

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 183**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/08** (2009.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2018 PCT/US2018/067876**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2019 WO19135992**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2018 E 18898010 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2025 EP 3735129**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar trastornos neurológicos y de otros tipos**

30 Prioridad:  
**02.01.2018 US 201862612906 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.05.2025**

73 Titular/es:  
**RUSH UNIVERSITY MEDICAL CENTER (100.00%)  
1653 W. Congress Parkway  
Chicago, IL 60612, US**

72 Inventor/es:  
**PAHAN, KALIPADA**

74 Agente/Representante:  
**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 3 023 183 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

Composiciones y métodos para tratar trastornos neurológicos y de otros tipos

5 **Campo técnico**

10 **[0001]** La presente invención se refiere en general a métodos para tratar trastornos neurológicos y de otro tipo, incluyendo trastornos autoinmunitarios. Un aspecto de la invención se refiere a un método para tratar un trastorno en el que la activación del receptor de tipo Toll 2 (TLR2) mediante la unión a la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) desempeña una función en la patogenia de la enfermedad. En una realización, el método incluye la administración de una composición, que incluye una secuencia peptídica, que inhibe la activación del TLR2 por MyD88.

15 **Antecedentes**

20 **[0002]** La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo humano más común que conduce a la pérdida de memoria. Se cree en general que la EA es un trastorno multifactorial al que afecta una combinación de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida (1-3). Desde el punto de vista neuropatológico, la EA se caracteriza por la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares (ONF) (4-6). Varios estudios (7-13) también sugieren que la activación glial y la inflamación asociada desempeñan una función importante en la patogenia de la enfermedad y que la regulación de la neuroinflamación puede tener un interés terapéutico para atenuar la neurodegeneración en la EA.

25 **[0003]** Los receptores de tipo Toll (TLR) sirven como vínculos importantes entre la inmunidad innata y adaptativa, principalmente al responder a las bacterias, los productos bacterianos, los virus, los productos virales y la flagelina (14, 15). En la actualidad, se ha descrito la existencia de 11 TLR diferentes en seres humanos y se sabe que todos los principales tipos celulares del SNC expresan TLR (15, 16). Sin embargo, las de la microglía son las únicas células del SNC que expresan casi todos los TLR conocidos hasta la fecha (16). Además del TLR3, todos los TLR requieren MyD88 para la señalización corriente abajo (14, 15). Los inventores (17) y otros (18, 19) han demostrado que los péptidos A $\beta$  fibrilares requieren TLR2 para la inflamación microglial.

30 **[0004]** El documento DE 10 2015 106731 A1 se refiere a péptidos inmunogénicos y a su uso en la inmunoterapia del cáncer, particularmente en relación con los linfomas de linfocitos B.

35 **[0005]** El documento US 2016/039901 A1 se refiere a péptidos señuelo del dominio del receptor Toll/L-1 y a péptidos del dominio del receptor Toll/L-1, y a métodos para usar los péptidos en la regulación de la activación y señalización de los TLR.

40 **[0006]** El documento EP 3 647 321 A1 se refiere a un polipéptido de fusión que inhibe las vías de señalización de TLR1/2, TLR2/6, TLR7, TLR8 y TLR9, así como de TLR4 y TLR3, y a una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades mediadas por las vías de TLR.

**Resumen de las realizaciones preferidas**

45 **[0007]** La invención es tal como se expone en las reivindicaciones. Cualquier descripción que no entre dentro del alcance de las reivindicaciones se incluye únicamente a título ilustrativo.

50 **[0008]** En un aspecto que no es según la invención reivindicada, la presente invención proporciona un método para tratar un trastorno en un paciente, donde el trastorno es uno en el que la señalización de TLR2-MyD88 desempeña una función en la patogenia de la enfermedad. En una realización que no es según la invención reivindicada, el método incluye administrar al paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye un péptido que contiene el dominio de MyD88 que interactúa con TLR2. La cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que al menos reduce la señalización de TLR2-MyD88.

55 **[0009]** En una realización, en donde el dominio de MyD88 que interactúa con TLR2 incluye la secuencia PGAHQK (Id. de sec. n.º: 1). En otra realización, el dominio de MyD88 que interactúa con TLR2 contiene entre 6 y 10 aminoácidos, incluida la secuencia PGAHQK (Id. de sec. n.º: 1). En otra realización más, el péptido incluye además el homeodominio de Antennapedia unido a un extremo C del péptido que comprende un dominio de MyD88 que interactúa con TLR2. En otra realización, la secuencia peptídica es drqikiwfnrrmkwkkPGAHQK (Id. de sec. n.º: 2).  
60 En otra realización más, el péptido está unido a un vector de suministro que proporciona al menos uno de suministro intracelular a la célula y acceso a través de la barrera hematoencefálica.

65 **[0010]** En determinadas realizaciones, el trastorno es un trastorno neurológico, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Huntington o la atrofia multisistémica. En otras realizaciones, el trastorno es un trastorno autoinmunitario, por ejemplo, esclerosis múltiple o

artritis reumatoide. En otras realizaciones más, el trastorno es una infección bacteriana, una infección fúngica, una infección parasitaria, una infección vírica, una septicemia o un absceso cerebral.

5 [0011] Otro aspecto de la invención proporciona una composición que incluye la secuencia peptídica PGAHQK (Id. de sec. n.º: 1) unida a un vector de suministro que proporciona al menos uno de suministro intracelular a la célula y acceso a través de la barrera hematoencefálica. En una realización, el vector de suministro es el homeodominio de Antennapedia. En otra realización, la composición incluye un péptido que tiene la secuencia drqikiwfnrnmkwwkPGAHQK (Id. de sec. n.º: 2).

10 [0012] La composición también puede incluir al menos un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intranasal. En otras realizaciones, la composición se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en las vías oral, subcutánea, intraarticular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal e intramuscular.

### 15 Breve descripción de los dibujos

[0013] Figura 1 (A-S). Monitorización de los niveles de TLR2, TLR4 y MyD88 en el SNC de los casos diagnosticados clínicamente como ausencia de disfunción cognitiva (ADC), disfunción cognitiva leve (DCL) y enfermedad de Alzheimer (EA). (A) Los homogeneizados de la corteza prefrontal (25 µg) de ADC (azul claro), DCL (azul oscuro) y AD (gris) se sometieron a inmunoelectrotransferencia para TLR2, TLR4 y MyD88. La actina se usó para normalizar las señales obtenidas por medición densitométrica (NIH ImageJ). Se usó Coomassie para verificar la carga de proteínas. Se analizaron doce casos de ADC, once de DCL y diez de AD en tres experimentos independientes. La MyD88 (B) estaba elevada de forma significativa en EA en comparación con ADC ( $p < 0,001$ ) y DCL ( $p < 0,001$ ). El TLR2 (C) era significativamente mayor en sujetos con EA en comparación con DCL ( $p < 0,05$ ) según la prueba de Kruskal-Wallis. TLR4 (D) no difirió significativamente entre los tres grupos. La MyD88 (E; 0,371,  $p = 0,033$ ) y el TLR2 (F; 0,463,  $p = 0,007$ ) se correlacionaron positivamente con la puntuación de Braak según la prueba de Kruskal-Wallis. No se encontró tal correlación entre el TLR4 (G);  $-0,012$ ,  $p = 0,947$ ) y la puntuación de Braak. La MyD88 se correlacionó negativamente con las puntuaciones del Miniexamen Cognoscitivo (MEC) (H;  $-0,538$ ,  $p = 0,001$ ) y el índice de puntuación z cognitiva global (GCS) (I;  $-0,475$ ,  $p = -0,005$ ). Sin embargo, la correlación negativa no fue significativa para el TLR2 con el MEC (J;  $-0,278$ ,  $p = 0,117$ ) y la GCS (K;  $-0,177$ ,  $p = 0,326$ ). El TLR4 tampoco se correlacionó negativamente con el MEC (L;  $-0,173$ ,  $p = 0,336$ ) y la GCS (M; 0,047,  $p = 0,794$ ). kDa, kilodalton; OD, densidad óptica. Las secciones del hipocampo de los cerebros con ADC y EA recibieron un marcaje doble con Iba-1 (microglía) y TLR2, TLR4 o MyD88. Las células positivas para TLR2 (N, corteza; O, CA1), MyD88 (P, corteza; Q, CA1) y TLR4 (R, corteza; S, CA1) se contaron en dos secciones (dos imágenes por portaobjetos) de cada uno de cuatro casos diferentes.  $ap < 0,001$  frente a ADC mediante pruebas de la t de dos muestras. NS, no significativo.

Figura 2(A-H). Diseño de un péptido para la interrupción de la interacción entre TLR2 y MyD88. (A) Una pose de acoplamiento de cuerpo rígido por ordenador de TLR2 (azul) y MyD88 (verde) de ratón (energía electrostática =  $-7,750$  kcal/mol; energía de desolvatación =  $-24,99$  kcal/mol; energía de VdW =  $105,25$  kcal/mol; energía total =  $-22,216$  kcal/mol) muestra una fuerte interacción entre 245 y 250 aminoácidos del bucle CD de MyD88 y el bucle BB de TLR2. Por lo tanto, el péptido correspondiente a este dominio de MyD88 (TIDM) se usó para disociar la interacción entre TLR2 y MyD88. B) La interacción TLR2-MyD88 formó complejo con el péptido wtTIDM (energía electrostática =  $-4,516$  kcal/mol; energía de desolvatación =  $-24,027$  kcal/mol; energía de VdW =  $16,724$  kcal/mol; energía total =  $-26,871$  kcal/mol). C) Generación de la proteína recombinante TLR2 C-terminal etiquetada con cMyc (cTLR2). La afinidad de unión *in vitro* de dosis crecientes de wtTIDM (D) y mTIDM (E) con cTLR2 se examinó mediante análisis de resonancia de plasmones superficiales ( $n = 2$  réplicas/dosis en 3 experimentos independientes). F) Gráfico de los valores de la respuesta de unión frente a las concentraciones de los péptidos wtTIDM (círculo) y mTIDM (cuadrado). G) Curva de fusión de la proteína cTLR2 (negra) sola y con wtTIDM (verde). Los análisis de desplazamiento térmico mostraron un cambio de ( $\Delta T_m$ )  $4,96$  °C de la temperatura de fusión ( $n = 2$  réplicas/dosis en 3 experimentos independientes). H) La curva de fusión de la proteína cTLR2 (negra) sola y con péptidos mTIDM (rojo) indicó un  $\Delta T_m$  de  $0,87$  °C ( $n = 2$  réplicas/dosis en 3 experimentos independientes).

Figura 3(A-L). Interrupción selectiva de la interacción entre TLR2 y MyD88 por wtTIDM. Análisis por ordenador de las interacciones de wtTIDM con TLR1, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 y TLR9. Se realizó un análisis de interacciones entre cuerpos rígidos en la herramienta de análisis informático pydock. Se mostraron complejos de TLR1-wtTIDM (A), TLR4-wtTIDM (B), TLR5-wtTIDM (C), TLR6-wtTIDM (D), TLR7-wtTIDM (E) y TLR9-wtTIDM (F). Las células microgliales BV-2 preincubadas con los péptidos wtTIDM y mTIDM durante 1 h se estimularon con A $\beta$ 1-42 fibrilar  $1$  µM en condiciones sin suero. Después de 1 h, los extractos celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-MyD88 seguido de una transferencia de western de inmunoprecipitados para el TLR2. Como control, los extractos celulares se inmunoprecipitaron con IgG normal. La entrada también se inmunoblotó con TLR2 y MyD88. H) Se escanearon las bandas y los valores (TLR2/entrada) se presentaron en relación con el control ( $n = 2$  réplicas/condición en 3 experimentos independientes). Los resultados se analizaron mediante pruebas de la t de dos muestras. I) Las células microgliales BV-2 preincubadas con los péptidos wtTIDM y mTIDM durante 1 h se estimularon con LPS en condiciones sin suero. Después de 1 h, los extractos celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-MyD88 seguido de una transferencia de western de inmunoprecipitados para el TLR4. Como control,

los extractos celulares se inmunoprecipitaron con IgG normal. La entrada también se inmunobloteó con TLR4 y MyD88. J) Se escanearon las bandas y los valores (TLR4/entrada) se presentaron en relación con el control (n = 2 réplicas/condición en 3 experimentos independientes). Los resultados se analizaron mediante pruebas de la t de dos muestras. K) Las células microgliales BV-2 se transdujeron con lentiviriones pLenti-cMyc-cTlr2 y, 48 h después de la transducción, las células se trataron con wtTIDM y mTIDM durante 1 h, seguido de estimulación con A $\beta$ 1-42 fibrilar. Después de 1 h, los extractos celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-MyD88 seguido de una transferencia de western de inmunoprecipitados para el c-Myc. Las fracciones inmunoempobrecidas (ID) también se sometieron a inmunoelectrotransferencia para detectar c-Myc como control. L) Se escanearon las bandas y los valores (c-Myc/entrada) se presentaron en relación con el control (n = 2 réplicas/condición en 3 experimentos independientes). Los resultados se analizaron mediante pruebas de la t de dos muestras.

