-JNKI

<400> 27

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

Pro Pro Arg Pro Lys Arg Pro Thr Thr Leu Asn Leu Phe Pro Gln Val
20 25 30

Pro Arg Ser Gln Asp Thr
35

10

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> kFGF

<400> 28

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 29

20

<211> 20

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> XIP

<400> 29

Arg Arg Leu Leu Phe Tyr Lys Tyr Val Tyr Lys Arg Tyr Arg Ala Gly
1 5 10 15

Lys Gln Arg Gly
20

<210> 30

<211> 24

<212> PRT

30

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> NCXBP3

<400> 30
 Arg Arg Glu Arg Arg Arg Arg Ser Cys Ala Gly Cys Ser Arg Ala Arg
 1 5 10 15

Gly Ser Cys Arg Ser Cys Arg Arg
 20

<210> 31
 <211> 14
 5 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Cal/R9

<400> 31
 Pro Leu Phe Ala Glu Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 10 1 5 10

<210> 32
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Oncorhynchus keta

15 <400> 32
 Pro Arg Arg Arg Arg Arg Ser Ser Ser Arg Pro Ile Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Pro Arg Ala Ser Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
 20 25 30

<210> 33
 <211> 31
 <212> PRT
 20 <213> Oncorhynchus keta

<400> 33
 Pro Arg Arg Arg Arg Ser Ser Arg Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Pro Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
 20 25 30

<210> 34
 <211> 31
 25 <212> PRT
 <213> Oncorhynchus keta

<400> 34
 Pro Arg Arg Arg Arg Ser Ser Ser Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Pro Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
 20 25 30

<210> 35
 30 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Oncorhynchus keta

ES 2 724 932 T3

<400> 35

Pro Arg Arg Arg Arg Ala Ser Arg Arg Ile Arg Arg Arg Arg Arg Pro
1 5 10 15

Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
20 25 30

<210> 36

<211> 32

5 <212> PRT

<213> Oncorhynchus keta

<400> 36

Pro Arg Arg Arg Arg Ser Ser Ser Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Pro Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
20 25 30

<210> 37

10 <211> 14

<212> PRT

<213> LMWP

<400> 37

Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
1 5 10

15 <210> 38

<211> 99

<212> ADN

<213> Oncorhynchus keta

<400> 38

atgccagaa gacgcagatc ctccagccga cctgtccgca ggcgccgccg ccctaggggtg 60

20 tccccgacgtc gtcgcaggag aggaggccgc aggaggcgt 99

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de 12 a 32 residuos de aminoácidos de longitud para uso en el tratamiento o prevención de lesión neural, en donde el péptido aislado es un péptido de poliarginina.
- 5 2. El péptido para uso de la reivindicación 1 en donde el péptido es un polipéptido de poliarginina que comprende 12 a 22 residuos de arginina.
3. El péptido para uso de la reivindicación 1 en donde el péptido es un péptido de poliarginina que comprende 12 a 18 residuos de arginina.
- 10 4. El péptido para uso según se reivindica en una cualquiera de la reivindicación 1 a 3, en donde el péptido aislado comprende uno cualquiera o más de los péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ. ID. NOs. 9, 10, 11, 12, 13.
- 15 5. El péptido para uso según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 4, en donde el péptido aislado estimula la supervivencia de las neuronas, inhibe la muerte de las células neuronales, afecta los procesos endocíticos de la célula; afecta la función de los receptores de la superficie celular para dar lugar a un influjo de calcio celular reducido; interacciona con y/o estabiliza la membrana mitocondrial externa para preservar la función mitocondrial; o inhibe, regula a la baja, o afecta la enzima proproteína convertasa dependiente de calcio furina.
- 20 6. El péptido para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que presenta actividad neuroprotectora a niveles de CI50 de menos de 10 μ M en el modelo de ácido glutámico, el modelo de ácido kaínico o el modelo de isquemia.
7. Un péptido aislado para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho péptido aislado está comprendido por residuos de D-arginina.
8. Un péptido aislado para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde dicho péptido aislado está comprendido por residuos de L-arginina.
9. Un péptido aislado para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde el péptido aislado comprende una mezcla de residuos de D-arginina y residuos de L-arginina.
- 25 10. Una secuencia de polinucleótido aislado para uso en el tratamiento o prevención de lesión neural según las reivindicaciones 1-9 que codifica un péptido como se reivindica en la reivindicación 8, incluyendo secuencias complementarias a la secuencia de polinucleótido aislado, secuencias que hibridan en condiciones astringentes con las secuencias de polinucleótido, y secuencias que tienen al menos un 60 % de homología con las secuencias de polinucleótido aislado, en donde la secuencia de polinucleótido aislado es un polinucleótido no natural, una
- 30 construcción artificial preparada por el hombre, ADNc, o un vector que incluye los ácidos nucleicos aislados que codifican el péptido.
- 35 11. Una composición farmacéutica o medicamento para uso en el tratamiento o prevención de una lesión neural, para estimular la supervivencia de neuronas y/o para inhibir la muerte celular, incluyendo la composición farmacéutica o medicamento el péptido aislado de las reivindicaciones 1 a 9, o la secuencia de polinucleótido de la reivindicación 10.
12. La composición farmacéutica o medicamento de la reivindicación 11, para uso en el tratamiento o prevención de isquemia, hipoxia-isquemia perinatal, enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Huntington, Esclerosis Múltiple, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, apoplejía, neuropatía periférica, lesión en la médula espinal, epilepsia, glaucoma, o dolor neuropático.
- 40 13. La composición o medicamento para uso de la reivindicación 11 o reivindicación 12, en donde la administración es de 0.001 mg/kg a 50 mg/kg.
14. La composición farmacéutica o medicamento para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en donde la composición farmacéutica o medicamento se administra oralmente.
- 45 15. Un kit que comprende la composición farmacéutica o medicamento para uso de las reivindicaciones 11 a 14 en uno o más contenedores y un manual de instrucciones o folleto informativo sobre instrucciones y/o información con respecto a la aplicación de la composición farmacéutica.