Figura 4(A-R). Efecto de los péptidos wtTIDM y mTIDM sobre la inducción de la activación del NF- $\kappa$ B y la expresión de moléculas proinflamatorias en las células microgliales. Las células microgliales BV-2 preincubadas con péptidos wtTIDM/mTIDM 10  $\mu$ M durante 1 h se estimularon con A $\beta$ 1-42 fibrilar (A-C) 1  $\mu$ M, MPP+ (D-F) 1  $\mu$ M, LTA (G-I) 250 ng/ml, LPS (J-L) 1  $\mu$ g/ml, flagelina (M-O) 1  $\mu$ M y ADN CpG (P-R) 1  $\mu$ M en condiciones sin suero. Tras 1 h de estimulación, se monitorizó la activación de NF- $\kappa$ B en extractos nucleares mediante EMSA (A, A $\beta$  fibrilar; D, MPP+; G, LTA; J, LPS; M, flagelina, P; ADN CpG). Tras 4 h de estimulación, se monitorizó la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$  (B, E, H, K, N y Q) e iNOS (C, F, I, L, O y R) mediante PCR en tiempo real (B-C, A $\beta$  fibrilar; E-F, MPP+; H-I, LTA; K-L, LPS; N-O, flagelina; Q-R, ADN CpG) (n = 2 réplicas/dosis en 3 experimentos independientes). ap < 0,001 frente al control; bp < 0,001 frente a los estímulos mediante pruebas de la t de dos muestras.

Figura 5 (A-Q). Tras la administración intranasal, el péptido wtTIDM entra en el hipocampo y suprime la activación glial y reduce las placas en el hipocampo de los ratones Tg. Los ratones Tg (de 6 meses de edad) recibieron una dosis del péptido wtTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal) por vía intranasal. Después de 60 minutos de tratamiento, los ratones se perfundieron con solución salina estéril y los hipocampos se homogeneizaron y el sobrenadante se analizó para determinar el wtTIDM mediante espectrometría de masas acoplada a ionización por electronebulización (ESI-MS) (A, estándar de wtTIDM; B, Tg no tratada; C, Tg tratados con wtTIDM). Los ratones Tg se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) por vía intranasal. Después de 30 días, las secciones del hipocampo recibieron marcaje doble para Iba-1 y P-p65 (D) e Iba-1 e iNOS (figura 16). Las células positivas para Iba-1 (E, CA1; F, CA3), P-p65 (G, CA1; H, CA3) e iNOS (I, CA1; J, CA3) se contaron en dos secciones (dos imágenes por portaobjetos) de seis ratones diferentes (n = 6) por grupo. ap < 0,001 frente a no Tg; bp < 0,001 frente a Tg mediante pruebas de la t de dos muestras. Los extractos del hipocampo de todos los grupos de ratones (n = 4 por grupo) se sometieron a inmunoelectrotransferencia para detectar iNOS (K). La actina se ejecutó como control de carga. Se escanearon las bandas y los valores (iNOS/actina) se presentaron en relación con el control no Tg. ap < 0,001 frente a no Tg; bp < 0,001 frente a Tg mediante pruebas de la t de dos muestras. M) Las secciones del hipocampo se inmunomarcaron con el mAb 82E1. Las placas amiloides (N, corteza; O, hipocampo) se contaron en dos secciones (dos imágenes por portaobjetos) de seis ratones diferentes por grupo. ap < 0,001 frente a no Tg; bp < 0,001 frente a Tg mediante pruebas de la t de dos muestras. P) Los extractos del hipocampo (n = 4 por grupo) se analizaron para determinar la A $\beta$  mediante transferencia de Western utilizando el mAb 6E10. La punta de flecha indica una banda A $\beta$  de 4 kDa. Se escanearon las bandas y los valores (A $\beta$ /actina) se presentaron en relación con el control no Tg (Q). ap < 0,001 frente a no Tg; bp < 0,001 frente a Tg mediante pruebas de la t de dos muestras.

Figura 6 (A-N). La administración intranasal del péptido wtTIDM, pero no del mTIDM, inhibe la apoptosis neuronal *in vivo* en el hipocampo y mejora la memoria y el aprendizaje en ratones Tg. Los ratones Tg (de 6 meses de edad) se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) por vía intranasal. Después de 30 días de tratamiento, los ratones se sacrificaron y las secciones del hipocampo recibieron marcaje doble para TUNEL y NeuN (A). Las células positivas para TUNEL (B, CA1; C, CA3) se contaron en dos secciones (dos imágenes por portaobjetos) de seis ratones diferentes (n = 6) por grupo. ap < 0,001 frente a no Tg; bp < 0,001 frente a Tg mediante pruebas de la t de dos muestras. Los extractos del hipocampo de todos los grupos de ratones (n = 4) se sometieron a inmunoelectrotransferencia para detectar la caspasa 3 (D) escindida. La actina se ejecutó como control de carga. E) Se escanearon las bandas y los valores (caspasa 3 escindida/actina) se presentan en relación con el control no Tg. Los resultados se expresan como la media + EEM de cuatro ratones por grupo. ap < 0,001 frente a no Tg; bp < 0,001 frente a Tg mediante pruebas de la t de dos muestras. Los niveles de proteína de PSD-95, NR2A y GluR1 se monitorizaron en extractos del hipocampo mediante transferencia de Western (F). Se escanearon las bandas y los valores (G, PSD-95/actina; H, NR2A/actina; I, GluR1/actina) se presentan en relación con el control no Tg. Los resultados se expresan como la media + EEM de cuatro ratones por grupo. ap < 0,001 frente a no Tg; bp < 0,001 frente a Tg mediante pruebas de la t de dos muestras. Los ratones se sometieron a los ensayos del laberinto de Barnes (J, latencia; K, número de errores cometidos) y laberinto en T (L, número de giros positivos; M, número de giros negativos). La memoria a corto plazo también se monitorizó mediante una nueva prueba de reconocimiento de objetos, que está representada por el índice de discriminación (N). Se usaron ocho ratones (n = 8) en cada grupo y los resultados se analizaron mediante ANOVA unidireccional.

Figura 7 (A-V). El péptido wtTIDM, pero no el mTIDM, protege a los ratones de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) y la artritis inducida por colágeno (AIC). A) La EAE se indujo en ratones C57/BL6 machos mediante la inmunización con MOG35-55 y, a partir de 10 dpi, los ratones se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/día) por vía intranasal. Los ratones (n = 6 por grupo en dos experimentos

independientes) se puntuaron diariamente. Como resulta evidente por el ANOVA unidireccional de medidas repetidas, el péptido wtTIDM protegió significativamente a los de EAE [F2, 94 = 22,59 (>F<sub>c</sub> = 3,093)]. Con 22 dpi, las actividades motoras generales se monitorizaron utilizando el sistema de actividad de campo abierto Ethovision XT 13.0 (Noldus) (B, imágenes de gráficos cromáticos que representan las actividades motoras generales; C, distancia recorrida; D, levantamiento; E, velocidad; F, aceleración) y rueda giratoria (G). También se realizó análisis de la huella de la pata (H, longitud de zancada; I, longitud de impresión; J, longitud de balanceo; K, dedo extendido). L) La CIA se indujo en ratones DBA/1J machos mediante la inmunización con colágeno de tipo II y, a partir de 29 dpi, los ratones se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (1 mg/kg de peso corporal/día) mediante inyección i.p. Los ratones (n = 6 por grupo en dos experimentos independientes) se puntuaron diariamente. El ANOVA unidireccional de medidas repetidas muestra que el péptido wtTIDM protegió significativamente a los de AIC [F2, 45 = 4,927 (>F<sub>c</sub> = 3,093)]. Con 60 dpi, las actividades motoras generales se monitorizaron mediante el sistema Ethovision (M, imágenes de gráficos cromáticos que representan las actividades motoras generales; N, distancia recorrida; O, levantamiento; P, velocidad), rueda giratoria (Q) y fuerza de agarre (R). También se realizó análisis de la huella de la pata (S, longitud de zancada; T, longitud de impresión; U, longitud de balanceo; V, extensión del dedo). Se usaron seis ratones (n = 6 por grupo) en dos experimentos independientes. ap < 0,001 y bp < 0,05 frente al control; cp < 0,001 y dp < 0,05 frente a EAE o AIC mediante pruebas de la t de dos muestras.

Figura 8 (A-D) Monitorización de TLR2, TLR4 y MyD88 en el SNC de los casos diagnosticados clínicamente como ausencia de disfunción cognitiva (ADC) y enfermedad de Alzheimer (EA). Las secciones del hipocampo de los cerebros con ADC y EA recibieron un marcaje doble con Iba-1 (microglía) y TLR2 (A), Iba-1 y MyD88 (B) e Iba-1 y TLR4 (C). Los resultados representan el análisis de dos secciones de cada uno de cuatro cerebros diferentes. Las células positivas para Iba1 (D, corteza; E, CA1) se contaron en dos secciones (dos imágenes por portaobjetos) de cada uno de cuatro casos diferentes. ap < 0,001 frente a ADC mediante pruebas de la t de dos muestras.

Figura 9 (A-D) Estado del TLR2 en el SNC de ratones no Tg y Tg (5XFAD). A-B) Las secciones del hipocampo de cerebros de ratones no Tg y Tg de seis meses de edad recibieron marcaje doble con Iba-1 (microglía) y TLR2. Los resultados representan el análisis de dos secciones de cada uno de los seis ratones diferentes. C) Los extractos del hipocampo de todos los grupos de ratones (n = 4) se sometieron a inmunoelectrotransferencia para detectar el TLR2. La actina se ejecutó como control de carga. D) Se escanearon las bandas mediante el programa informático NIH Image J y los valores (TLR2/actina) se presentan en relación con el control no Tg. ap < 0,001 frente a no Tg mediante la prueba de la t de dos muestras.

Figura 10 (A-D). Estado del MyD88 en el SNC de ratones no Tg y Tg (5XFAD). A-B) Las secciones del hipocampo de cerebros de ratones no Tg y Tg de seis meses de edad recibieron marcaje doble con Iba-1 (microglía) y MyD88. Los resultados representan el análisis de dos secciones de cada uno de los seis ratones diferentes. C) Los extractos del hipocampo de todos los grupos de ratones (n = 4) se sometieron a inmunoelectrotransferencia para detectar el MyD88. La actina se ejecutó como control de carga. D) Se escanearon las bandas mediante el programa informático NIH Image J y los valores (MyD88/actina) se presentan en relación con el control no Tg. ap < 0,001 frente a no Tg mediante la prueba de la t de dos muestras.

Figura 11 (A-G). Implementación de una estrategia de modelado de homología por ordenador para construir la estructura del dominio que interactúa con el TLR de diferentes TLR de ratón. Las estructuras iniciales de los TIR (A, TLR1; B, TLR2; C, TLR4; D, TLR5; E, TLR6; F, TLR7; G, TLR9) se modelaron mediante Deep View 3.7β2, una herramienta de análisis macromolecular en línea del Expert Protein Analytical System (ExpASy). La calidad de cada estructura modelada se evaluó con la herramienta Quality Measurement Analysis (QMEAN).

Figura 12 (A-E). Análisis de acoplamiento de wtTIDM y mTIDM en complejo con el dominio TIR de la proteína TLR2. A) Análisis estructural por ordenador del dominio TIR del péptido TLR2 y wtTIDM. La pose de acoplamiento se obtuvo de la herramienta de acoplamiento proteína-proteína de cuerpo rígido pydock. La estructura más estable se obtuvo del visualizador Jmol y se mostró. B) Se realizó un análisis similar con mTIDM. C) Otros análisis revelaron una fuerte interacción electrostática entre wtTIDM y TLR2 (~2,31 Å<sup>2</sup>; izquierda) y una débil interacción con mTIDM (~7,26 Å<sup>2</sup>; derecha) (D) Una vista más cercana a un complejo entre el bucle BB de TLR2 (azul) y el bucle CD de MYD88 (verde). Se demostró que las gotículas de VdW se superponían entre sí. E) Las nubes de VdW de MYD88 (rosa) se alejaban de las de TLR2 (azul) cuando formaban complejos con wtTIDM (verde).

Figura 13 (A-F). Efecto de los péptidos wtTIDM y mTIDM sobre la expresión de moléculas proinflamatorias en las células microgliales. Las células microgliales BV-2 preincubadas con péptidos wtTIDM/mTIDM 10 μM durante 1 h se estimularon con Aβ1-42 fibrilar (A) 1 μM, MPP+ (B) 1 μM, LTA (C) 250 ng/ml, LPS (D) 1 μg/ml, flagelina (E) 1 μM y ADN CpG (F) 1 μM. Después de 4 h de estimulación, la expresión del ARNm de IL-1β e iNOS se monitorizó mediante RT-PCR (n = 2 réplicas/condición en 3 experimentos independientes).

Figura 14 (A-D). Efecto de los péptidos wtTIDM y mTIDM sobre la activación mediada por poliIC de la activación del NF-κB y la expresión de moléculas proinflamatorias en las células microgliales. Las células microgliales BV-2 preincubadas con los péptidos wtTIDM/mTIDM 10 μM durante 1 h se estimularon con poliIC 50 μM. A) Tras 1 h de estimulación, se monitorizó la activación de NF-κB en extractos nucleares mediante EMSA. Tras 4 h de estimulación, la expresión del ARNm de IL-1β e iNOS se monitorizó mediante RT-PCR semicuantitativa (B) y PCR en tiempo real

(C, IL-1 $\beta$ ; D, iNOS) (n = 2 réplicas/condición en 3 experimentos independientes). ap < 0,001 frente al control; bp < 0,001 frente a los estímulos mediante pruebas de la t de dos muestras.

5 Figura 15 (A-F). Efecto del péptido wtTIDM sobre la translocación nuclear fibrilar de p65 y p50 inducida por A $\beta$  y LPS en células microgliales. Las células microgliales BV-2 preincubadas con el péptido wtTIDM 10  $\mu$ M durante 1 h se estimularon con A $\beta$ 1-42 fibrilar (A-C) 1  $\mu$ M o LPS 1  $\mu$ g/ml en condiciones sin suero. A diferentes intervalos de minutos, los niveles de p65 y p50 (A, A $\beta$  fibrilar; D, LPS) se monitorizaron en extractos nucleares mediante transferencia de Western. La histona H3 se utilizó como control de carga. Se escanearon las bandas y los valores de p65/H3 (B y E) y p50/H3 (C y F) se presentan en relación con el control (n = 2 réplicas/condición en 3 experimentos independientes). ap < 0,05, bp < 0,001 frente al control; cp < 0,01 frente a 30 min de estimulación; dp < 0,05 frente a 15 min de estimulación; NS, no significativo en las pruebas de la t de dos muestras.

15 Figura 16 (A-F). El péptido wtTIDM siguió siendo incapaz de inhibir la activación del NF- $\kappa$ B mediada por el péptido A $\beta$ 1-42 fibrilar y la expresión de moléculas proinflamatorias en la microglía TLR2 (-/-). La microglía primaria aislada de ratones WT (A) y TLR2 (-/-) (B) se trató con diferentes concentraciones del péptido wtTIDM durante 1 h, seguida de estimulación con A $\beta$ 1-42 fibrilar 1  $\mu$ M en condiciones sin suero. Tras 1 h de estimulación, se monitorizó la activación de NF- $\kappa$ B mediante EMSA. La microglía WT (C y D) y TLR2 (-/-) (E y F) se trató con diferentes concentraciones de los péptidos wtTIDM y mTIDM durante 1 h, seguida de estimulación con A $\beta$ 1-42 fibrilar 1  $\mu$ M en condiciones sin suero. Tras 18 h de estimulación, los niveles de TNF $\alpha$  (C y E) e IL-1 $\beta$  (D y F) se monitorizaron en los sobrenadantes mediante ELISA (n = 2 réplicas/condición en 3 experimentos independientes). ap < 0,001 frente a control; bp < 0,001 frente a los estímulos mediante pruebas de la t de dos muestras.

25 Figura 17. Tras la administración intranasal, el péptido wtTIDM entra en el hipocampo de los ratones Tg. El péptido wtTIDM se marcó con el colorante Alexa 680-SE NIR (Life Technologies) siguiendo el protocolo del fabricante y se administró el péptido marcado con Alexa 680 (2,5  $\mu$ g) a cada ratón por vía intranasal. También se administró el colorante Alexa 680-SE NIR como control. Después de 60 minutos, los ratones (n = 3 en cada grupo) se perfundieron con PBS y paraformaldehído y las regiones del hipocampo del cerebro se escanearon en un escáner de infrarrojos Odyssey (ODY-0854, Licor-Inc) en canales de 700 y 800 nm. El fondo rojo provenía del filtro de 800 nm, mientras que la señal verde provenía del péptido NBD marcado con Alexa 680 en un canal de 700 nm.

30 Figura 18 (A-B). Tras la administración intranasal, el péptido wtTIDM suprime la activación del NF- $\kappa$ B en el hipocampo de los ratones Tg. Los ratones Tg (de 6 meses de edad) se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) por vía intranasal. Después de 30 días de tratamiento, los extractos del hipocampo de todos los grupos de ratones se sometieron a inmunoelectrotransferencia para detectar el fosfo-p65 (A). La actina se ejecutó como control de carga. Se escanearon las bandas y los valores (p-p65/actina) se presentan en relación con el control no Tg (n = 4 en dos experimentos independientes). ap < 0,001 frente a no Tg; bp < 0,001 frente a Tg mediante pruebas de la t de dos muestras.

40 Figura 19. La administración intranasal del péptido wtTIDM, pero no del mTIDM, suprime la expresión microglial de iNOS en el hipocampo de los ratones Tg. Los ratones Tg (de 6 meses de edad) se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) por vía intranasal. Después de 30 días de tratamiento, los ratones se sacrificaron y las secciones del hipocampo recibieron marcaje doble para Iba-1 e iNOS. Los resultados representan el análisis de dos secciones de cada uno de los seis ratones diferentes por grupo.

45 Figura 20 (A-B). La administración intranasal del péptido wtTIDM, pero no del mTIDM, reduce la carga de placas amiloides en el hipocampo de los ratones Tg. A) Los ratones Tg (de 6 meses de edad) se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) por vía intranasal. Después de 30 días de tratamiento, los extractos del hipocampo de todos los grupos de ratones (n = 4 por grupo) se analizaron para determinar los niveles de proteína A $\beta$  mediante transferencia de Western utilizando el mAb 82E1. La actina se ejecutó como control de carga. B) Se escanearon las bandas y los valores (A $\beta$ /actina) se presentaron en relación con el control no Tg. Los resultados se analizaron mediante pruebas de la t de dos muestras.

50 Figura 21 (A-F). La administración intranasal del péptido wtTIDM, pero no del mTIDM, reduce los niveles de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 en el suero y el hipocampo de los ratones Tg. Los ratones Tg (de 6 meses de edad) se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) por vía intranasal. Después de 30 días de tratamiento, se realizó una cuantificación por ELISA de A $\beta$ 1-40 (A, C y E) y A $\beta$ 1-42 (B, D y F) en tejidos del hipocampo extraídos con suero (A y B) y TBS (C y D) y (TBS+Triton X-100) (E y F). Se usaron seis ratones (n = 6 por grupo) en dos experimentos independientes. ap < 0,01 y cp < 0,001 frente a no Tg; bp < 0,01 y < 0,001 frente a Tg mediante pruebas de la t de dos muestras.

60 Figura 22 (A-B). La administración intranasal del péptido wtTIDM, pero no del mTIDM, disminuye la fosforilación de tau en el hipocampo de los ratones Tg. A) Los ratones Tg (de 6 meses de edad) se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) por vía intranasal. Después de 30 días de tratamiento, los extractos del hipocampo de todos los grupos de ratones (n = 4 por grupo) se analizaron para determinar la fosfo-tau y la tau total mediante transferencia de Western. B) Se escanearon las bandas y los valores (P-Tau/Tau) se presentaron en relación con el control no Tg. Los resultados se analizaron mediante pruebas de la t de dos muestras.

Figura 23 (A-D). La administración intranasal de los péptidos wtTIDM y mTIDM no modula las actividades locomotoras de los ratones Tg. Los ratones Tg (de 6 meses de edad) se trataron con los péptidos wtTIDM y mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) por vía intranasal. Después de 30 días de tratamiento, se analizó la actividad locomotora general de los ratones (A, número de movimientos; B, actividad horizontal; C, tiempo de descanso; D, número de estereotipia). Se usaron ocho ratones (n = 8 en dos experimentos independientes) en cada grupo. NS, no significativo.

Figura 24 (A-H). La administración intranasal del péptido wtTIDM no reduce las placas ni mejora la memoria en ratones Tg FAD5X que carecen de Tlr2 (Tg-Tlr2<sup>-/-</sup>). A) Los ratones Tlr2<sup>-/-</sup> se criaron con Tg (ratones 5XFAD) y se muestra una PCR representativa de la expresión del ADN de los transgenes Tlr2, App695 y Psen1 en ratones de 6 meses no Tg, Tg (5XFAD), Tg-Tlr2<sup>-/-</sup> (F7) y Tlr2<sup>-/-</sup>. Peso corporal promedio (B) y peso cerebral húmedo (C) de ratones no Tg, Tg, Tg-Tlr2<sup>-/-</sup> y Tlr2<sup>-/-</sup>. Para el peso cerebral húmedo, se extirparon los lóbulos olfativos y el tronco encefálico. Los ratones Tg-Tlr2<sup>-/-</sup> (de 6 meses de edad) se trataron con el péptido wtTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) por vía intranasal. Tras 30 días de tratamiento, las secciones del hipocampo se inmunomarcaron con el mAb 6E10 (D). Las placas amiloides se contaron en dos secciones (dos imágenes por portaobjetos) de cuatro ratones diferentes por grupo (E). Los ratones se sometieron a los ensayos del laberinto de Barnes (F, trazado de seguimiento; G, latencia; H, número de errores cometidos). Se usaron cuatro ratones (n = 4) en cada grupo. NS, no significativo en las pruebas de la t de dos muestras.

Figura 25 (A-D). Análisis de la huella de ratones con EAE después del tratamiento con los péptidos wtTIDM y mTIDM. En la pista de marcha, se aplicaron tiras de papel blanco y se obtuvieron las huellas de ratones de diferentes grupos (A, control; B, EAE; C, EAE+wtTIDM; D, EAE+mTIDM) sobre papel con tinta negra. Se determinó un total de 30-40 pasos para cada grupo. Se calcularon cuatro medidas de huella diferentes, a saber, la longitud de zancada (SL), la longitud de impresión (PL), la longitud de balanceo (SWL) y la extensión de los dedos (TS) en centímetros a partir de las huellas registradas de los ratones. Mientras que la SL se refiere a la distancia entre el borde frontal de dos impresiones consecutivas de la misma pata, la SWL se refiere a la distancia entre las patas perpendicular a la distancia de desplazamiento y la PL indica la medida de la longitud del área de impresión. Por otro lado, la TS se refiere a la distancia entre el primer y el quinto dedo de la huella de la pata. Se usaron seis ratones (n = 6 por grupo) en dos experimentos independientes.

Figura 26 (A-D). Análisis de la huella de ratones con AIC después del tratamiento con los péptidos wtTIDM y mTIDM. En la pista de marcha, se aplicaron tiras de papel blanco y se obtuvieron las huellas de ratones de diferentes grupos (A, control; B, CIA; C, AIC+wtTIDM; D, CIA+mTIDM) sobre papel con tinta negra. Se determinó un total de 30-40 pasos para cada grupo. Se calcularon cuatro medidas de huella diferentes (SL, PL, SWL y TS) en centímetros a partir de las huellas registradas de los ratones. Se usaron seis ratones (n = 6 por grupo) en dos experimentos independientes.

Figura 27. Morfología de los péptidos fibrilares Aβ1-42. Se prepararon péptidos fibrilares Aβ1-42 (Bachem Bioscience) incubando péptidos recién solubilizados a 50 μM en agua destilada estéril a 37 °C durante 5 días. La morfología de los péptidos Aβ1-42 fibrilares se examinó mediante microscopía electrónica de transmisión.

Figura 28 (A-B). El péptido wtTIDM intranasal atenúa la inflamación microglial en la sustancia negra de los ratones Tg A53T α-sin. Los ratones A53T (machos; 9 meses de edad; n = 6 por grupo) se trataron con péptidos TIDM por vía intranasal a una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal/día durante 30 días, seguido de un análisis de inmunofluorescencia doble de las secciones de la sustancia negra para detectar la Iba-1 y el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (A). Las imágenes ampliadas del área seleccionada se muestran en la fila inferior. Las células iNOS (positivas) se contaron en dos secciones de cada uno de los seis ratones por grupo y se presentaron como células/mm<sup>2</sup>.