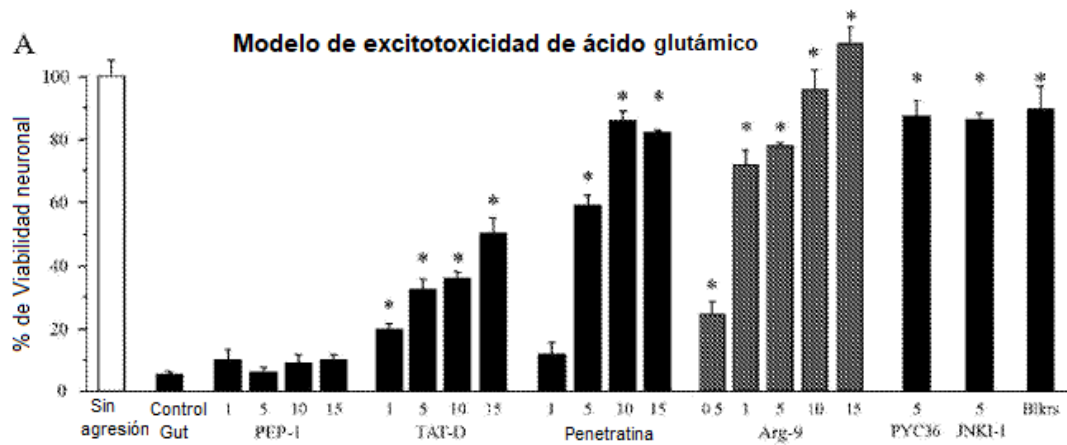


Fig.1.a

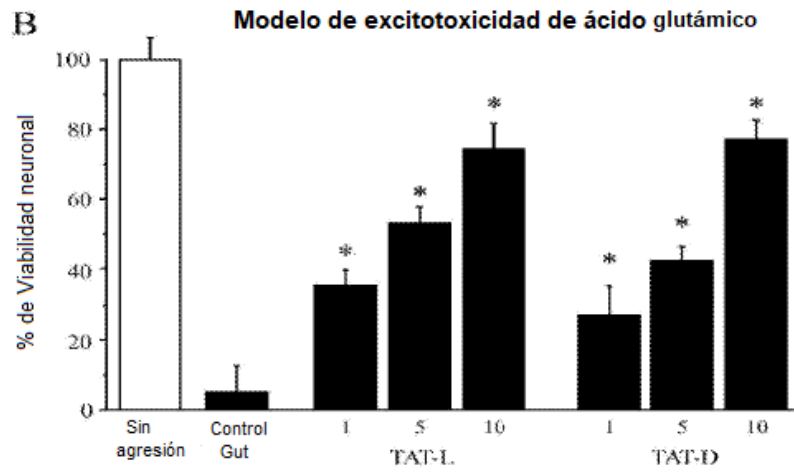


Fig. 1.b

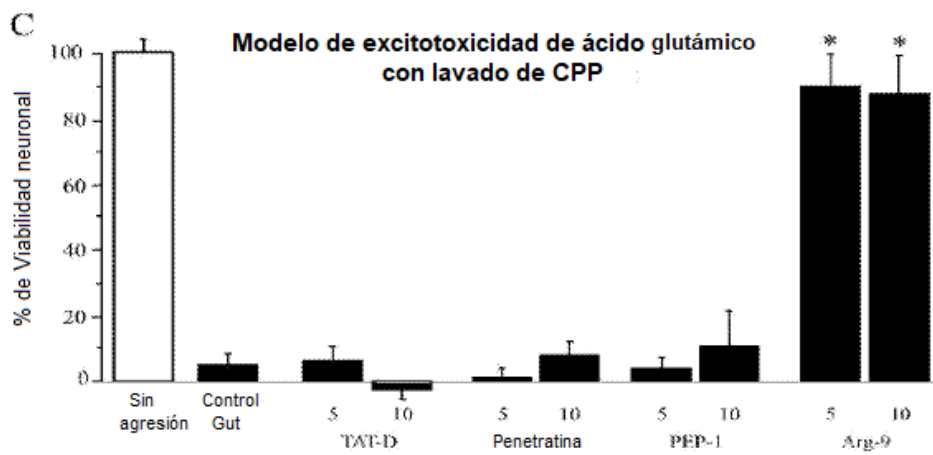


Fig. 1.c

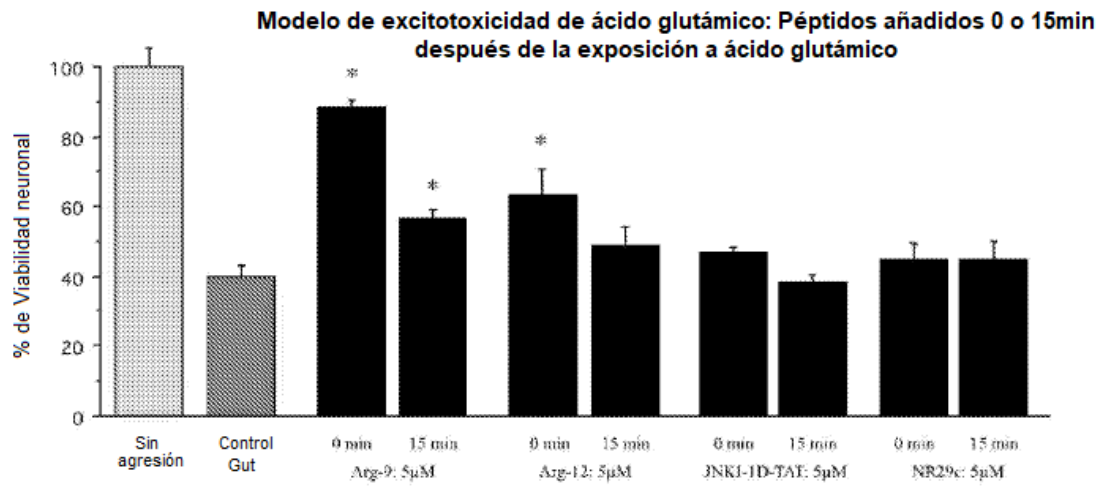


Fig. 1.d

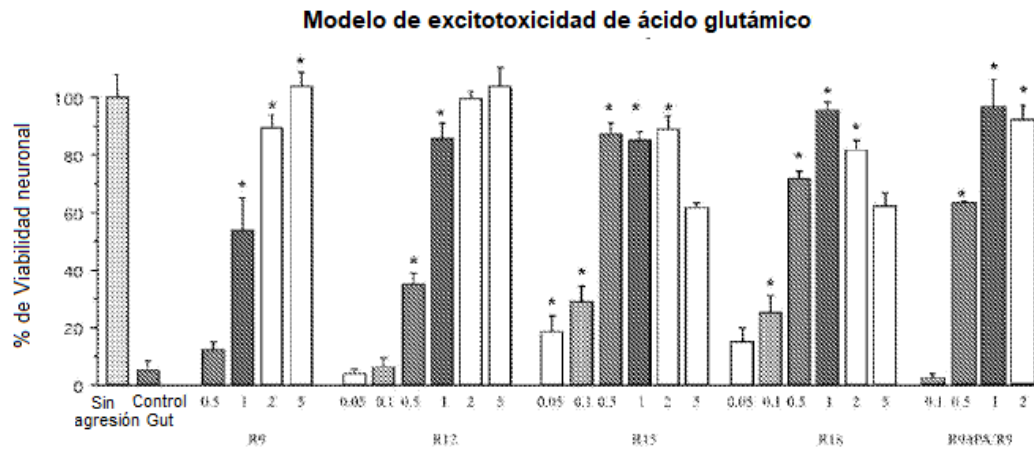


Fig. 1.e

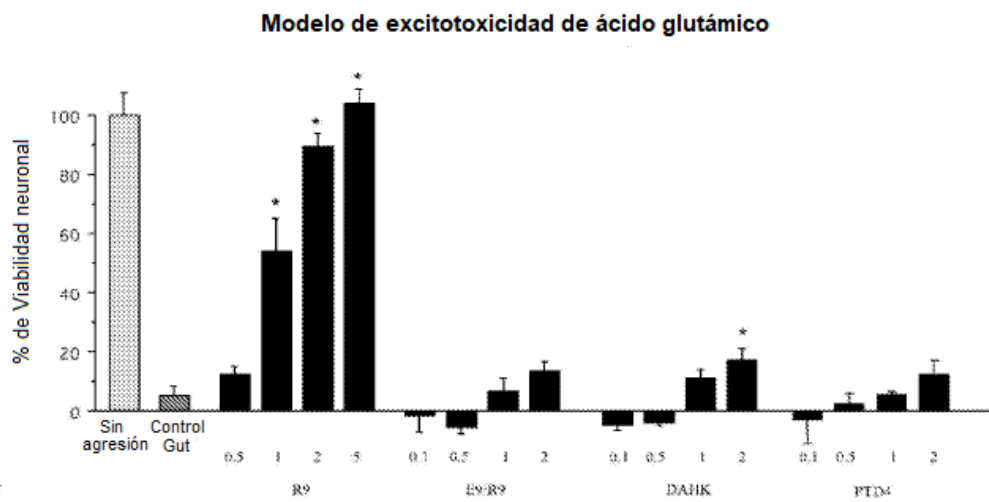


Fig. 1.f

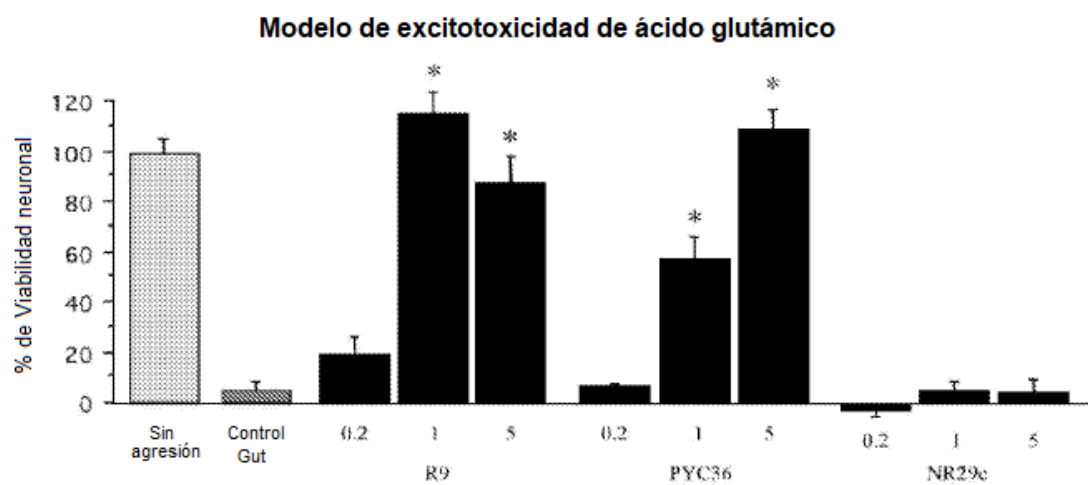


Fig. 1.g

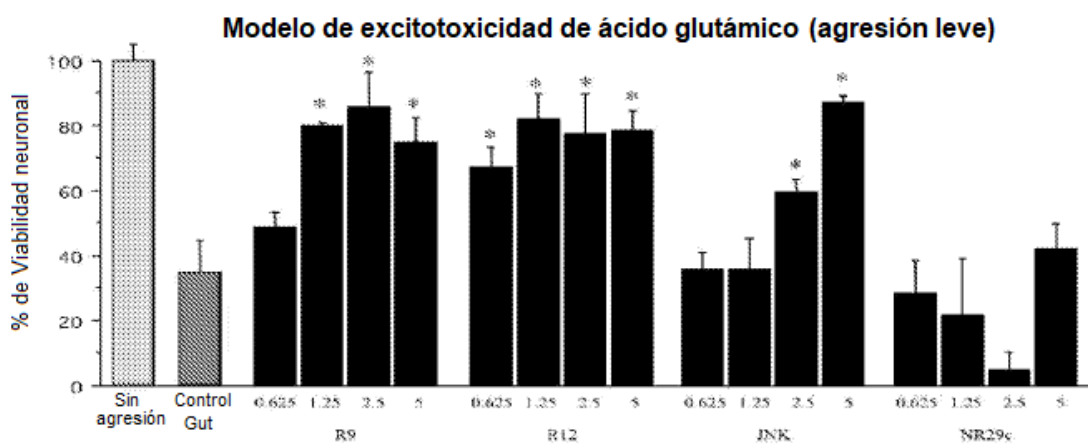


Fig. 1.h

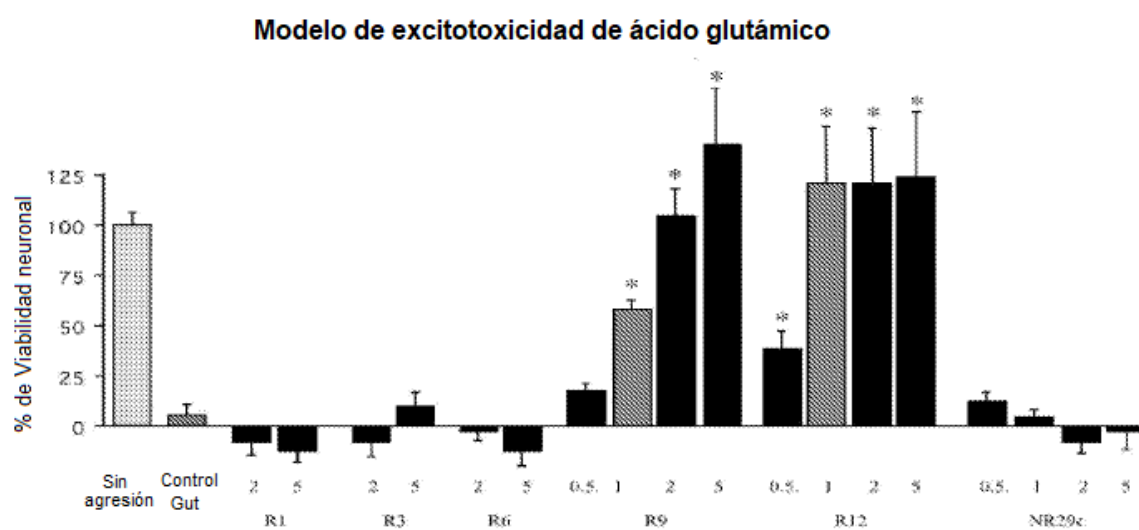


Fig. 1.i

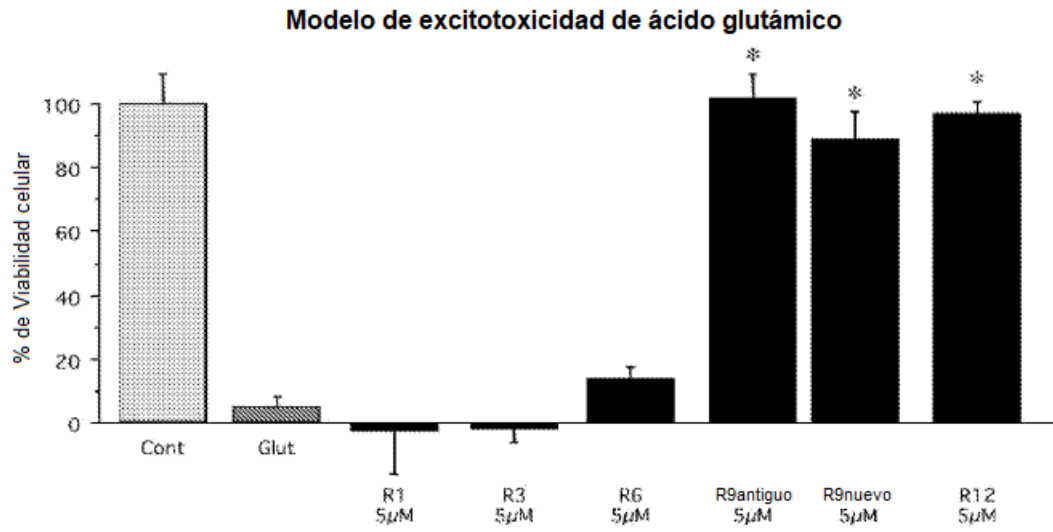


Fig. 1j

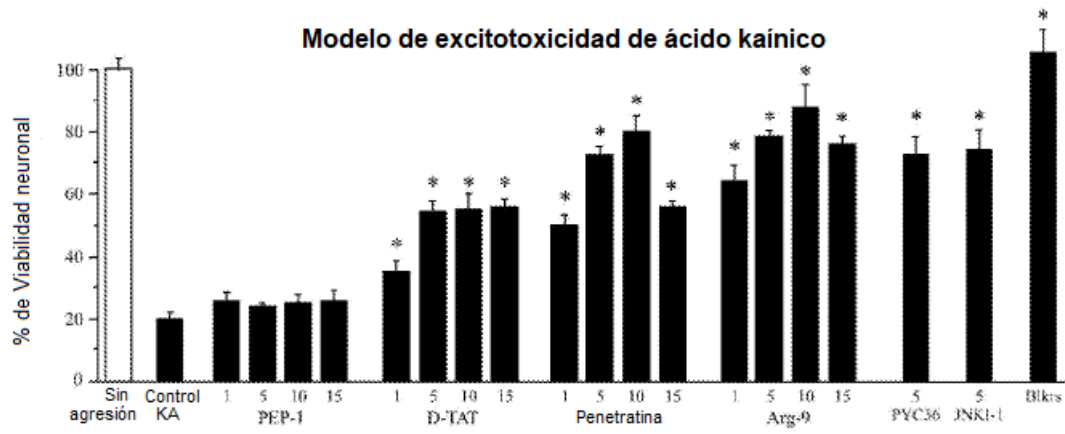


Fig. 2

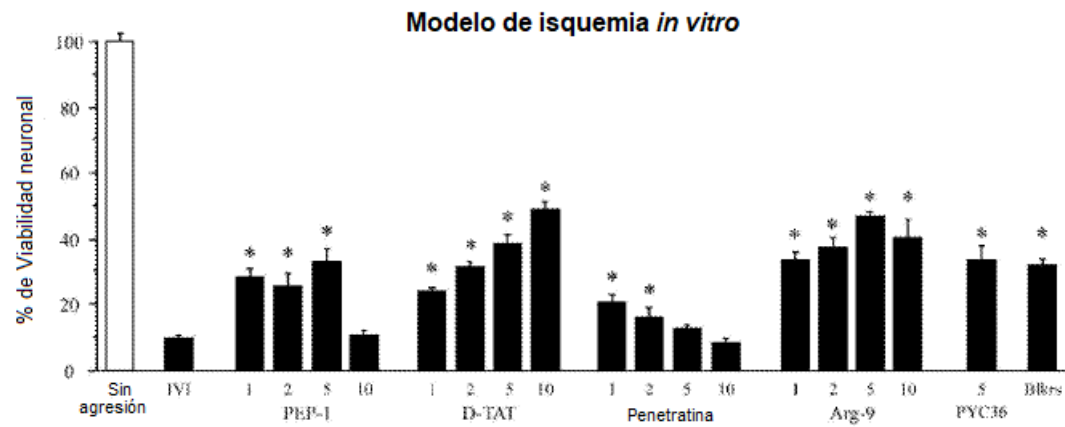


Fig. 3a

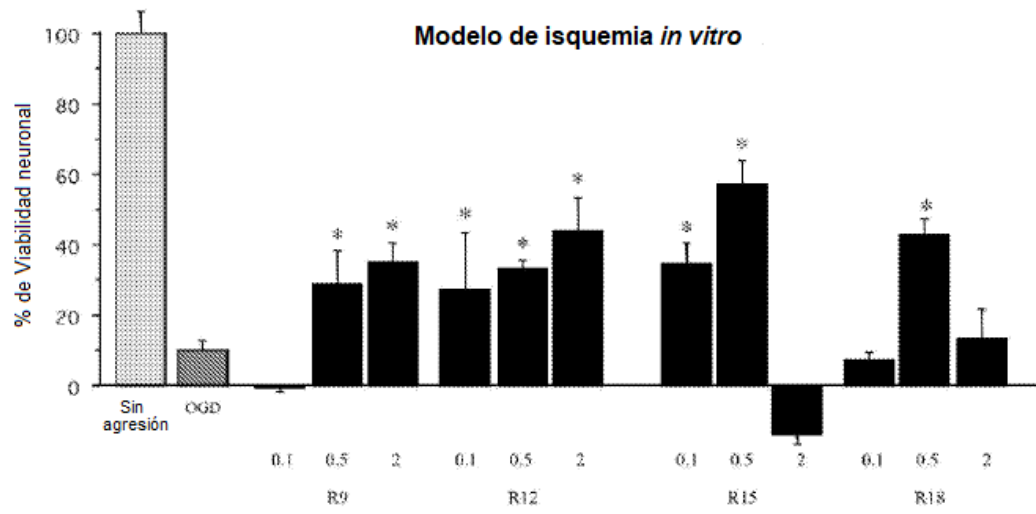


Fig. 3b

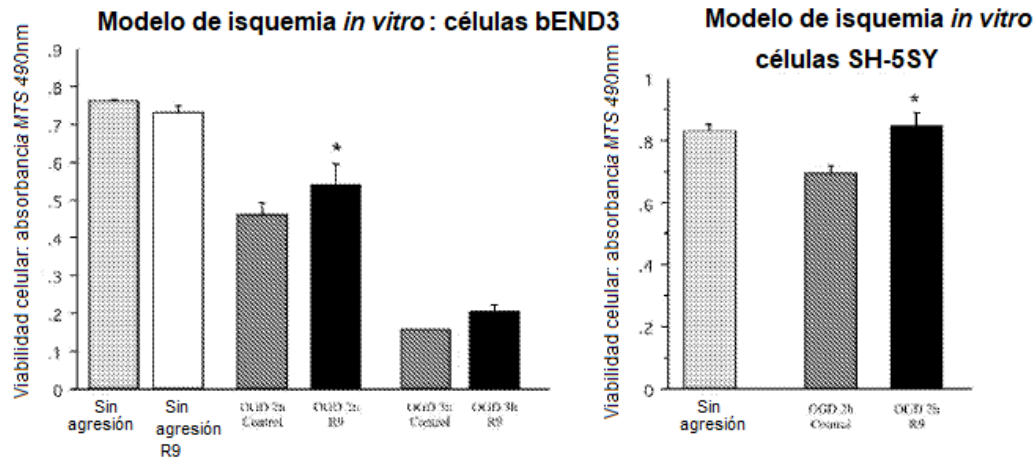


Fig. 3c

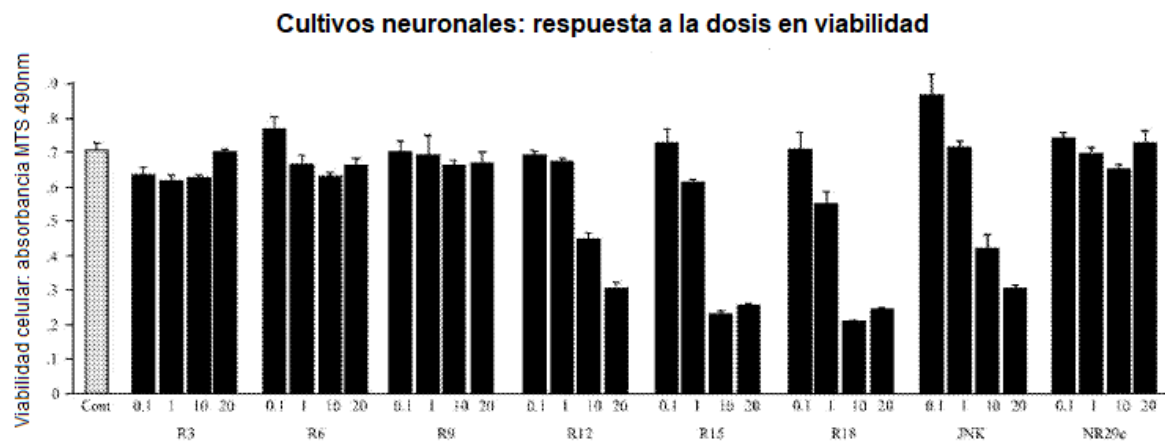


Fig. 4

**pMCAO: Tratamiento administrado 30min
después de MCAO; punto final 24h**

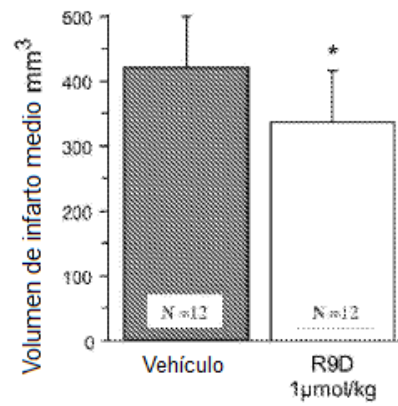


Fig. 5

Modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico

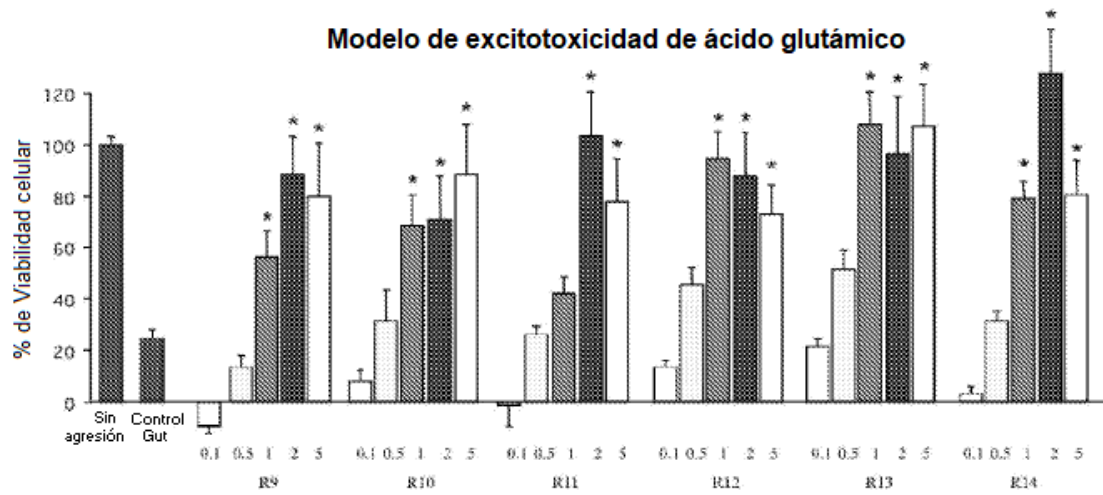


Fig. 6

Modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico

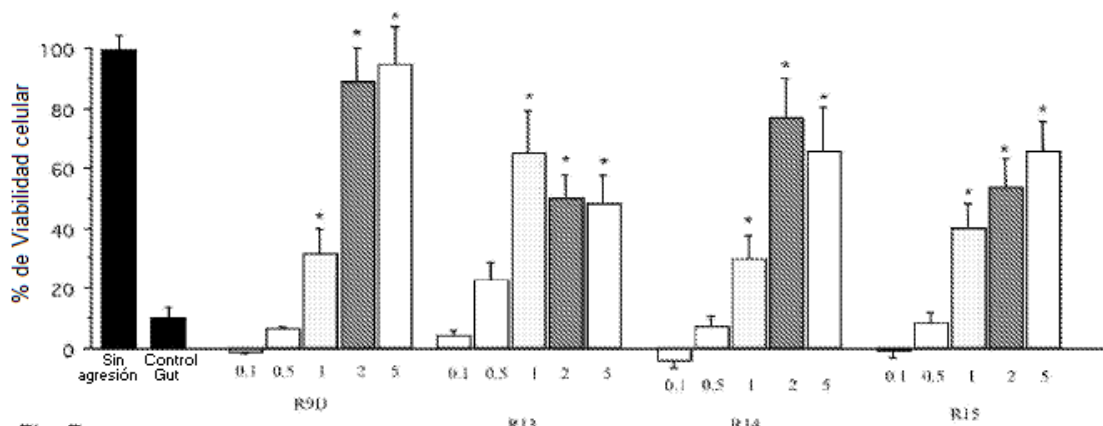


Fig. 7

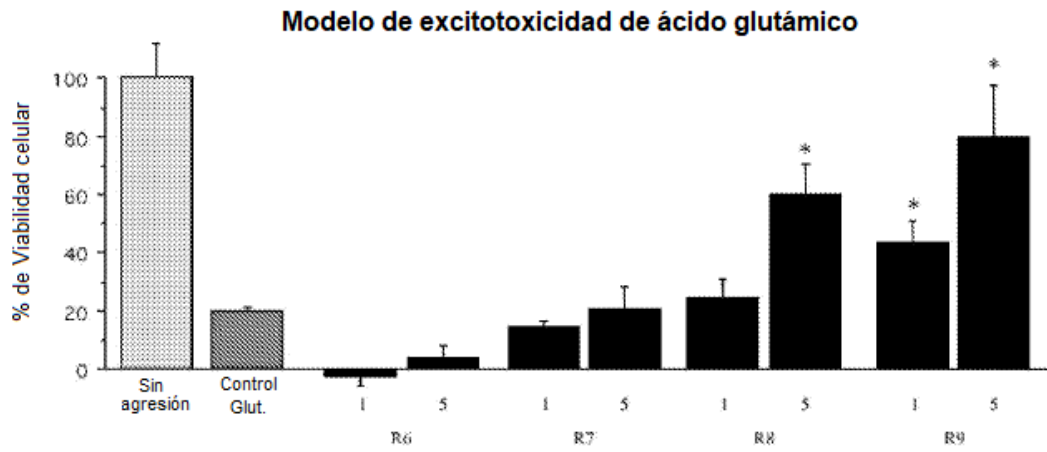


Fig. 8

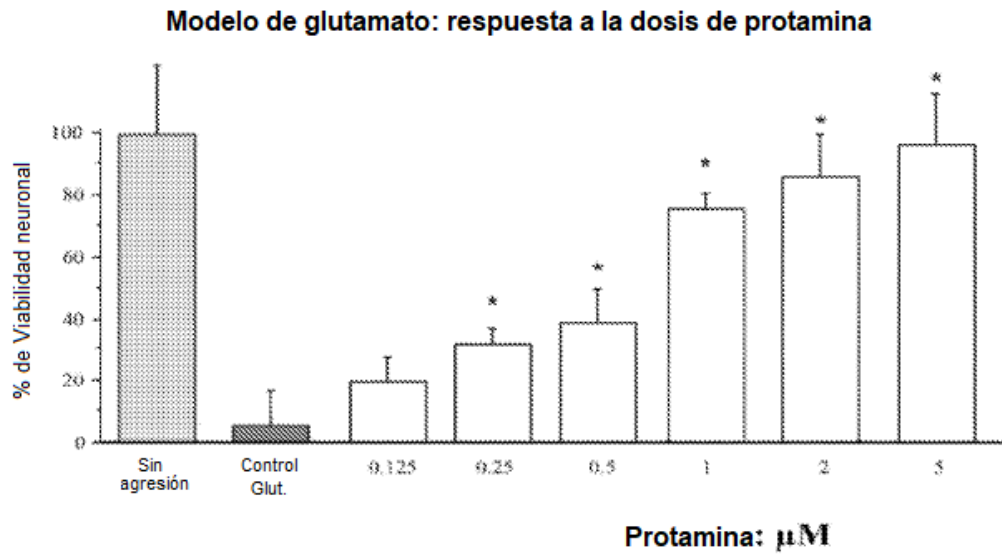


Fig 9