Figura 29 (A-B). El péptido wtTIDM intranasal estimula la expresión microglial de la arginasa-1 en la sustancia negra de ratones Tg A53T α-sin. Los ratones A53T (machos; 9 meses de edad; n = 6 por grupo) se trataron con péptidos TIDM por vía intranasal a una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal/día durante 30 días, seguido de un análisis de inmunofluorescencia doble de las secciones de la sustancia negra para detectar la Iba-1 y la arginasa-1 (ARG1) (A). Las imágenes ampliadas del área seleccionada se muestran en la fila inferior. Las células ARG-1 (positivas) se contaron en dos secciones de cada uno de los seis ratones por grupo y se presentaron como células/mm<sup>2</sup>.

Figura 30 (A-C). El péptido wtTIDM intranasal reduce la α-sinucleinopatía en la sustancia negra de los ratones Tg A53T α-sin. Los ratones A53T (machos; 9 meses de edad; n = 6 por grupo) se trataron con péptidos TIDM por vía intranasal a una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal/día durante 30 días, seguido de un análisis de transferencia de Western de los extractos de la sustancia negra para detectar la α-sin (A). Las bandas se escanearon y se presentaron en relación con el control A53T (B, α-sin monomérica; C, α-sin oligomérica). Los resultados son la media + SEM de seis ratones por grupo.

Figura 31 (A-D). El péptido wtTIDM intranasal reduce la α-sinucleinopatía en la sustancia negra de los ratones Tg A53T α-sin. Los ratones A53T (machos; 9 meses de edad; n = 6 por grupo) se trataron con péptidos TIDM por vía

intranasal a una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal/día durante 30 días, seguido de un análisis de inmunofluorescencia doble de las secciones de la sustancia negra para detectar la TH y la  $\alpha$ -sin (Ab mjr1) (A). Las imágenes ampliadas del área seleccionada se muestran en la columna izquierda. Se calcularon el área total (B), el tamaño promedio (C) y la densidad integrada (D) de los cuerpos celulares positivos para  $\alpha$ -sin. Se analizaron cinco células de cada una de las dos secciones de la sustancia negra de seis ratones por grupo.

Figura 32 (A-B). El péptido wtTIDM intranasal reduce la  $\alpha$ -sinucleinopatía en la sustancia negra de los ratones Tg A53T  $\alpha$ -sin. Los ratones A53T (machos; 9 meses de edad; n = 6 por grupo) se trataron con péptidos TIDM por vía intranasal a una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal/día durante 30 días, seguido de un análisis de inmunofluorescencia doble de las secciones de la sustancia negra para detectar el marcador microglial Iba-1 y la  $\alpha$ -sin (Ab mjr1) (A). Las imágenes ampliadas del área seleccionada se muestran en la columna izquierda. Se calculó la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los cuerpos celulares positivos para ( $\alpha$ -syn+Iba-1). Se analizaron cinco células de cada una de las dos secciones de la sustancia negra de seis ratones por grupo.

Figura 33 (A-E). El péptido wtTIDM intranasal mejora las actividades locomotoras de los ratones Tg A53T  $\alpha$ -sin. Los ratones A53T (machos; 9 meses de edad; n = 6 por grupo) se trataron con péptidos TIDM por vía intranasal a una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal/día durante 30 días, seguido de monitorización de las actividades locomotoras mediante el sistema de actividad de campo abierto Ethovision XT 13.0 (Noldus) (A, trazado de seguimiento; B, duración acumulada en movimiento; C, distancia; D, velocidad; E, rueda giratoria). Los resultados son la media + SEM de seis ratones por grupo.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

#### Definiciones

**[0014]** A menos que se definan de cualquier otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, la presente memoria, incluidas las definiciones, tendrá prevalencia. A continuación, se describen métodos y materiales preferidos, aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de la presente invención.

**[0015]** Los usos de los términos “un” y “uno/a” y “el/la” y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse en el sentido de que abarcan tanto el singular como el plural, salvo que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. La enumeración de los intervalos de valores en la presente memoria solo tiene como objetivo servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor independiente que se encuentre dentro del intervalo, salvo que se indique lo contrario en la presente memoria, y cada valor independiente se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria pueden realizarse en cualquier orden adecuado, salvo que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones ilustrativas (por ejemplo, “tal como”, “por ejemplo”) proporcionados en la presente memoria, tiene como objetivo simplemente aclarar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión de la memoria descriptiva debe interpretarse en el sentido de que indique que ningún elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

**[0016]** El término “paciente” se refiere a un paciente humano o veterinario.

**[0017]** La expresión “efecto terapéutico”, como se utiliza en la presente memoria, significa un efecto que induce, alivia o provoca de cualquier otro modo una mejora en los síntomas patológicos, el avance de la enfermedad o las afecciones fisiológicas asociadas o la resistencia a sucumbir a un trastorno, por ejemplo, el neurológico, autoinmunitario o de otro tipo descrito en la presente memoria, de un paciente humano o veterinario. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa con respecto a un fármaco, significa una cantidad del fármaco que transmite un efecto terapéutico al paciente humano o veterinario.

**[0018]** Las composiciones y los métodos que proporcionan una interrupción selectiva de la interacción entre TLR2/MyD88 inhiben la inflamación y atenúan la patología neurológica y de otras enfermedades.

**[0019]** El solicitante ha demostrado que los niveles de TLR2 y MyD88 aumentaron *in vivo* en la corteza frontal y el hipocampo de pacientes con EA y ratones 5XFAD. No hay ninguna opción disponible para la focalización específica del TLR2 inducido. El solicitante ha diseñado un péptido correspondiente al dominio que interactúa con el TLR2 de MyD88 (TIDM) que inhibió específicamente la señalización inducida del TLR2 y la inflamación microglial mediada por el A $\beta$  fibrilar sin modular la activación microglial mediada por el ARN bicatenario, el LPS bacteriano, la flagelina, el ADN CpG y el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+). Además, la administración intranasal del péptido TIDM redujo la activación microglial del hipocampo, disminuyó la carga de A $\beta$ , suprimió la apoptosis neuronal y mejoró la memoria y el aprendizaje en ratones 5XFAD, lo que puso de relieve la promesa terapéutica del péptido TIDM en la EA.

**[0020]** La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos para tratar trastornos en los que la activación elevada del TLR2 desempeña una función en la patogenia de la enfermedad. Una realización que no es según la invención reivindicada del método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye una secuencia peptídica correspondiente al dominio que interactúa con TLR2 de MyD88 (TIDM) que se une al bucle BB solo de TLR2, pero no de otros TLR, e interrumpe la asociación entre TLR2 y MyD88. La composición inhibe las vías de señalización transducidas únicamente por TLR2.

**[0021]** Una realización que no es según la invención reivindicada proporciona un método para tratar un trastorno en un paciente, método que comprende administrar al paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un péptido que contiene un dominio de MyD88 que interactúa con TLR2. La cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que al menos reduce la señalización de TLR2-MyD88. El trastorno es uno en el que la señalización del TLR2-MyD88 desempeña una función en la patogenia de la enfermedad. Por ejemplo, el trastorno puede ser un trastorno neurológico, tal como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Huntington o la atrofia multisistémica. En otra realización, el trastorno es un trastorno autoinmunitario, tal como la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide. En otra realización más, el trastorno es una infección bacteriana, una infección fúngica, una infección parasitaria, una infección vírica, una septicemia o un absceso cerebral.

**[0022]** En una realización, el péptido que incluye el dominio de MyD88 que interactúa con TLR2 incluye la secuencia PGAHQK (Id. de sec. n.º: 1). En otros casos, el péptido contiene entre 6 y 10 aminoácidos, incluida la Id. de sec. n.º: 1. Por ejemplo, el péptido puede contener 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, incluida la Id. de sec. n.º: 1. En otra realización, el péptido incluye menos de 12, 13, 14 o 15 aminoácidos.

**[0023]** En otra realización, el péptido está unido a un vector de suministro que proporciona al menos uno de suministro intracelular a la célula y acceso a través de la barrera hematoencefálica. El vector de suministro puede ser un péptido de otra composición. En una realización, el vector de suministro es el homeodominio de Antennapedia. Por ejemplo, el homeodominio de Antennapedia está unido a un extremo C del péptido que comprende un dominio de MyD88 que interactúa con TLR2. En una realización preferida, la secuencia peptídica es drqikiwfnrrmkwkkPGAHQK (Id. de sec. n.º: 2).

**[0024]** Es de suma importancia descifrar el mecanismo del proceso patológico de la EA y desarrollar un enfoque terapéutico neuroprotector eficaz para ralentizar o detener el avance de la enfermedad. Se sabe que los TLR resuelven la respuesta inmunitaria innata al percibir patrones moleculares asociados a patógenos y patrones moleculares asociados al daño endógeno (15). La microglía del SNC expresa la mayoría de los TLR conocidos hasta la fecha y anteriormente los inventores han demostrado que, de entre los diferentes TLR, el A $\beta$ 1-42 fibrilar requiere TLR2 para estimular la inflamación microglial (17). En consecuencia, varios estudios han ampliado este hallazgo al demostrar una interacción directa entre TLR2 y A $\beta$  o a través del CD14 (18, 19, 33). Aquí, se describe una función importante del TLR2 en la enfermedad de Alzheimer. Los inventores han detectado niveles más altos de TLR2 en el hipocampo y la corteza prefrontal de las personas con demencia de tipo EA en comparación con las personas con DCL o ADC. Si bien algunos estudios informaron sobre la participación del TLR4 en la activación microglial mediada por A $\beta$ , los inventores no han encontrado niveles más altos de TLR4 en el SNC de las personas con demencia de tipo EA, lo que indica la especificidad de su hallazgo. Se ha señalado que el polimorfismo de Tlr2 influye en la susceptibilidad a la EA (34) y las PBMC de los pacientes con EA también expresan un aumento del nivel de TLR2 (35). En consonancia con el TLR2, también se ha observado una regulación positiva de MyD88 en el SNC de personas con demencia de tipo EA y, curiosamente, tanto el TLR2 como el MyD88 se correlacionaron positivamente con la puntuación de Braak. MyD88 también se correlacionó negativamente con la función cognitiva.

**[0025]** Aunque el TLR2 es un miembro importante de la inmunidad innata, no había ningún inhibidor específico para dirigirse al TLR2. Por lo tanto, mediante el análisis estructural de la interacción entre TLR2 y MyD88, los inventores han diseñado un péptido correspondiente al dominio de MyD88 que interactúa con TLR2 (TIDM) del bucle CD. Dado que el bucle BB de TLR2 interactúa con el bucle CD de MyD88, el péptido wtTIDM interrumpe la asociación entre TLR2 y MyD88. Curiosamente, el péptido wtTIDM se acopla de manera que se dirija específicamente al bucle BB del TLR2, pero no a otros TLR, lo que inhibe las vías de señalización transducidas únicamente por el TLR2. Dado que el péptido wtTIDM se dirige específicamente al TLR2 y el A $\beta$ 1-42 fibrilar requiere TLR2 para la activación microglial (17, 18), el péptido wtTIDM inhibe la activación del NF- $\kappa$ B microglial y la inflamación inducidas solo por el LTA (un agonista conocido del TLR2) y el A $\beta$ 1-42 fibrilar, pero no por el MPP+, el poli IC (un agonista del TLR3), el LPS (un agonista del TLR4), la flagelina (un agonista del TLR5) y el ADN CpG (un agonista del TLR9), lo que indica la inhibición selectiva de la vía del TLR2 por el péptido wtTIDM. Además, en consonancia con la interrupción de la interacción TLR2:MyD88, el péptido wtTIDM no funciona en ausencia de TLR2.