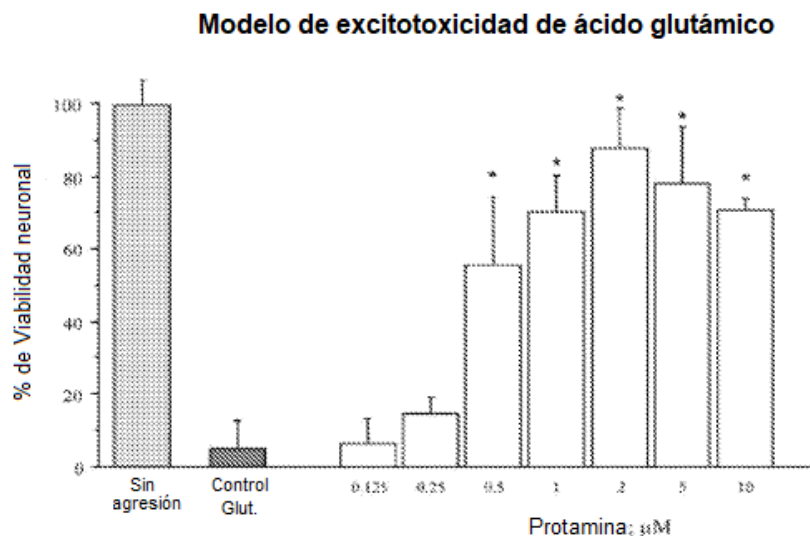


Fig 10

Modelo de glutamato: preexposición a protamina solo

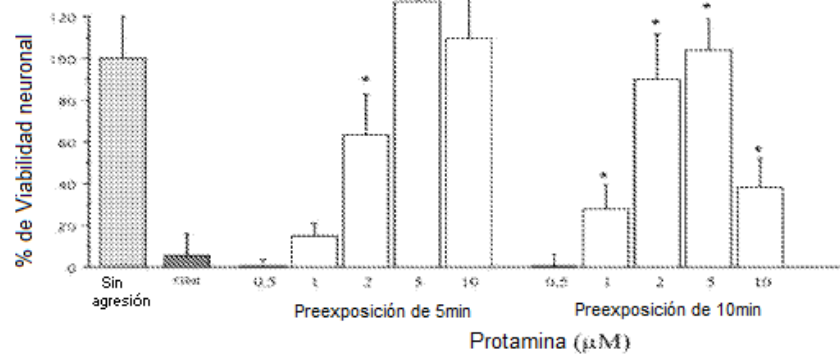


Fig 11

Modelo de glutamato: respuesta a la dosis de protamina/LMWP

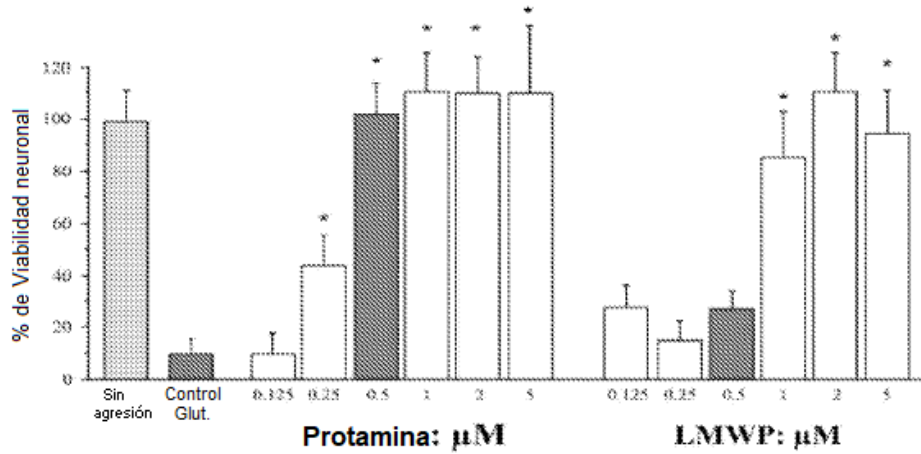


Fig 12

Modelo de glutamato: respuesta a la dosis de protamina/LMWP 2

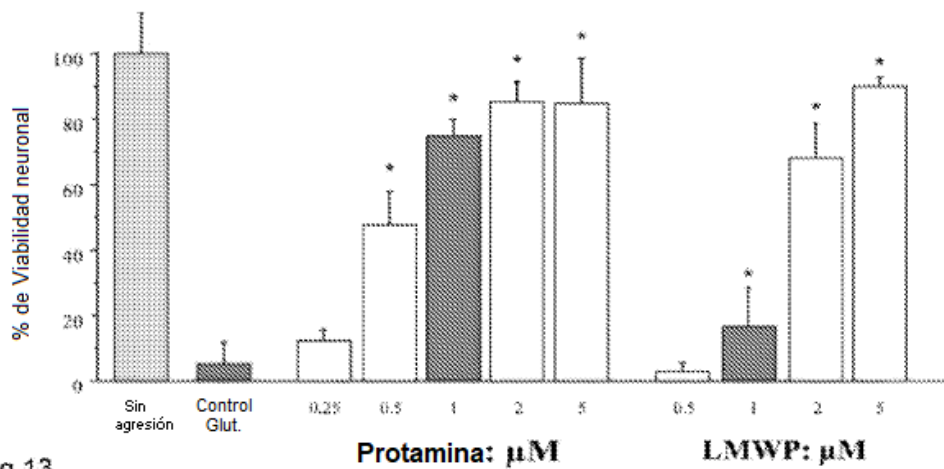


Fig 13

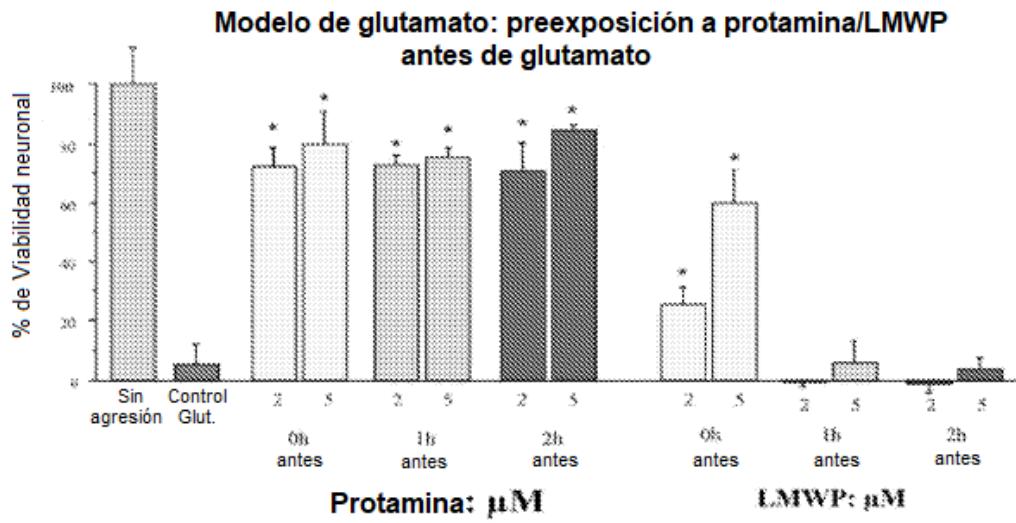


Fig 14

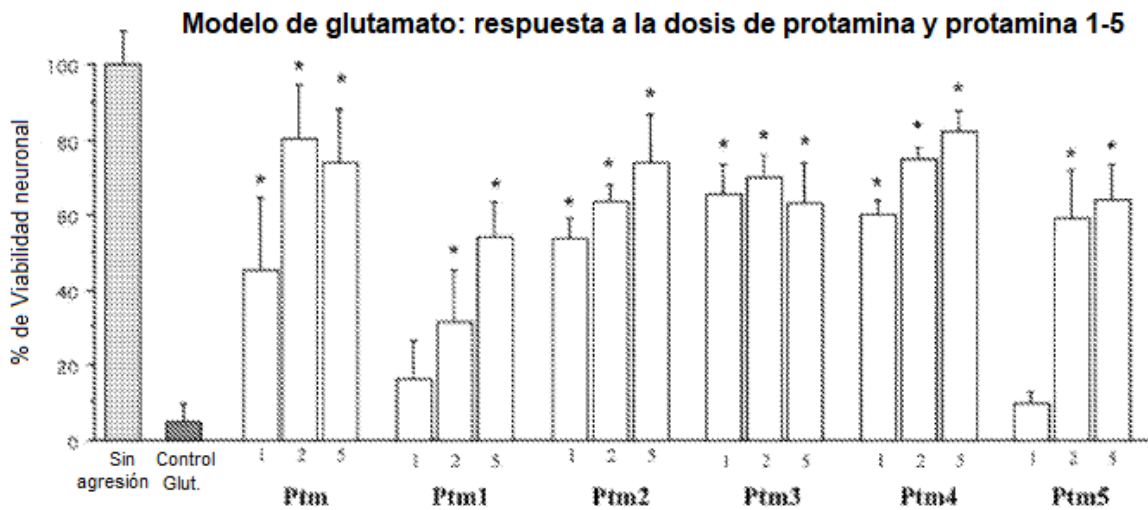


Fig 15

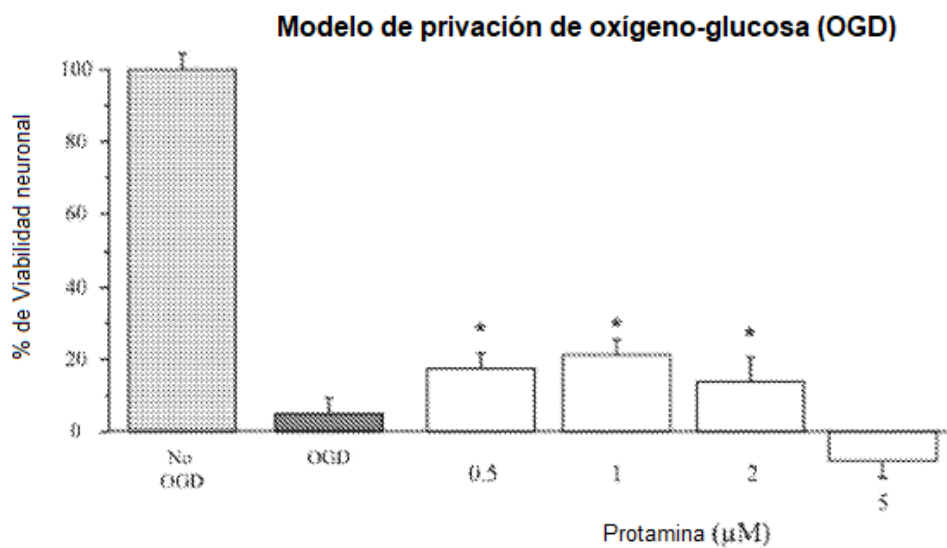
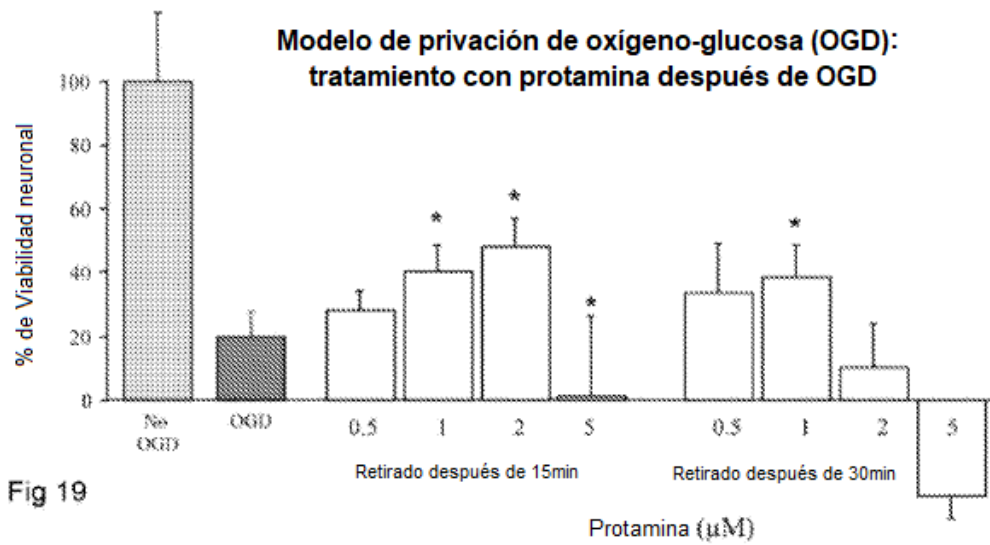
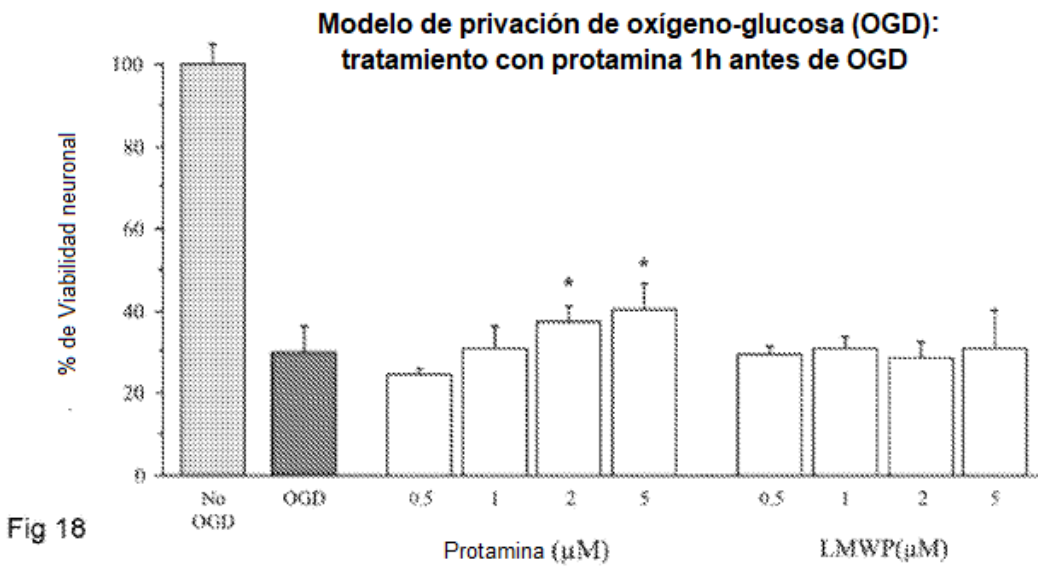
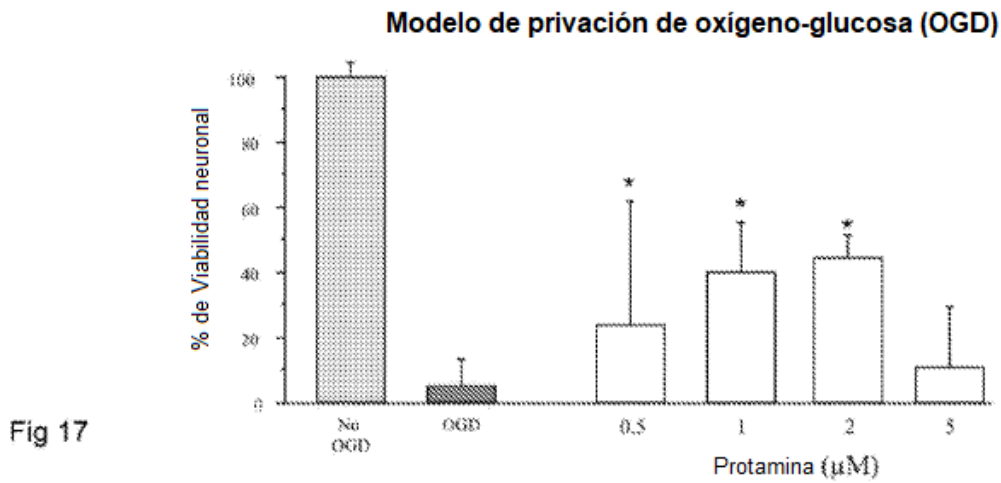


Fig 16



Modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD): tratamiento con protamina/LMWP inmediatamente después de OGD durante 15min

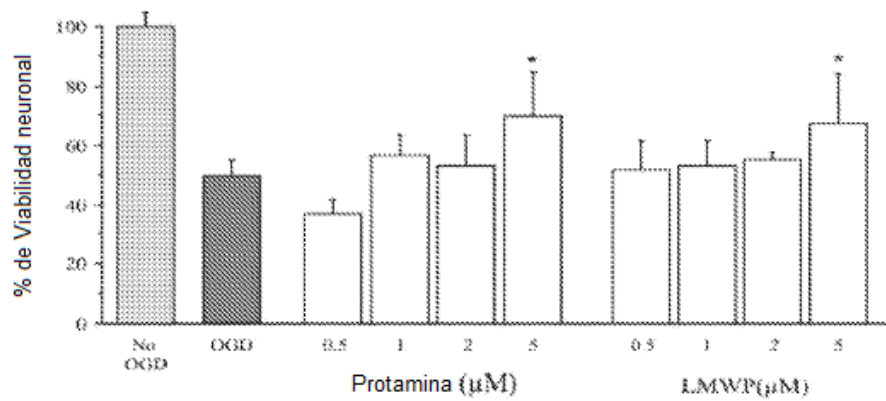


Fig 20

Modelo de privación de oxígeno-glucosa: protamina y protamina 1-5 durante 15min después de OGD

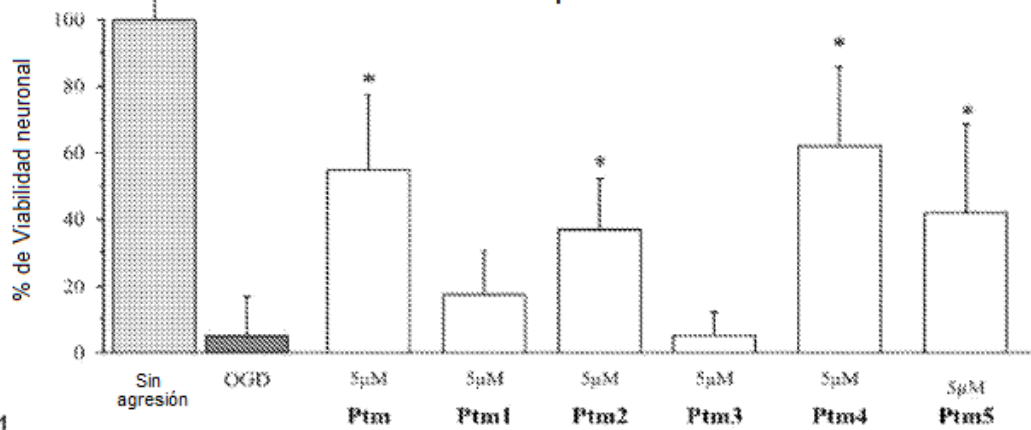


Fig 21

**Modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD):
protamina, protamina 1-5 y LMWP durante 15min después de OGD**