**[0026]** Los péptidos no modificados suelen tener vidas medias cortas debido a la rápida proteólisis en la sangre, los riñones o el hígado y/o al aclaramiento renal acelerado, que son los principales desafíos de la mayoría de las terapias con péptidos. Sin embargo, se ha demostrado que la penetratina, el péptido penetrante celular derivado del homeodominio de antennapedia de *Drosophila* (homeodominio Antennapedia), al ser rico en residuos con carga positiva, ayuda a los péptidos de carga a transportarse a las células, evitando por lo tanto una proteólisis rápida (36, 37). Además, los péptidos no modificados no entran en el SNC y se ha visto que la penetratina puede atravesar la

estrecha red endotelial y transportar los péptidos a través de la BHE (23, 38). Por lo tanto, los inventores probaron la eficacia del péptido wtTIDM que contiene penetratina en ratones Tg y demostraron que el péptido wtTIDM reducía la inflamación microglial, disminuía la apoptosis neuronal y protegía la función cognitiva de la toxicidad de la EA. Nuestras conclusiones se basan en lo siguiente. En primer lugar, después de la administración intranasal, el péptido TIDM entró en el hipocampo. En segundo lugar, el péptido wtTIDM, pero no el mTIDM, inhibió la activación hipocámpica del NF- $\kappa$ B y la inflamación microglial en ratones Tg. En tercer lugar, el péptido wtTIDM, pero no el mTIDM, protegió a las neuronas del hipocampo y a las proteínas receptoras NMDA y AMPA de la toxicidad del Alzheimer en ratones Tg. En cuarto lugar, el péptido wtTIDM, pero no el mTIDM, también mejoró el aprendizaje espacial y la memoria en ratones Tg. Además, no se observó ningún efecto secundario relacionado con el fármaco (por ejemplo, pérdida del cabello, pérdida del apetito, pérdida de peso, infección adversa, etc.) en ninguno de los ratones tratados con TIDM utilizados durante el estudio. Sin embargo, un estudio ha demostrado que la atenuación genética del TLR2 acelera el declive cognitivo en ratones Tg APP (39). Definitivamente es posible, ya que la atenuación completa del TLR2 elimina las vías de señalización del TLR2 basales e inducidas. Además, se ha demostrado que el TLR2 funciona a través de vías tanto dependientes como independientes de MyD88 (40, 41) y la belleza de este hallazgo es que el péptido TIDM se dirige solo a la vía de señalización del TLR2 inducida dependiente de MyD88 sin inhibir la actividad basal del TLR2.

**[0027]** Ya sea que las placas estén directamente relacionadas con la pérdida de memoria en la EA o no, la placa amiloide es una de las características patológicas de la EA y también es importante observar que el tratamiento con péptidos wtTIDM, pero no con mTIDM, redujo la carga de placas del hipocampo en ratones Tg. Sin embargo, en la actualidad, no se sabe cómo el tratamiento con el péptido wtTIDM se acopla a la reducción de las placas. La beta-secretasa 1 (BACE1) es la enzima clave que inicia la formación de la A $\beta$  y se ha demostrado que la inhibición de la NF- $\kappa$ B evita la transactivación del promotor de la BACE1 inducida por la A $\beta$  y que la sobreexpresión de la  $\beta$ APP natural o con mutación sueca no modifica la transactivación de las construcciones promotoras de la BACE1 que carecen del elemento sensible al NF- $\kappa$ B (42). Dado que el péptido wtTIDM suprime la activación del NF- $\kappa$ B inducida por A $\beta$ , es posible que el péptido wtTIDM reduzca la carga de placa en los ratones Tg mediante la atenuación de la vía NF- $\kappa$ B-BACE1.

**[0028]** No existe una terapia eficaz para detener la progresión de la EA. La administración de diferentes inhibidores de la colinesterasa, tales como Aricept<sup>®</sup>, Exelon<sup>®</sup>, Razadyne<sup>®</sup>, Cognex<sup>®</sup>, etc., ha sido el tratamiento estándar para la EA (43). Sin embargo, a menudo se asocia con una serie de efectos secundarios y resultados insatisfactorios. Aquí, los inventores han demostrado que los niveles de TLR2 y MyD88 están regulados al alza en el SNC de los pacientes con EA, que el TLR2 y la MyD88 se correlacionan positivamente con la puntuación de Braak, que el péptido wtTIDM se dirige solo al TLR2 sin modular otras vías de señalización y que, tras la administración intranasal, el péptido wtTIDM llega al hipocampo, suprime la activación del NF- $\kappa$ B del hipocampo, inhibe la inflamación microglial, reduce la carga de placas, atenúa la apoptosis neuronal y protege el aprendizaje y la memoria en ratones Tg. Estos resultados sugieren que el direccionamiento selectivo del TLR2 por el péptido wtTIDM intranasal puede tener importancia terapéutica en la EA. Además, el péptido wtTIDM también mejoró el deterioro funcional y suprimió los procesos patológicos de la EAE y la AIC en ratones. Por lo tanto, además de la EA, el péptido TIDM también puede presentar una oportunidad para varios otros trastornos.

#### Composiciones farmacéuticas y modos de administración

**[0029]** Los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria y que no son según la invención reivindicada pueden incluir cualquier número de modos de administración de la composición peptídica o las composiciones farmacéuticas de la composición peptídica. Los modos de administración pueden incluir comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas de gel duro y blando, gránulos, pastillas, soluciones acuosas, lipídicas, oleosas u otras, emulsiones tales como emulsiones aceite en agua, liposomas, suspensiones acuosas u oleosas, jarabes, elixires, emulsiones sólidas, dispersiones sólidas o polvos dispersables. Para la preparación de composiciones farmacéuticas para administración oral, la composición peptídica se puede mezclar con adyuvantes y excipientes habitualmente conocidos y usados tales como, por ejemplo, goma arábiga, talco, almidón, azúcares (tales como, por ejemplo, manitosa, metilcelulosa, lactosa), gelatina, agentes tensioactivos, estearato de magnesio, disolventes acuosos o no acuosos, derivados de parafina, agentes reticulantes, dispersantes, emulsionantes, lubricantes, agentes conservantes, agentes aromatizantes (por ejemplo, aceites etéreos), potenciadores de la solubilidad (por ejemplo, benzoato de bencilo o alcohol bencílico) o potenciadores de la biodisponibilidad (por ejemplo, GELUCIRE). En la composición farmacéutica, el agente también se puede dispersar en una composición de micropartículas, por ejemplo, una composición de nanopartículas.

**[0030]** Para la administración parenteral, la composición peptídica o las composiciones farmacéuticas de la composición peptídica pueden disolverse o suspenderse en un diluyente fisiológicamente aceptable, tal como, por ejemplo, agua, tampón, aceites con o sin solubilizantes, agentes tensioactivos, dispersantes o emulsionantes. Como aceites, por ejemplo y sin limitación, se pueden usar aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de soja, aceite de ricino y aceite de sésamo. En términos más generales, para la administración parenteral, el agente o las composiciones farmacéuticas del agente pueden estar en forma de una solución o suspensión acuosa, lipídica, oleosa o de otro tipo o incluso administrarse en forma de liposomas o nanosuspensiones.

- 5 **[0031]** En los métodos de tratamiento contemplados en la presente descripción, la composición peptídica se puede usar sola o en composiciones junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente memoria, la expresión “portador farmacéuticamente aceptable” significa un relleno, diluyente, material encapsulante o sustancia auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico e inerte de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones de tampón de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos, tales como el laurilsulfato de sodio y el estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes, también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador. Otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en “Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Pub. Co., Nueva Jersey, 1991.
- 10
- 15
- 20 **[0032]** En determinadas realizaciones, la composición peptídica se puede administrar por vía oral a seres humanos y otros animales. La composición puede formularse para su administración y los métodos de formulación son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19.<sup>a</sup> edición (1995)).
- 25 **[0033]** En algunas realizaciones, las formulaciones pueden ser formulaciones de liberación sostenida, lo que significa que liberan la composición peptídica de manera constante durante un período de tiempo prolongado. En otras realizaciones, las formulaciones pueden ser formulaciones de liberación retardada, lo que significa que liberan la composición peptídica en un momento posterior al que sigue inmediatamente a su administración.
- 30 **[0034]** Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente descripción pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas estériles apirógenas, cápsulas recubiertas, polvos liofilizados u otras formas conocidas en la técnica.
- 35 **[0035]** Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes, tales como glicerol, d) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato sódico, e) retardadores de solución, tales como parafina, f) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes, tales como caolín y bentonita e i) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de estos. En el caso de cápsulas, comprimidos, y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponadores.
- 40
- 45 **[0036]** También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de elevado peso molecular y similares.
- 50 **[0037]** Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y coberturas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que libere el(los) ingrediente(s) activo(s) solo, o preferiblemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.
- 55 **[0038]** Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se ha indicado anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y coberturas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para la formación de comprimidos y otros coadyuvantes para la formación de comprimidos, tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos, y píldoras, las formas de dosificación también pueden
- 60
- 65

comprender agentes tamponadores. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que libere el(los) ingrediente(s) activo(s) solo, o preferiblemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

5  
 [0039] Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes habitualmente utilizados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, EtOAc, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3  
 10 butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de estos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes y  
 15 perfumantes.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Sujetos humanos

20  
 [0040] Se analizaron treinta y tres casos con diagnóstico clínico previo a la muerte de ausencia de disfunción cognitiva (ADC; n = 12), disfunción cognitiva leve (DCL; n = 11) y EA (n = 10) obtenidos del Rush Religious Order Study (RROS) (44, 45) (tabla S1). Todos los participantes aceptaron una evaluación clínica anual detallada y una donación de cerebro al fallecer.

25  
 Ejemplo 2: Evaluaciones clínicas y neuropatológicas

[0041] Los criterios clínicos para el diagnóstico del ADC, la DCL y la EA se han descrito en otros lugares (44, 46). Las pruebas clínicas y neuropsicológicas finales, que incluyeron un Miniexamen Cognoscitivo (MEC) y una batería de 19 pruebas cognitivas, se realizaron dentro de los 2 años anteriores a la muerte. Se dispuso de una puntuación z cognitiva global (GCS) que comprendía las 19 pruebas para todos los casos (47). La estadificación de Braak de los ovillos neurofibrilares (NFT) (48) se realizó como se ha descrito anteriormente (44). Se excluyeron del estudio los sujetos con hallazgos patológicos distintos de la EA (por ejemplo, ictus, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy). La información tisular y clínica está protegida por las normas de la Health Information Privacy Administration.

Ejemplo 3: Muestras de tejido y transferencia de Western

40  
 [0042] La corteza frontal superior (área 9 de Brodmann) se diseccionó sin materia blanca en la autopsia con hielo seco para evitar que se descongelara y se mantuvo a -80 °C hasta el ensayo. El tejido se homogeneizó y se procesó como se describió anteriormente (22). Los extractos de tejido y los lisados celulares (30 µg) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida Bis-Tris SDS al 8 o al 10 % en un sistema de tampón continuo, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) con un papel secante semiseco (Pierce) y se sometieron a inmunoelectrotransferencia como se ha descrito anteriormente (22, 49-51). Las transferencias se convirtieron en binario, se analizaron con ImageJ (NIH) y se normalizaron para el control de carga (β-actina).

Ejemplo 4: Preparación de TLR2 C-terminal (cTLR2)

50  
 [0043] La construcción de TLR2 de longitud completa (pLenti-cmyc-DDK/tlr2) se adquirió de Origene. El cTLR2 (640-784 aminoácidos) marcado con c-myc se clonó en el vector lenti usando el kit de clonación TOPO TA (K5310-00; Life technologies). En resumen, se incorporó una secuencia de kozak en la parte superior del dominio TIR C-terminal de TLR2. A continuación, se clonó el cTLR2 en lentivector y, a continuación, se empaquetó en lentivirus utilizando células HEK293FT. Después de 48 h, el medio se recolectó y se concentró con el concentrador Lenti-X (n.º de cat. 631231; Clontech). Esta solución lentiviral concentrada se usó para la transducción viral. La proteína cTLR2 se aisló del lisado celular HEK293 haciéndola pasar a través de la columna de afinidad de Myc. La proteína purificada se desaló y se concentró usando un sistema de filtración de corte molecular de 10 kD.

Ejemplo 5 - Resonancia de plasmones superficiales

60  
 [0044] Para analizar la unión del TLR2 con los péptidos TIDM, se llevaron a cabo experimentos de resonancia de plasmones superficiales (RPS) utilizando un instrumento Reichert 4SPR (Reichert Technologies, Buffalo, NY). El ensayo de unión se realizó usando un portaobjetos con sensor de oro con carboximetildextrano de 500 kDa (Reichert Inc.) para capturar el TLR2. La inmovilización de proteínas se realizó a una velocidad de flujo de 30 µl/min en PBS durante 3 minutos con una solución de TLR2 de 0,8 mg/ml. Para la asociación de analitos, se inyectaron diferentes concentraciones de péptidos wTIDM y mTIDM en el tampón de ejecución de PBS durante 2,5 minutos a una velocidad de 30 µl/min, seguido de una fase de disociación de 3 minutos. La superficie del sensor se regeneró

después de cada ciclo de disociación, dejando que el tampón fluyera a 40 µl/min durante un mínimo de 15 minutos. Las señales obtenidas para la superficie unida al TLR2 se restaron de las señales obtenidas para la celda de referencia según el procedimiento estándar utilizando el software del sistema. La dependencia de la concentración de la señal sustraída se analizó para determinar la afinidad de unión del TLR2 con los péptidos wtTIDM y mTIDM.