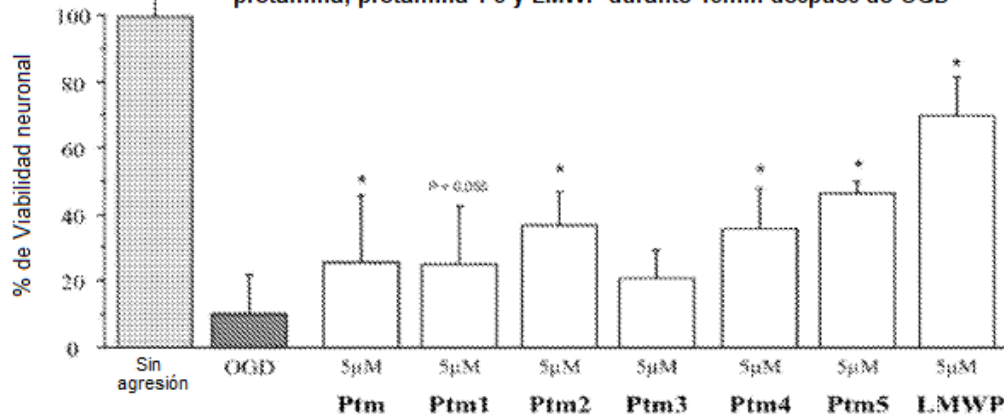


Fig 22

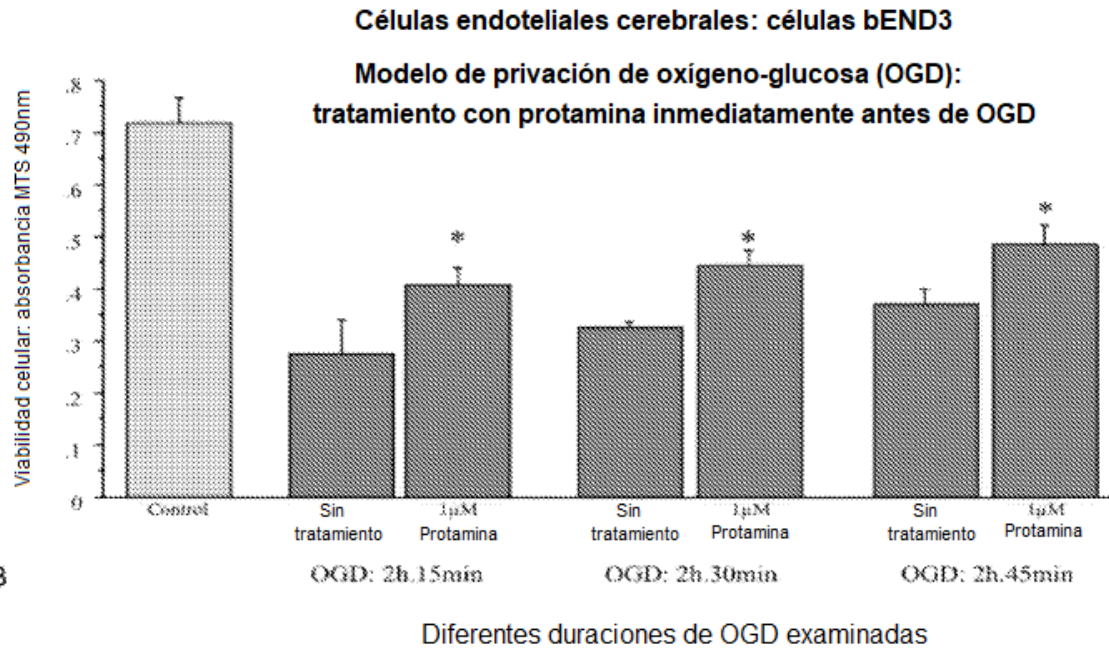


Fig 23

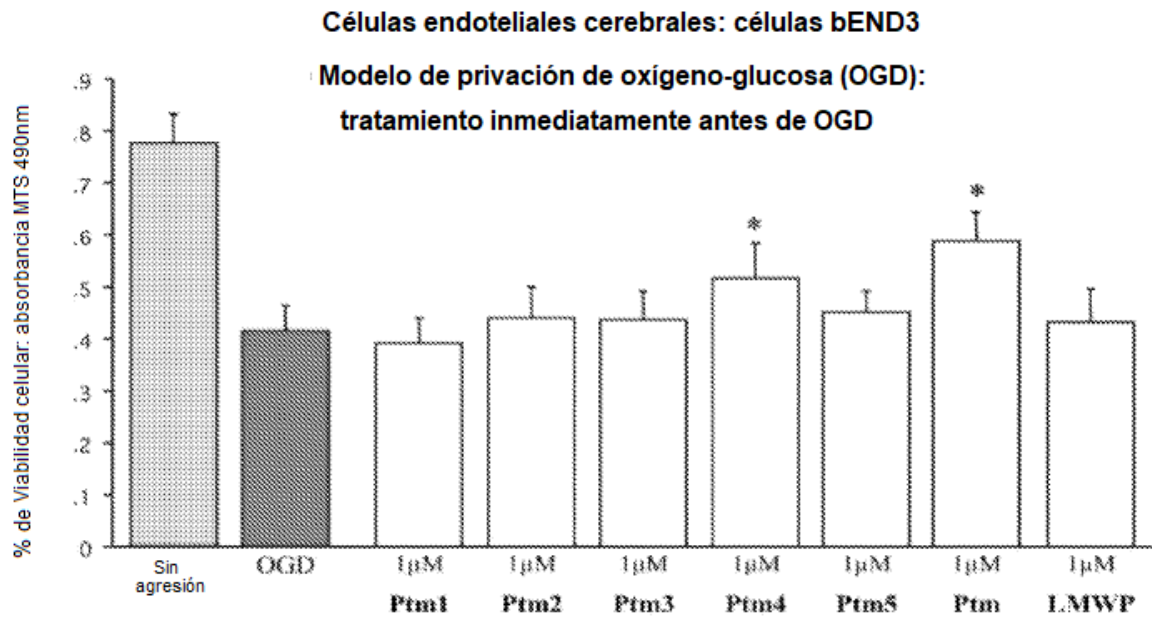


Fig 24

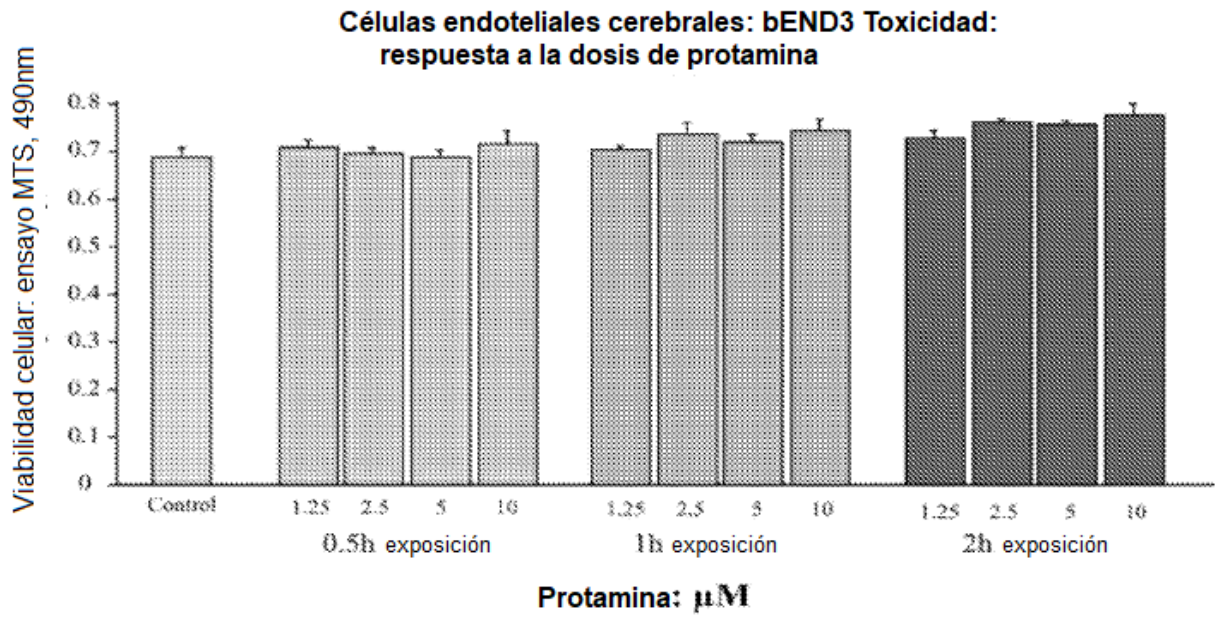


Fig 25

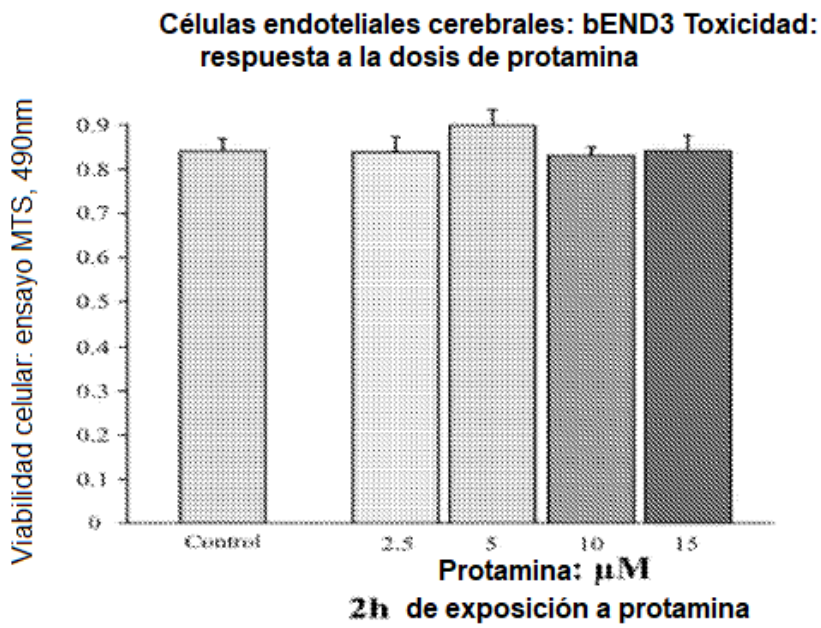
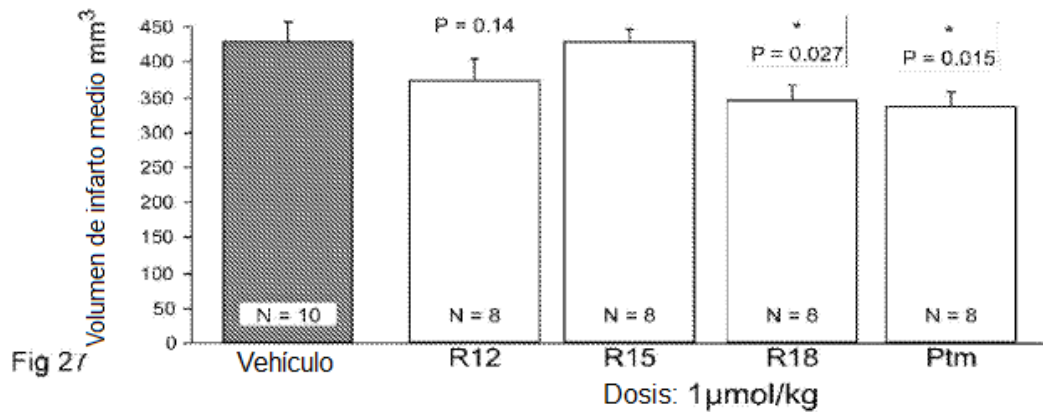
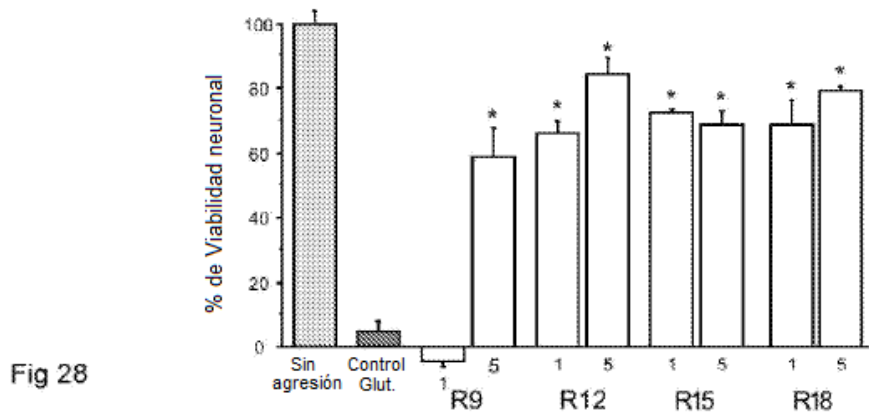


Fig 26

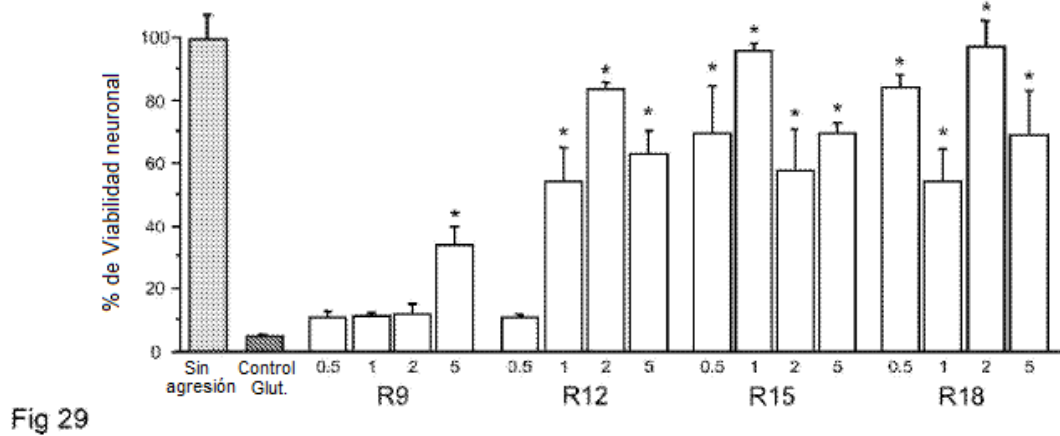
pMCAO: tratamiento administrado 30min después de MCAO; punto final 24h



Modelo de ácido glutámico: péptidos presentes solo durante la agresión de 5min



Modelo de ácido glutámico: péptidos retirados antes de la agresión



Modelo de ácido glutámico: preexposición a los péptidos antes de la agresión

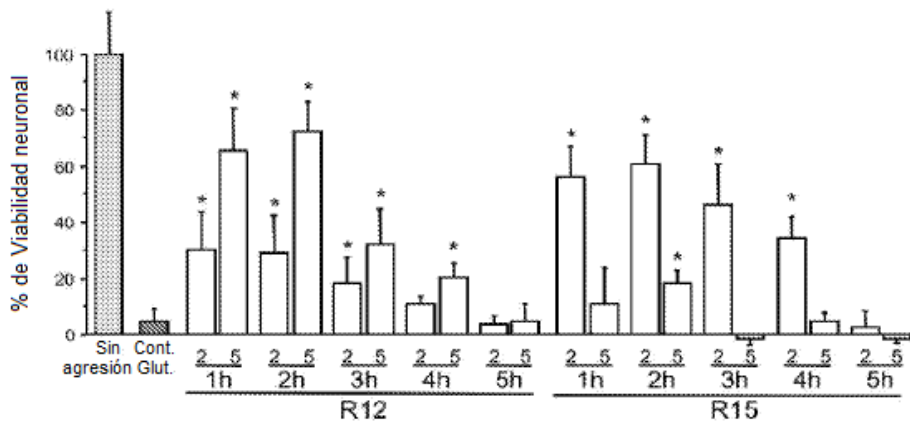


Fig 30

Modelo de isquemia *in vitro* /OGD: péptidos añadidos después de OGD y retirados entonces después de 15 min