5

Ejemplo 6 - Ensayos de desplazamiento térmico

**[0045]** Los ensayos de cambio térmico se realizaron en una máquina termocicladora en tiempo real estándar 7500 de Applied Biosystems como se ha descrito anteriormente (52, 53). Para cada reacción, se añadió proteína purificada (0,5 µg a 1 µg) a 18 µl del tampón de cambio térmico suministrado con el kit y 1-2 µl de colorante. La reacción se colocó en la placa de PCR de 96 pocillos en la oscuridad y después se colocó en la máquina termocicladora usando el siguiente programa de dos etapas [(25 °C durante 2 minutos) 1 ciclo; (27 °C durante 15 segundos, 26 °C durante 1 minuto) 70 ciclos; incremento automático de 1 °C para ambas etapas]. El filtro se ajustó a ROX sin filtro desactivador ni filtro pasivo.

15

Ejemplo 7: Análisis estructural por ordenador

**[0046]** Los inventores utilizaron Deep View 3.7β2, una herramienta analítica macromolecular en línea del Expert Protein Analytical System (ExPASy), para modelar las estructuras de los dominios TIR de diferentes TLR (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 y TLR9). Para evaluar la calidad de las estructuras modeladas, utilizaron la herramienta Quality Measurement Analysis (QMEAN), una herramienta de puntuación compuesta que estima la calidad global de todo el modelo, así como el análisis local por residuo de diferentes regiones dentro de un modelo. La interacción a nivel de residuo se evaluó mediante el potencial del átomo de Cβ y las interacciones de largo alcance se validaron mediante el potencial de todos los átomos. Se implementó un potencial de solvatación para analizar el estado de enterramiento de los residuos. La geometría local de cada estructura se analizó mediante un potencial de ángulo de torsión sobre tres aminoácidos consecutivos. La pose acoplada de los dominios TIR con el péptido wtTIDM o mTIDM se obtuvo de la herramienta de acoplamiento proteína-proteína de cuerpo rígido Pydock.

25

Ejemplo 8: Animales y administración intranasal de péptidos TIDM

30

**[0047]** Los ratones transgénicos B6SJL-Tg (APPSwFILon, PSEN1\*M146L\*L286V) 6799Vas/J (5XFAD o denominados aquí Tg) se adquirieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones Tg machos de seis meses de edad se trataron por vía intranasal con péptidos wtTIDM o mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/2 d) durante 30 días. En resumen, los péptidos TIDM se disolvieron en 5 µl de solución salina normal, los ratones se mantuvieron en posición supina y la solución salina se administró a una fosa nasal utilizando una Pipetman.

35

Ejemplo 9: Inducción de EAE crónica y tratamiento con péptidos TIDM

**[0048]** Los ratones C57BL/6 machos se inmunizaron con 100 µg de MOG35-55 como lo han descrito los inventores (54, 55). Los ratones también recibieron dos dosis de toxina de tosferina (150 ng/ratón) 0 y 2 días después de la inmunización (dpi). A partir de 10 dpi, los ratones recibieron péptidos wtTIDM o mTIDM (0,1 mg/kg de peso corporal/día) por vía intranasal.

40

Ejemplo 10: Inducción de artritis inducida por colágeno (AIC) y tratamiento con péptidos TIDM

45

**[0049]** Se inmunizaron ratones DBA/1J machos (de 8 a 9 semanas de edad) por vía intradérmica en la base de la cola con 100 µg de colágeno bovino de tipo II emulsionado en adyuvante incompleto de Freund y H37RA de *M. tuberculosis*. A 21 dpi, se estimuló a los ratones con una inyección intraperitoneal de 100 µg de colágeno bovino de tipo II. Los ratones se trataron con péptidos wtTIDM o mTIDM (1 mg/kg de peso corporal/día) por vía intravenosa a partir de 29 dpi.

50

Ejemplo 11: Preparación de Aβ1-42 fibrilar

**[0050]** Se prepararon Aβ1-42 fibrilares (Anaspec, Fremont, CA) incubando péptidos recién solubilizados a 50 µM en agua destilada estéril a 37 °C durante 5 días (56). En la figura 27 se puede ver la morfología de la Aβ1-42 fibrilar.

55

Ejemplo 12: Análisis de RT-PCR semicuantitativo

**[0051]** Se aisló el ARN total del hipocampo usando el reactivo de ARN Ultraspec-II (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX) siguiendo el protocolo del fabricante. Para eliminar cualquier ADN genómico contaminante, el ARN total se digirió con ADNasa. La RT-PCR se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (23, 57) usando un kit de RT-PCR (Clontech, Mountain View, CA).

60

Ejemplo 13 - Análisis de PCR en tiempo real

65

**[0052]** El ARN digerido con ADNasa se analizó mediante PCR en tiempo real en el sistema de detección de secuencias ABI-Prism7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) como se ha descrito anteriormente (23, 57).

Ejemplo 14: Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

**[0053]** Se aislaron los extractos nucleares y se llevó a cabo el EMSA como se ha descrito anteriormente (22, 23).

Ejemplo 15: Laberinto de Barnes y laberinto en T:

**[0054]** Los experimentos con laberintos se realizaron como los describen los inventores (52, 57). En resumen, para el laberinto de Barnes, los ratones se entrenaron durante 2 días consecutivos, seguido de un examen el día 3. Después de cada sesión de entrenamiento, el laberinto y el túnel de escape se limpiaban a fondo con un detergente suave para evitar el olor instintivo debido al olor a ratón causado por el objeto conocido. El día 3, el laberinto se iluminó con una luz de alto vataje que generó suficiente luz y calor para motivar a los animales a entrar en el túnel de escape, lo que permitió medir la latencia (duración antes de que las cuatro patas estuvieran en el suelo de la caja de escape) y los errores (respuestas incorrectas antes de que las cuatro patas estuvieran en el suelo de la caja de escape).

**[0055]** Para el laberinto en T, los ratones también se habituaron en el laberinto en T durante dos días en condiciones de privación de alimentos para que los animales pudieran comer recompensas de alimento al menos cinco veces durante un período de entrenamiento de 10 minutos. Durante cada prueba, los ratones se colocaron en el punto de partida durante 30 s y después se les obligó a girar por la rama derecha, siempre con cebo con chips de alimento de colores. Después de cada sesión de entrenamiento, el laberinto en T se limpió a fondo con un detergente suave. El día 3, los ratones se sometieron a pruebas para determinar si hacían giros positivos y negativos. El lado de la recompensa siempre está asociado a una señal visual. El número de veces que el animal se come la recompensa de alimento se consideraría un giro positivo.

Ejemplo 16: Tarea de reconocimiento de objetos novedosos

**[0056]** Se realizó una tarea de reconocimiento de objetos novedosos para monitorizar la memoria a corto plazo, como la han descrito otros (58) y los inventores (57). En resumen, durante el entrenamiento, los ratones se colocaron en una nueva caja cuadrada (50,8 cm [20 pulgadas] de largo por 20,32 cm [8 pulgadas] de alto) rodeada de un sensor de infrarrojos. Se colocaron dos juguetes de plástico (entre 6,35 cm [2,5 pulgadas] y 7,62 cm [3 pulgadas]) que variaban en color, forma y textura en lugares específicos del entorno a 45,72 cm [18 pulgadas] de distancia entre sí. Los ratones pudieron explorar libremente el entorno y los objetos durante 15 minutos y después fueron colocados de nuevo en sus jaulas individuales. Después de 30 minutos, los ratones fueron devueltos al medio ambiente con dos objetos en las mismas ubicaciones, pero ahora uno de los objetos familiares fue reemplazado por un tercer objeto nuevo. A continuación, se permitió nuevamente a los ratones explorar libremente ambos objetos durante 15 minutos. Los objetos se limpiaron minuciosamente con un detergente suave.

Ejemplo 17: Inmunohistoquímica.

**[0057]** Los ratones se anestesiaron con inyectables de ketamina-xilazina y se perfundieron con PBS y después con paraformaldehído al 4 % (p/v) en PBS, seguido de una disección del cerebro de cada ratón para microscopía de inmunofluorescencia (23, 59). En resumen, las muestras se incubaron en PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBST) y sacarosa al 10 % durante 3 h y después sacarosa al 30 % durante una noche a 4 °C. A continuación, el cerebro se incluyó en O.C.T (Tissue Tech) a -80 °C y se procesó para la criosección convencional. Las secciones congeladas (30 µm) se trataron con etanol frío (-20 °C), seguido de dos aclarados en PBS, bloqueando con BSA al 3 % en PBST y realizando un marcaje doble con dos anticuerpos (tabla S3). Tras tres lavados en PBST, las secciones se incubaron adicionalmente con Cy2 y Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Las muestras se montaron y se observaron con un microscopio de fluorescencia Olympus IX81. El análisis de recuento se realizó utilizando el software Olympus Microsuite V con la ayuda del módulo de conteo táctil.

Ejemplo 18: Etiquetado de extremos de fragmentos de ADN:

**[0058]** Se realizó usando un kit disponible en el mercado (TdT FragELTM, Calbiochem) como se ha descrito anteriormente (10, 22).

Ejemplo 19: ELISA para Aβ1-42 y Aβ1-40

**[0059]** Los tejidos del hipocampo se homogeneizaron en TBS, se sedimentaron durante 30 minutos × 150 000 g. El sedimento se resuspendió en 3 volúmenes (peso/volumen de peso del tejido original) de TBS + Triton X-100 al 1 %, se sedimentó durante 30 minutos × 150 000 g y el sobrenadante se recuperó y almacenó. Las muestras se analizaron para determinar la concentración de proteína y se diluyeron 10 veces antes de realizar el ELISA según las instrucciones del fabricante (BioLegend).

Ejemplo 20 - Análisis estadístico

**[0060]** Los datos clínicos y bioquímicos de los tejidos humanos se compararon entre los diagnósticos mediante pruebas no paramétricas (es decir, la prueba de Kruskal-Wallis o la prueba exacta de Fisher, con la corrección de Dunn para comparaciones múltiples), que son más resistentes a los valores atípicos, las anomalías y los tamaños de muestra desiguales. Mediante correlaciones bilaterales de rangos de Spearman se evaluaron las asociaciones variables entre las puntuaciones de las pruebas cognitivas y las densidades ópticas de las proteínas. Las correlaciones no se ajustaron a la información demográfica (es decir, edad, sexo, etc.), ya que estos parámetros no fueron significativamente diferentes entre los grupos clínicos. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa SPSS 19 (IBM) y la significación se estableció en  $\alpha = 0,05$  (bilateral).

**[0061]** Las medidas del comportamiento de los ratones se examinaron mediante un ANOVA unidireccional independiente utilizando SPSS. La homogeneidad de la varianza entre los grupos de prueba se examinó mediante la prueba de Levene. Los análisis *a posteriori* se realizaron mediante pruebas de Tukey o Games-Howell, cuando fue apropiado. Otros datos se expresaron como medias  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre las medias se calcularon mediante la prueba de la t de Student (bilateral). Un valor de la p inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 21: Aprobación del estudio

**[0062]** Los comités de investigaciones humanas del Rush University Medical Center aprobaron el estudio RROS. Los animales se mantuvieron y los experimentos se realizaron según las directrices de los Institutos Nacionales de Salud de los EE. UU. y fueron aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales del Rush University Medical Center.

Ejemplo 22: Regulación al alza de TLR2 en EA:

**[0063]** Para investigar la función del TLR2 en la patogenia de la EA, se monitorizó el nivel del TLR2 mediante un análisis de inmunoelectrotransferencia en la corteza prefrontal (PFC; área de Brodmann 9) de 33 sujetos que murieron a causa de la demencia de tipo EA ( $n = 10$ ), deterioro cognitivo leve (DCL;  $n = 11$ ) y personas de la misma edad sin deterioro cognitivo (ADC;  $n = 12$ ) (tabla S1). En cuanto a la edad, el sexo, el intervalo transcurrido desde la muerte, el peso cerebral o las puntuaciones de Braak, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (tabla S1). A modo de comparación, se incluyó TLR4. Dado que todos los TLR, excepto el TLR3, emplean MyD88, también se investigó el MyD88. Los niveles de TLR2 y MyD88 en la PFC se alteraron significativamente entre los grupos, y los casos de EA expresaron más TLR2 y MyD88 en comparación con los casos de ADC y DCL (figuras 1A-C y tabla S2). Por el contrario, el nivel de TLR4 no difirió significativamente entre los grupos (figuras 1A y D; tabla S2). La correlación de rangos de Spearman mostró que los niveles de TLR2 y MyD88 en la corteza prefrontal se correlacionaron positivamente con la estadificación de Braak (figuras 1E-F y tabla S2). Por otro lado, no se encontró ninguna relación entre el TLR4 y la puntuación de Braak (figura 1G y tabla S2). Es importante destacar que el MyD88 también se correlacionó negativamente con el Miniexamen Cognoscitivo (MEC) y la puntuación z cognitiva global (GCS) (figuras 1H-M y tabla S2).