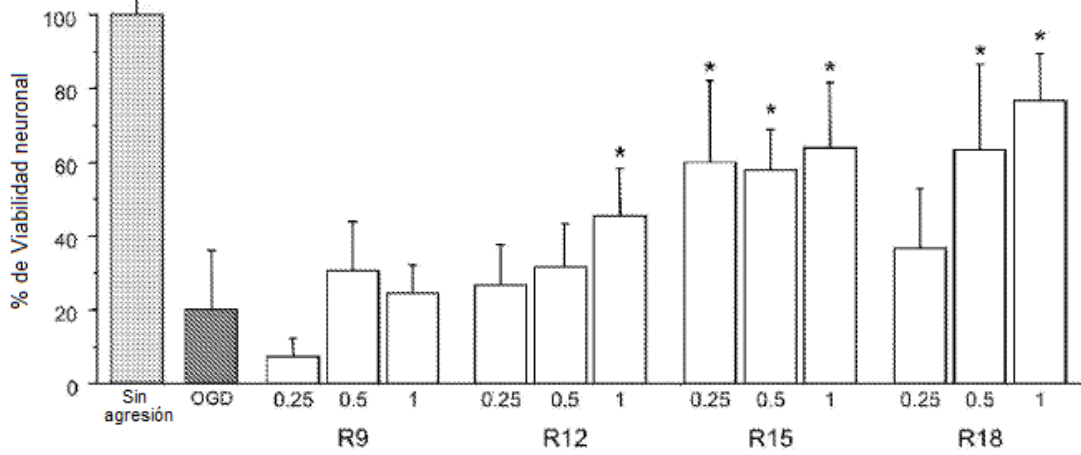


Fig 31

Modelo de OGD: tratamiento con los péptidos antes de OGD

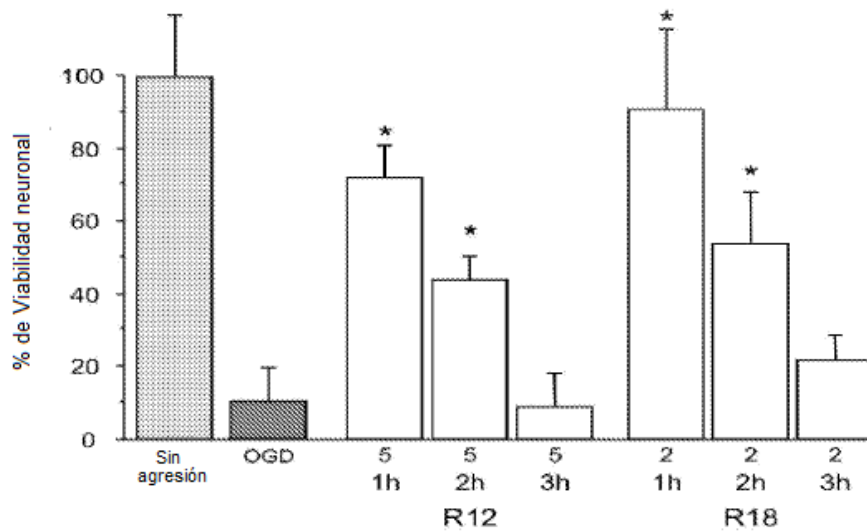


Fig 32

Fig 33

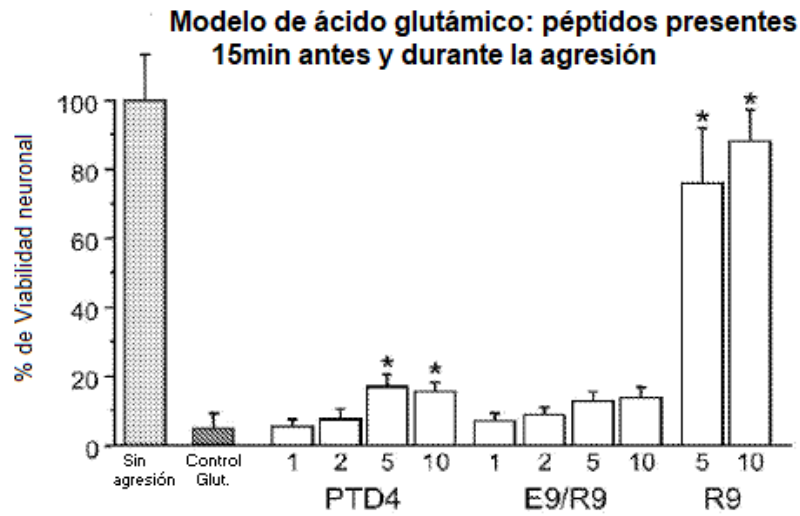


Fig 34

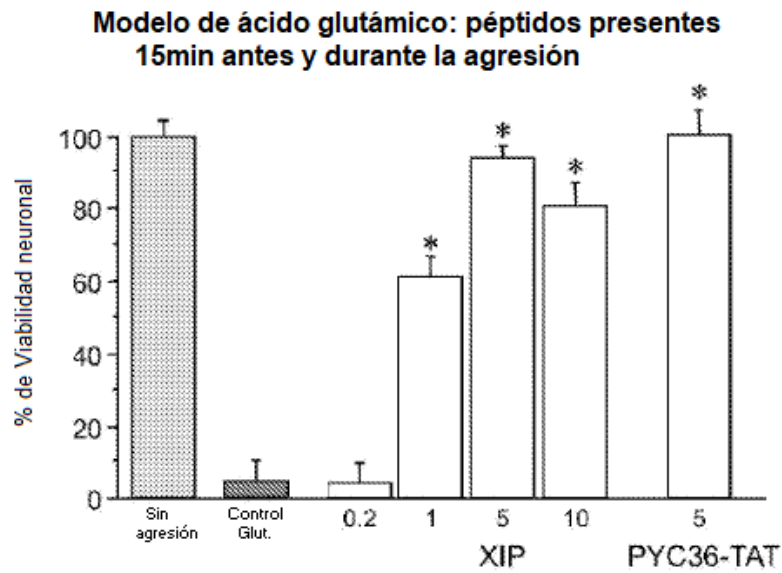
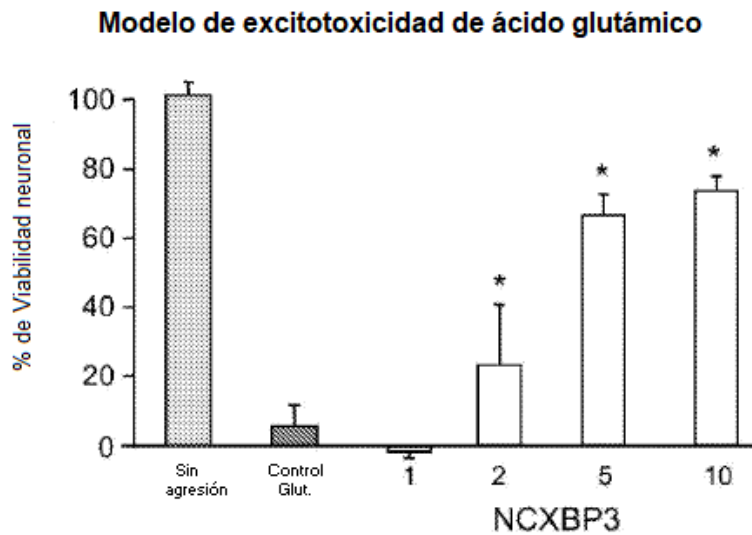
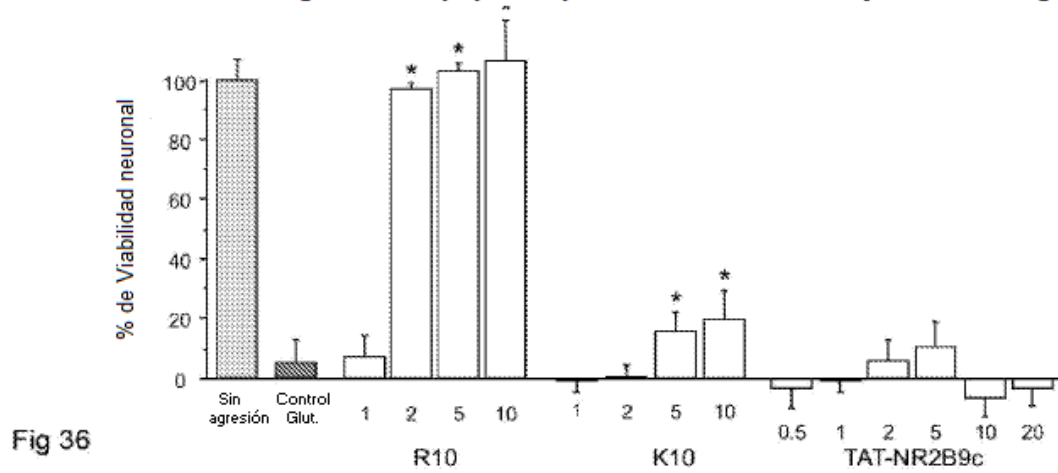


Fig 35



Modelo de ácido glutámico: péptidos presentes 15min antes y durante la agresión



Modelo de NMDA: péptidos presentes 15min antes y durante la agresión

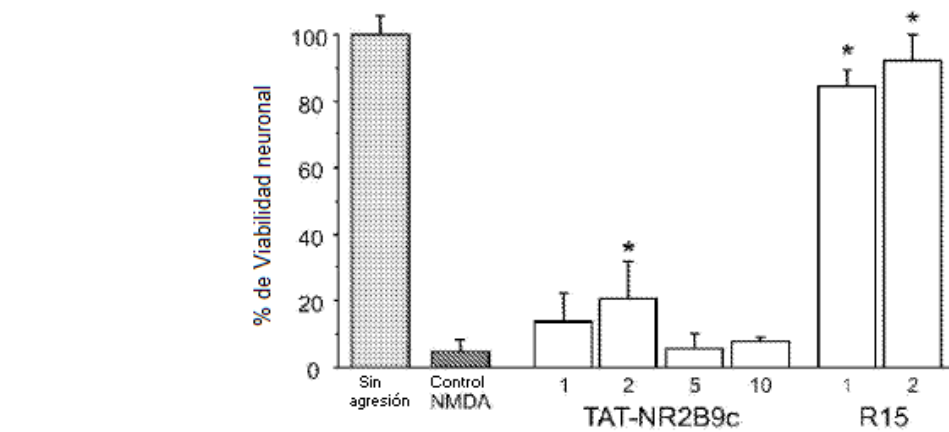


Fig 37

Modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico

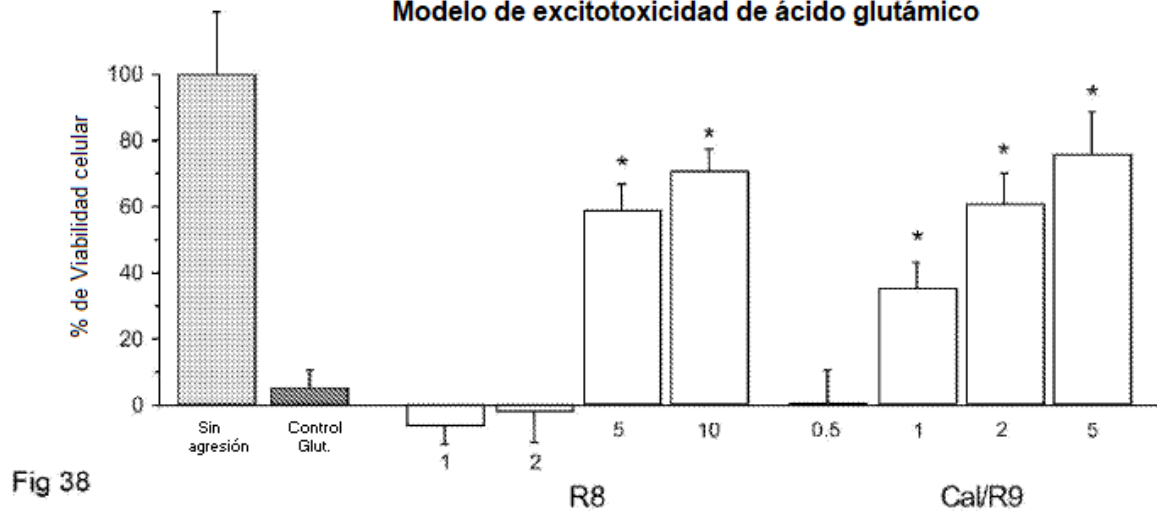
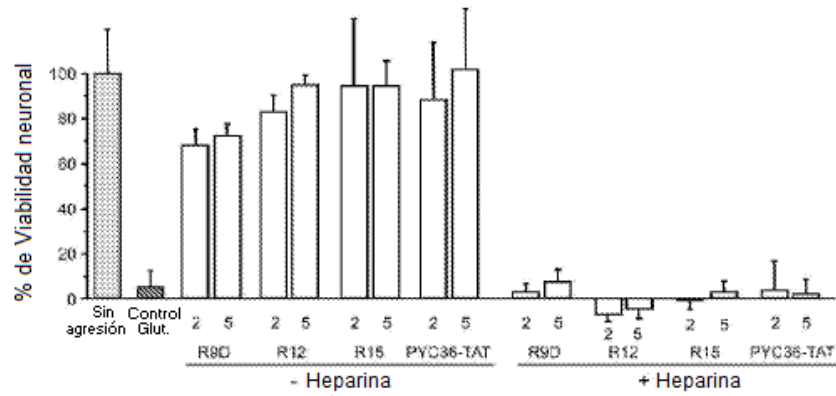


Fig 38

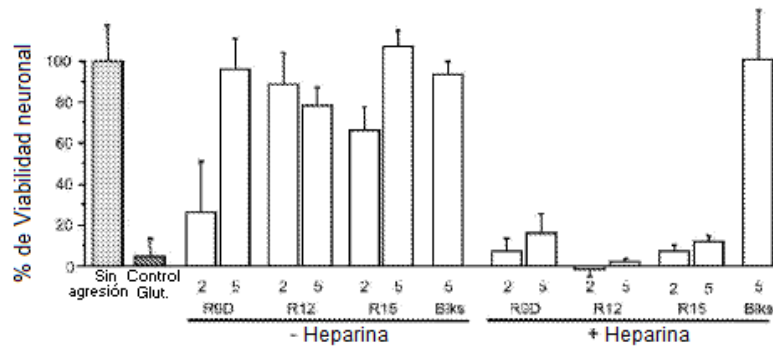
Modelo de ácido glutámico: péptidos $\pm$ heparina; péptido retirado antes de la agresión

Fig 39



Modelo de ácido glutámico: péptidos $\pm$ heparina; péptidos retirados antes de la agresión

Fig 40



Modelo de ácido glutámico: péptidos presentes 15min antes y durante la agresión

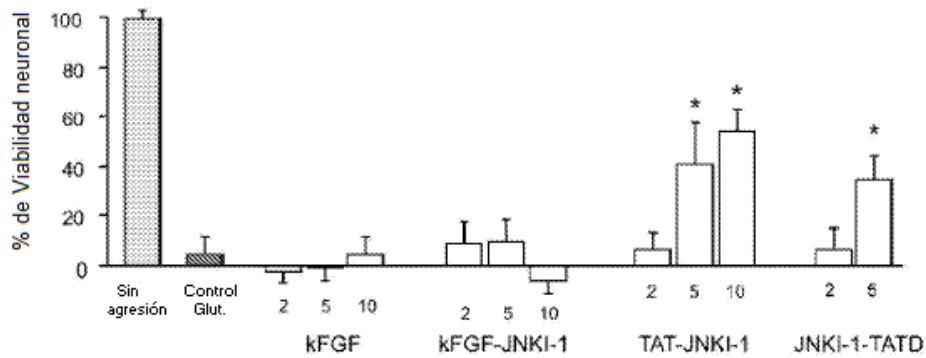


Fig 41

Cultivo de astrocitos primario
Modelo de privación de oxígeno-glucosa (OGD): 15min de pretratamiento antes de OGD