**[0064]** Para confirmar estos hallazgos, se realizó un análisis de inmunofluorescencia con doble marcaje de las secciones del hipocampo. Como era de esperar, el nivel de Iba-1 (marcador microglial) fue mayor en la corteza y el hipocampo de la EA en comparación con el ADC (figuras 8A-E). De manera similar a los resultados de la transferencia de Western, se observaron niveles más altos de TLR2 (figura 8 A y figura 1NO) y MyD88 (figura 8B y figuras 1P-Q) en la corteza y el hipocampo del cerebro con EA en comparación con el ADC. De nuevo, no hubo diferencia en la expresión de TLR4 (figura 8C y figuras 1R-S).

Ejemplo 23: Regulación al alza de TLR2 en ratones transgénicos (Tg) 5XFAD:

**[0065]** A continuación, se examinó el estado de TLR2 y MyD88 en el hipocampo de ratones Tg 5XFAD. De manera similar a lo observado en el SNC de los sujetos con EA, se observaron niveles más altos de TLR2 (figuras 9A-B) y MyD88 (figuras 10A-B) en la corteza y diferentes partes del hipocampo de los ratones Tg en comparación con los ratones no Tg de la misma edad. También se encontró un aumento de la inmunorreactividad de la Iba-1 y la colocalización de muchas células positivas para la Iba-1 con TLR2 (figura 9B) y MyD88 (figura 10B) en la corteza y el hipocampo de los ratones Tg. Los experimentos de transferencia de Western también confirmaron el aumento de TLR2 (figuras 9C-D) y MyD88 (figuras 10C-D) en el hipocampo de ratones Tg en comparación con ratones no Tg.

Ejemplo 24: Diseño de un péptido que corresponde al dominio de MyD88 que interactúa con TLR2 (TIDM) para el direccionamiento específico de TLR2

**[0066]** Dado que no existe un inhibidor específico del TLR2, con fines terapéuticos, los inventores trataron de dirigirse al TLR2. Tras la unión al ligando, TLR2 funciona a través de MyD88 (14, 15). Por lo tanto, aplicaron la herramienta de interacción proteína-proteína de cuerpo rígido para modelar la interacción entre el dominio de interacción con TLR (TIR) de TLR2 y MyD88. Dado que las estructuras cristalinas de los TIR de los TLR de ratón no

estaban disponibles, se adoptó una estrategia de modelado de homología por ordenador para construir estructuras tridimensionales de TIR a partir de todos los TLR diferentes (figuras 11A-G). Al igual que en el hallazgo anterior (20), la pose de acoplamiento del complejo de MyD88 y TIR, derivada de los análisis de modelado por ordenador de los inventores, reveló que el bucle BB del TLR2 estaba conectado con el bucle CD de MyD88 con una fuerte interacción de Van der Waals (VdW) (figura 2A). Por lo tanto, se diseñó el siguiente péptido correspondiente al dominio de MyD88 de interacción con TLR2 (TIDM) del bucle CD para interrumpir la interacción entre TLR2 y MyD88:

TIDM natural (wt): drqikiwfnrrmkwkkPGAHQK (Id. de sec. n.º: 2)

TIDM mutado (m): drqikiwfnrrmkwkkPGWHQD (Id. de sec. n.º: 3)

**[0067]** Se añadió el homeodominio de Antennapedia (en minúsculas) (drqikiwfnrrmkwkk) en el extremo C de estos péptidos para facilitar la permeabilidad celular. Los segmentos MyD88 son PGAHQK y PGWHQD, respectivamente. Las mutaciones son de A a W y de K a D, respectivamente. Curiosamente, cuando la interacción entre TIR de TLR2 y MyD88 se modeló con el péptido wtTIDM, se observó que el MyD88 estaba asociado con un cierto grado de rotación, dejando su bucle CD muy alejado del bucle BB de TLR2 (figura 2B). Según el análisis de Pydock, se descubrió que el péptido wtTIDM estaba acoplado a la interfaz del bucle CD, la hélice  $\alpha$ B y el bucle BB del dominio TIR del TLR2 (figura 12A). Esa pose específica del péptido wtTIDM impuso que su superficie VdW se distribuyera sobre el bucle BB del TLR2 (figura 12A), lo que no fue posible en el caso del péptido mTIDM (figura 12B). Se observó que había una fuerte interacción electrostática ( $2,31 \text{ \AA}^\circ$ ) entre el átomo NE1 del residuo de histidina conservado (H82) del bucle CD y el átomo ND del residuo de histidina (H4) del péptido wtTIDM (figura 12C). Las estructuras acopladas de mTIDM con TLR2 indicaron claramente que había una interacción electrostática muy débil ( $7,26 \text{ \AA}^\circ$ ) entre el residuo H82 del bucle CD y el residuo H4 del péptido mTIDM (figura 12C; panel derecho). Además, la mutación de wtTIDM de lisina a aspartato impuso una nube negativa, que también alejó aún más el extremo C-terminal del mTIDM del bucle BB y más hacia el surco de la hélice  $\alpha$ B (figura 12B). También se midió la posibilidad de interacción de VDW en ese complejo midiendo la distancia de las gotículas de VDW entre dos residuos cercanos de TLR2 y MyD88 (figura 12D). Se observó que había una superposición significativa de VdW entre MyD88 y TLR2 en ausencia de wtTIDM. Sin embargo, cuando formaban complejos con wtTIDM, el bucle BB del TLR2 y el bucle CD de MyD88 tenían poses alejadas entre sí, lo que negaba cualquier posibilidad de interacción con VdW (figura 12E). Para comparar la afinidad de wtTIDM y mTIDM hacia el TLR2 desde otro ángulo, se realizó un análisis de resonancia de plasmones superficiales (RPS). Primero se clonó y se purificó toda la proteína TLR2. Sin embargo, no era estable y, dado que la proteína TLR2 completa tampoco está disponible, se preparó solo el dominio TIR C-terminal de la proteína TLR2 (cTLR2) mediante una estrategia de clonación vírica y se purificó la proteína mediante una columna de afinidad myc (figura 2C). Los gráficos cinéticos (figuras 2D-E) mostraron claramente que las dosis crecientes de wtTIDM y mTIDM mostraban unión con el cTLR2. Sin embargo, el wtTIDM mostró una afinidad mucho más fuerte que mTIDM hacia cTLR2 (figura 2D-F). Según el gráfico de la respuesta de RPS en equilibrio frente a la concentración de péptido (figura 2F), la afinidad de wtTIDM ( $K_d = 8 \text{ \mu M}$ ) por cTLR2 fue aproximadamente 2,5 veces más fuerte que la de mTIDM ( $K_d = 19 \text{ \mu M}$ ). Para corroborarlo aún más, se realizó un ensayo de desplazamiento térmico, que reveló que  $10 \text{ \mu M}$  de péptido wtTIDM desplazaron fuertemente la curva de fusión de cTLR2 (figura 2G). Por otro lado, se observó muy poco cambio para mTIDM (figura 2H). En conjunto, estos resultados sugieren que el wtTIDM es un potente péptido de molécula pequeña que interfiere fuertemente con la interacción entre TLR2 y MyD88.

**[0068]** A continuación, examinamos si wtTIDM tenía una afinidad similar hacia otros TLR. Curiosamente, los análisis informáticos de los inventores revelaron que el péptido wtTIDM se acopló lejos del bucle BB del TLR1 (figura 3A), TLR4 (figura 3B), TLR5 (figura 3C), TLR6 (figura 3D), TLR7 (figura 3E) y TLR9 (figura 3F), lo que sugiere que el wtTIDM se dirige específicamente al bucle BB de TLR2, pero no a otros TLR.

**[0069]** A continuación, se examinó si el péptido wtTIDM podría alterar la asociación física entre el TLR2 endógeno y el MyD88. Anteriormente los inventores han precisado que la A $\beta$ 1-42 fibrilar activa la microglía a través del TLR2 (17). En este caso, mediante el análisis por inmunoelectrotransferencia de los inmunoprecipitados de MyD88 con anticuerpos contra el TLR2, descubrieron que el tratamiento con A $\beta$ 1-42 fibrilar aumentaba la asociación entre el TLR2 y el MyD88 en las células microgliales y que esta interacción era inhibida por el péptido wtTIDM, pero no por el mTIDM (figuras 3G-H). La entrada mostró la presencia de una cantidad igual de TLR2 y MyD88 en diferentes condiciones de tratamiento (figura 3G). Para comprender la especificidad, se examinó el efecto del péptido wtTIDM en la interacción entre TLR4 y MyD88. El LPS es un prototipo de agonista del TLR4. El tratamiento con LPS aumentó la asociación entre el TLR4 y el MyD88 en las células microgliales (figuras 3I-J) y, a diferencia de la supresión de la interacción TLR2:MyD88 (figuras 3G-H), el péptido wtTIDM no tuvo ningún efecto sobre la interacción entre TLR4 y MyD88 (figuras 3I-J). A continuación, se examinó si el wtTIDM podría interferir con la interacción entre MyD88 y el TLR2 C-terminal (cTLR2) recién formado marcado con Myc. Por lo tanto, las células microgliales se transdujeron con lentiviriones pLenti-cMyc-cTlr2 y, después de 48 h de transducción, las células se trataron con A $\beta$ 1-42 fibrilar en presencia o ausencia de wtTIDM/mTIDM durante 1 h. El análisis por inmunotransferencia de los inmunoprecipitados de MyD88 con anticuerpos contra el c-Myc mostró que la interacción entre el cTLR2 y el MyD88 recién formados en las células microgliales tratadas con A $\beta$ 1-42 fue inhibida por el péptido wtTIDM, pero no por el mTIDM (figuras 3K-L).

Ejemplo 25: El péptido TIDM inhibe la inflamación microglial inducida por el A $\beta$ 1-42 fibrilar y el ácido lipoteicoico (LTA), pero no el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+), el ARN bicatenario (poli IC), el lipopolisacárido bacteriano (LPS), la flagelina y el ADN CpG:

5 **[0070]** La microglía que expresa diferentes TLR se activa en diversas condiciones patológicas, tales como la neurodegeneración, la inflamación, la infección vírica y bacteriana, etc. (7, 21). Por lo tanto, se investigó si el péptido TIDM era capaz de suprimir la activación microglial inducida por diferentes estímulos. Las células microgliales pretratadas con diferentes concentraciones de péptidos wtTIDM y mTIDM durante 1 h se estimularon con A $\beta$ 1-42 fibrilar (un reactivo etiológico de la EA), MPP+ (una toxina parkinsoniana), LTA (agonista del TLR2), poli IC (agonista del TLR3), LPS (agonista del TLR4), flagelina (agonista del TLR5) y ADN CpG (agonista del TLR9). Como era de esperar, la A $\beta$  fibrilar (figura 4A), el MPP+ (figura 4D), el LTA (figura 4G), el poli IC (figura 14A), el LPS (figura 4J), la flagelina (figura 4M) y el ADN CpG (figura 4P) indujeron la activación del NF- $\kappa$ B en las células microgliales. Sin embargo, los péptidos wtTIDM inhibieron la activación fibrilar mediada por A $\beta$  y LTA del NF- $\kappa$ B (figuras 4A y 4G). Por el contrario, los péptidos wtTIDM siguieron siendo incapaces de suprimir la activación del NF- $\kappa$ B en las células microgliales inducida por el MPP+ (figura 4D), poli IC (figura 14A), LPS (figura 4J), flagelina (figura 4M) y ADN CpG (figura 4P). Estos resultados fueron específicos, ya que los péptidos mTIDM no tuvieron ningún efecto sobre la activación del NF- $\kappa$ B inducida por ninguno de los estímulos. La activación de la vía clásica del NF- $\kappa$ B implica la fosforilación del I $\kappa$ B $\alpha$  seguida de la translocación nuclear de p65 y p50. Por lo tanto, también se investigó el efecto del péptido wtTIDM sobre la translocación nuclear de p65 y p50 en la microglía activada. Como era de esperar, se observó un aumento de la translocación nuclear de p65 y p50 en las células microgliales en respuesta a la A $\beta$ 1-42 fibrilar (figuras 15A-C) y al LPS (figuras 15D-F). Sin embargo, el tratamiento con el péptido wtTIDM inhibió la translocación nuclear de p65 y p50 en células microgliales estimuladas con A $\beta$ 1-42 fibrilar (figuras 15A-C), pero no con LPS (figuras 15D-F), lo que indica la especificidad del péptido wtTIDM. Para confirmar estos resultados, también se monitorizó la expresión de IL-1 $\beta$  e iNOS, moléculas proinflamatorias que son impulsadas por la activación del NF- $\kappa$ B. Todos los estímulos indujeron la expresión de IL-1 $\beta$  e iNOS en las células microgliales (figuras 4B-C, 4E-F, 4H-I, 4K-L, 4N-O, 4Q-R, figuras 13A-F y figuras 14B-D). En consonancia con el efecto del wtTIDM sobre la activación del NF- $\kappa$ B, los péptidos wtTIDM inhibieron la expresión de moléculas proinflamatorias inducidas únicamente por la A $\beta$  fibrilar (figuras 13A y 4B-C) y LTA (figura 13C y figuras 4H-I), pero no por MPP+ (figura 13B y figuras 4E-F), poli IC (figuras 14B-D), LPS (figura S6D y figuras 4K-L), flagelina (figura 13E y figuras 4N-O) y ADN CpG (figura 13F y figuras 4Q-R). Estos resultados sugieren que el péptido wtTIDM inhibe específicamente la inflamación microglial inducida por los agonistas del TLR2, pero no por otros TLR.