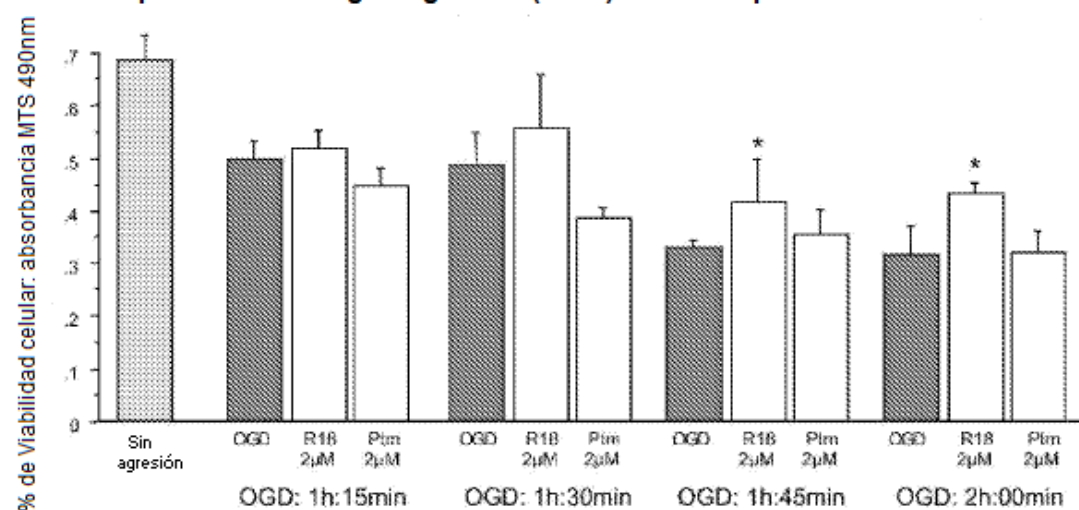


Fig 42

Toxicidad en astrocitos: respuesta a la dosis de protamina

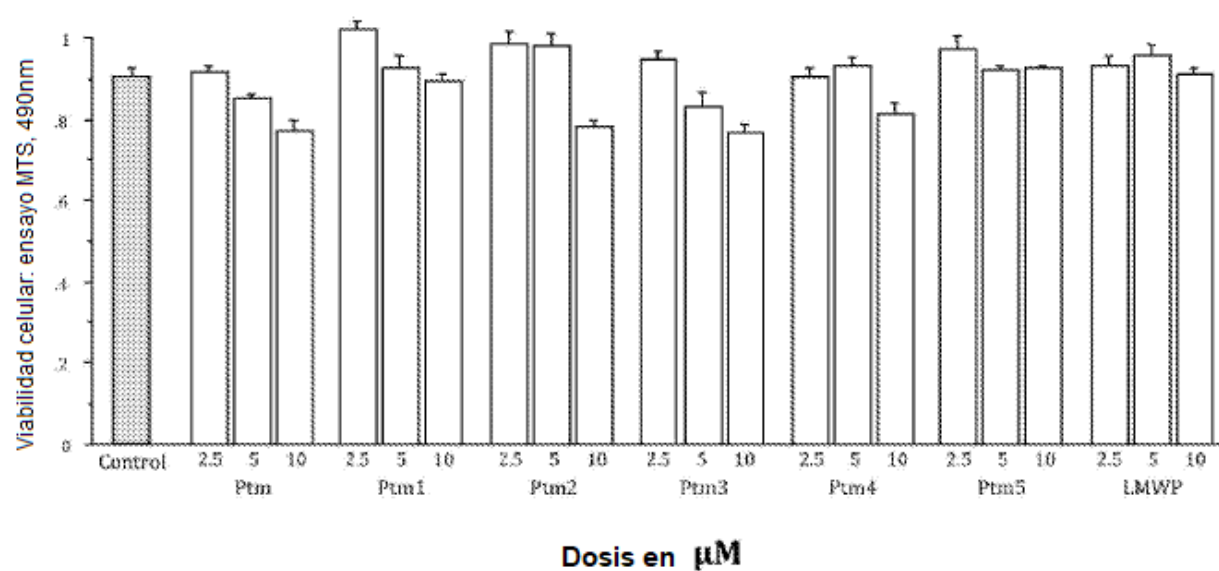


Fig 43

Modelo de excitotoxicidad de ácido glutámico: cinética de calcio con Fura-2 AM

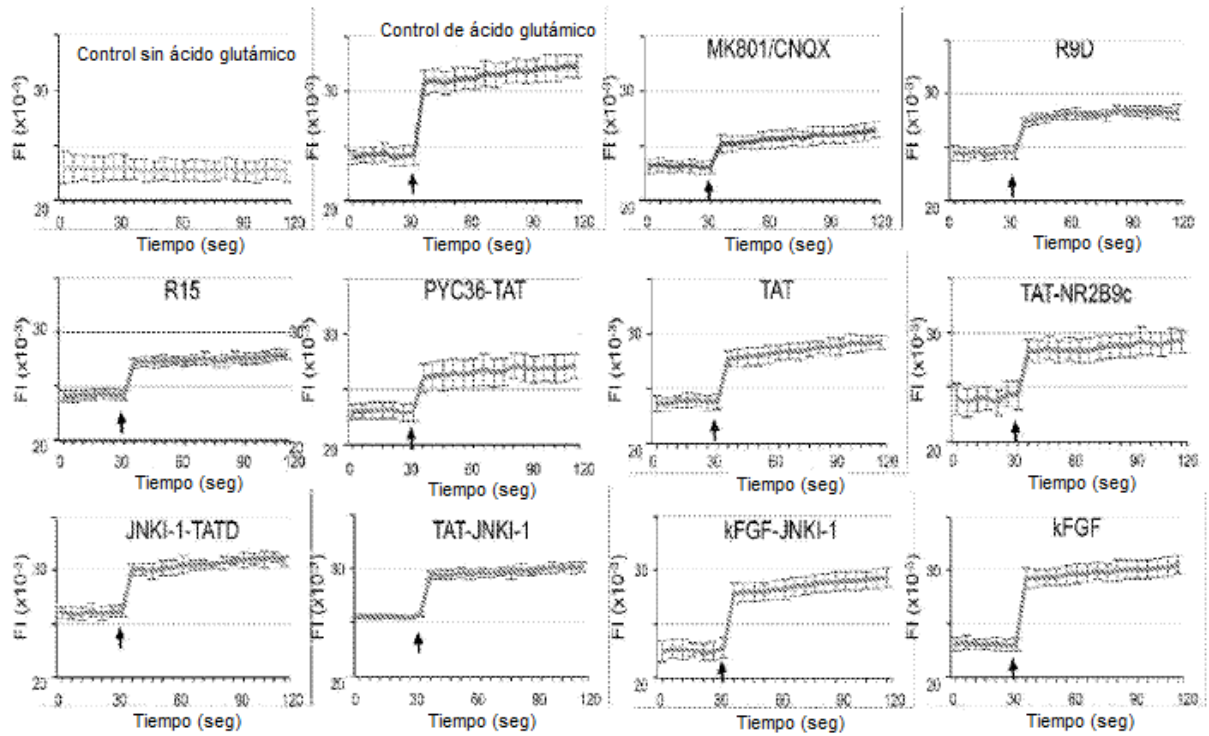


Fig 44

Modelo propuesto de internalización endocítica inducida por CPP ricos en arginina de receptores de la superficie de las células neuronales

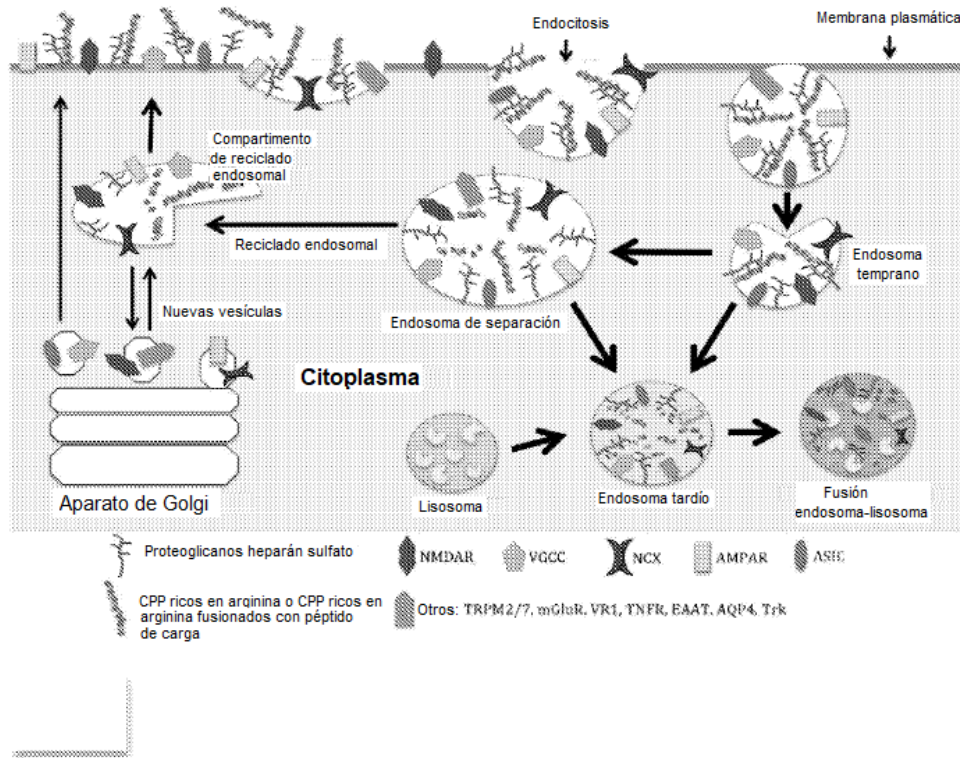


Fig 45

Péptido	SEQ ID NO.	Secuencia	No. de aminoácidos/ No. de residuos de arginina: peso molecular (Da)	Carga neta a pH 7	Propiedades físico-químicas
R1: Arg-1	1	H-R-OH	1/1: 174	1	Catiónico
R3: Arg-3	2	H-RRR-OH	3/3: 487	3	Catiónico
R6: Arg-6	3	H-RRRRRR-OH	6/6: 955	6	Catiónico
R7: Arg-7	4	H-RRRRRRR-OH	7/7: 1,111	7	Catiónico
R8: Arg-8	5	H-RRRRRRRR-OH	8/8: 1,267	8	Catiónico
R9: Arg-9	6	H-RRRRRRRRR-OH	9/9: 1,424	9	Catiónico
R10: Arg-10	7	H-RRRRRRRRRR-OH	10/10: 1,580	10	Catiónico
R11: Arg-11	8	H-RRRRRRRRRRR-OH	11/11: 1,736	11	Catiónico
R12: Arg-12	9	H-RRRRRRRRRRRR-OH	12/12: 1,892	12	Catiónico
R13: Arg-13	10	H-RRRRRRRRRRRRR-OH	13/13: 2,048	13	Catiónico
R14: Arg-14	11	H-RRRRRRRRRRRRRR-OH	14/14: 2,204	14	Catiónico
R15: Arg-15	12	H-RRRRRRRRRRRRRRR-OH	15/15: 2,360	15	Catiónico
R18: Arg-18	13	H-RRRRRRRRRRRRRRRRR-OH	18/18: 2,829	18	Catiónico
PTD-4 ^a	14	H-YARAAARQARA-OH	11/3: 1,204	3	Catiónico
E9/R9 (R9/E9)	15	H-EEEEEEEEEE-RRRRRRRRR-OH	18/9: 2,586	0	Neutro
R9/PA/R9 or R9/X7/R9	16	H-RRRRRRRRR-PGRVVG-RRRRRRRRR-OH	25/19: 3,452	19	Catiónico
DAHK	17	H-DAHK-OH	4/0: 469.5	0.1	N/A
NR2B9c-TAT ^b	18	H-GRKKRRQRRR-KLSSIESDV-NH2	19/6: 2,355		Catiónico
D-R9	19	H-rrrrrrrr-NH2	9/9: 1423.73	10	Catiónico
TAT-D	20	H-GrrqrkrkrG-NH2	10/6: 1,453	9	Catiónico
TAT-L	21	Ac-GRKKRRQRRRG-NH2	10/6: 1,494	8	Catiónico
Penetratina	22	H-RQIKIWFQNRMRKWK-NH2	16/3: 2,246	7	Catiónico
Pep-1	23	H-KETWWETWWTEWSQPK KKRKV-NH2	21/1: 2,847	4	Anfifílico
PYC36L-TAT ^c	24	H-GRKKRRQRRR-GGLQGRRRQGYQSIKP-NH2	26/10: 3,180	13	Catiónico
JNK1-1D-TAT ^d	25	H-tdqsrpvqpflnltprkprpp-rrrqrkrkrG-NH2	32/-: 3,925	12	Catiónico
TAT-JNK1-1 ^d	26	H-GRKKRRQRRR-PPRPKRPTTLNLFQVPRSQDT-OH	32/9: 3,924.6	11	Catiónico
kFGF-JNK1-1	27	H-AAVALLPAVLLALLAP-PPRPKRPTTLNLFQVPRSQDT-OH	38/3: 4,043.9	3	Hidrofóbico
kFGF	28	H-AAVALLPAVLLALLAP-OH	16/0: 1515.96	0	Hidrofóbico
XIP ^e	29	H-RRLLFYKYVYKRYRAGKQ RG-OH	20/5: 2621.14	8	Catiónico
NCXBP3 ^f	30	H-RRRRRRRRSCAGCSRARGSCRR-NH2	24/11: 2881.34	10.8	Catiónico
Cal/R9	31	Ac-PLFAE-RRRRRRRRR-NH2	15/9: 2022.41	8	Catiónico

Fig. 46

Resumen de diferentes péptidos (y ácido nucleico) de protamina (salmón)

SEQ ID NO.:	Nombre de la secuencia	Tipo	Otra información	Secuencia	Residuos de aa/arg	PM (da)
-	Mezcla de sulfato de protamina; Ptm	Mezcla de poli-péptidos	Forma inyectable/IV	Protamina 1 - Protamina 4 ¹	32/21	≈4,500
32	Protamina 1; Ptm1	Poli-péptido	Pico 1 HPLC	PRRRRRSSSRPIRRRRR PRASRRRRRGRRRR	32/21	4,236
33	Protamina 2; Ptm2	Poli-péptido	Pico 2 HPLC	PRRRRRSSSRPVRRRRR PRVSRRRRRGRRRR	31/21	4,163
34	Protamina 3; Ptm3	Poli-péptido	Pico 3 HPLC	PRRRRRSSSRPVRRRRR PRVSRRRRRGRRRR	31/20	4,094
35	Protamina 4; Ptm4	Poli-péptido	Pico 4 HPLC	PRRRRASRRIRRRRRRPR VSRRRRRGRRRR	30/21	4,064
36	Protamina 5; Ptm5	Poli-péptido	SwissProt	PRRRRRSSSRPVRRRRR PRVSRRRRRGRRRR	32/21	4,250
37	Protamina de bajo peso molecular (LMWP)	Poli-péptido	Derivado de protamina	VSRRRRRGRRRR	14/10	1,880
38	Secuencia de nucleótidos de la protamina 5	Secuencia de ADN codificadora de Ptm 5	SwissProt	5'ATGCCCAGAAGACGC AGATCCTCCAGCCGAC CTGTCCGCAGGCGCCG CCGCCCTAGGGTGTCC CGACGTCGTCGCAGGA GAGGAGGCCGCAGGA GGCGT-3'	N/A	N/A

Fig. 47