Ejemplo 26: El péptido wtTIDM no inhibe la activación fibrilar de la microglía inducida por el A $\beta$ 1-42 en ausencia de TLR2:

35 **[0071]** Dado que el péptido wtTIDM interrumpió la asociación física entre TLR2 y MyD88, como prueba de viabilidad mecánica, se examinó el efecto del péptido wtTIDM en la activación de la microglía Tlr2 $^{-/-}$  inducida por A $\beta$ 1-42. Al igual que las células microgliales BV-2, los péptidos fibrilares A $\beta$ 1-42 indujeron fuertemente la activación del NF- $\kappa$ B en la microglía primaria aislada de ratones WT, que fue inhibida por el péptido wtTIDM (figura 16A). Por otro lado, los péptidos fibrilares A $\beta$ 1-42 indujeron débilmente la actividad de unión al ADN del NF- $\kappa$ B en la microglía Tlr2 $^{-/-}$  (figura 16A). Sin embargo, a diferencia de la microglía WT, el péptido wtTIDM siguió siendo incapaz de inhibir la activación fibrilar del NF- $\kappa$ B inducida por el A $\beta$ 1-42 en la microglía Tlr2 $^{-/-}$  (figuras 16A-B). Para confirmarlo aún más, también se midieron los niveles de citocinas proinflamatorias comunes (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) en los sobrenadantes. De manera similar a la activación del NF- $\kappa$ B, la inducción de la producción de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por el A $\beta$ 1-42 fibrilar fue baja en la microglía Tlr2 $^{-/-}$  en comparación con la microglía WT (figura 16C-F). Sin embargo, el péptido wtTIDM inhibió la producción fibrilar de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducida por el péptido A $\beta$ 1-42 en la microglía WT, pero no Tlr2 $^{-/-}$  (figuras 16C-F), lo que sugiere que el péptido wtTIDM necesita TLR2 para presentar su función.

Ejemplo 27: La administración intranasal del péptido wtTIDM inhibe la inflamación, reduce la carga de placas y disminuye la hiperfosforilación de tau en el hipocampo de ratones Tg 5XFAD:

50 **[0072]** Cada vez está más claro que la inflamación glial desempeña una función importante en la pérdida de neuronas en la EA y otros trastornos neurodegenerativos (7, 9, 22-24). Dado que el péptido wtTIDM inhibió específicamente la activación microglial fibrilar mediada por la A $\beta$ 1-42, los inventores decidieron probar su traducibilidad terapéutica en ratones Tg 5XFAD. Primero se determinó si el péptido wtTIDM podía entrar en el hipocampo. Los ratones Tg se trataron con péptidos TIDM por vía intranasal y, después de 60 minutos de administración, se detectó el péptido wtTIDM en el hipocampo de los ratones Tg mediante espectrometría de masas acoplada a ionización por electropulverización (figuras 5A y C). Por el contrario, el hipocampo de los ratones Tg tratados con solución salina no mostró ningún pico para el péptido wtTIDM (figura 5B). El nivel del péptido wtTIDM fue de 23,33  $\pm$  14,14 ng por gramo de tejido cerebral en el hipocampo de los ratones Tg tratados con wtTIDM, en comparación con cero en los ratones Tg tratados con solución salina. Mediante escaneo infrarrojo, también se detectó el péptido TIDM en el hipocampo después del tratamiento intranasal (figura 17). Por lo tanto, después de la administración intranasal, el péptido TIDM entra en el hipocampo.

65 **[0073]** A continuación, se investigó si el péptido TIDM intranasal era capaz de modular la activación del NF- $\kappa$ B en el hipocampo de los ratones Tg. Como se ve en la inmunofluorescencia con doble marcaje de las secciones del

hipocampo, los niveles de Iba-1 y fosfo-p65 fueron notablemente más altos en los ratones Tg en comparación con los ratones no Tg (figuras 5D-H). Sin embargo, el tratamiento intranasal de los ratones Tg con péptidos wtTIDM, pero no mTIDM, condujo a la supresión tanto del Iba-1 como del fosfo-p65 en el hipocampo de los ratones Tg (figura 5D-H). Esto también se confirmó mediante el análisis por transferencia de Western de los tejidos del hipocampo (figuras 18A-B). Además, se sabe que la microglía activada expresa iNOS (21, 25). En consecuencia, la microglía del hipocampo de los ratones Tg también fue positiva para iNOS (figura 19 y figuras 5I-J). Sin embargo, el péptido wtTIDM, pero no el mTIDM, suprimió la expresión de iNOS en el hipocampo de los ratones Tg (figura 19 y figuras 5I-J). El análisis de transferencia de Western también confirma la inhibición de la expresión de iNOS en el hipocampo mediante el tratamiento con péptidos con wtTIDM, pero no con mTIDM (figuras 5K-L).

**[0074]** La placa amiloide es una característica importante de la patología de la EA, que se modela en ratones Tg 5XFAD (26, 27). Por lo tanto, a continuación, los inventores examinaron si el tratamiento con wtTIDM era capaz de reducir la carga de placas amiloides del hipocampo de los ratones Tg. La inmunotinción de secciones del hipocampo con el mAb 82E1 (figuras 5M-O), así como el análisis por transferencia de Western de los tejidos del hipocampo con el mAb 6E10 (figuras 5P-Q) y el mAb 82E1 (figuras 20A-B) mostraron un nivel notablemente superior de péptidos A $\beta$  en el hipocampo de los ratones Tg en comparación con los ratones no Tg. Del mismo modo, el ELISA de suero (figuras 21A-B), fracciones del hipocampo extraídas con TBS (figuras 21C-D) y fracciones del hipocampo extraídas con (TBS+Triton X-100) (figuras 21E-F) también demostraron un notable aumento de los niveles de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 en ratones Tg en comparación con los ratones no Tg. Sin embargo, se observó una disminución significativa de la A $\beta$  con el tratamiento con wtTIDM, pero no con el mTIDM (figuras 20A-B, figuras 21A-F y figuras 5M-Q). Estos resultados sugieren que la administración intranasal de wtTIDM es capaz de reducir la carga de A $\beta$  en el hipocampo de ratones 5XFAD.

**[0075]** La hiperfosforilación de tau es otra característica destacada de la patología de la EA (28, 29). Se ha demostrado que la hiperfosforilación en Ser396 de tau se produce en el hipocampo de ratones 5XFAD en una etapa mucho más temprana que la aparición de un deterioro del aprendizaje y la memoria (30). Por lo tanto, se examinó el efecto del tratamiento con péptido TIDM sobre el estado de la fosforilación de tau *in vivo* en el hipocampo de ratones Tg. El análisis por inmunoelectrotransferencia indica un notable aumento de fosfo-tau en los extractos del hipocampo de ratones Tg en comparación con los ratones no Tg (figuras 22A-B). Sin embargo, el tratamiento de ratones Tg con el péptido wtTIDM, pero no con mTIDM, condujo a la supresión de la fosfo-tau en el hipocampo sin afectar al nivel total de proteína tau (figuras 22A-B), lo que indica que el tratamiento con el péptido wtTIDM es adecuado para disminuir la fosforilación de tau en el hipocampo de los ratones Tg.

Ejemplo 28: Reducción de la apoptosis neuronal y protección de la memoria y el aprendizaje en ratones Tg 5XFAD mediante la administración intranasal del péptido wtTIDM:

**[0076]** Dado que la neuroinflamación puede estar asociada con la apoptosis neuronal, a continuación, se examinó si el tratamiento con el péptido wtTIDM podía reducir la apoptosis neuronal en el hipocampo de los ratones Tg. Varios cuerpos positivos para TUNEL se localizaron conjuntamente con NeuN en el hipocampo de ratones Tg en comparación con ratones no Tg (figuras 6A-C). Sin embargo, el péptido wtTIDM, pero no mTIDM, atenuó la apoptosis neuronal en el hipocampo (figuras 6A-C). Este resultado se confirmó mediante la detección de la caspasa 3 escindida. Como era de esperar, el nivel de caspasa 3 escindida aumentó en el hipocampo de los ratones Tg (figuras 6D-E). Sin embargo, el tratamiento de ratones Tg con el péptido wtTIDM, pero no con mTIDM, redujo el nivel elevado de caspasa 3 escindida en el hipocampo (figuras 6D-E), lo que sugiere que el tratamiento con el péptido wtTIDM es capaz de disminuir la apoptosis neuronal *in vivo* en el hipocampo de los ratones Tg. En consecuencia, los niveles de moléculas relacionadas con la plasticidad (PSD-95, NR2A y GluR1) disminuyeron en el hipocampo de los ratones Tg en comparación con los de los ratones no Tg (figuras 6F-I). Sin embargo, en consonancia con la supresión de la apoptosis neuronal, el tratamiento de ratones Tg con el péptido wtTIDM, pero no con mTIDM, condujo a una restauración significativa de las proteínas PSD-95, NR2A y GluR1 *in vivo* en el hipocampo (figura 6F-I).

**[0077]** El objetivo final de la neuroprotección en la EA es mejorar y/o proteger la memoria. Las principales funciones del hipocampo son generar y organizar la memoria a largo plazo y el aprendizaje espacial. Por lo tanto, se examinó si el péptido wtTIDM protegía la memoria y el aprendizaje en ratones Tg. Como se esperaba, los ratones Tg tardaron mucho más en encontrar el agujero con recompensa de alimento y presentaron una latencia mayor [ $p < 0,001$  ( $=0,0000213$ )] con errores mayores [ $p < 0,001$  ( $=0,0000251$ )] en el laberinto de Barnes en comparación con los ratones no Tg. Sin embargo, el tratamiento con wtTIDM mejoró significativamente las funciones de memoria de los ratones Tg como se observa por la latencia [ $F_{3,28} = 93,153$ ,  $p < 0,001$  ( $=0,0000112$ )] (figura 6J) y el número de errores [ $F_{3,28} = 36,339$ ,  $p < 0,001$  ( $=0,0000863$ )] (figura 6K). Las funciones de memoria de los ratones tratados con wtTIDM también eran mejores a la hora de ubicar el agujero con la recompensa con menor latencia [ $p < 0,001$  ( $=0,0000600$ )] y menos errores [ $p < 0,001$  ( $=0,0000579$ )] en comparación con los ratones tratados con mTIDM. Similarmente, en el laberinto en T, los ratones Tg sin tratar también presentaron un menor número de giros positivos [ $p < 0,001$  ( $=0,0000440$ )] y un mayor número de giros negativos [ $p < 0,001$  ( $=0,000223$ )] que los ratones no Tg de la misma edad (figuras 6L-M). Sin embargo, el tratamiento con wtTIDM mostró un efecto significativo en los giros positivos correctos [ $F_{3,28} = 31,475$ ,  $p < 0,001$  ( $=0,0000411$ )] (figura 6L) y también un menor número de errores [ $F_{3,28} = 26,653$ ,  $p < 0,001$  ( $=0,0000235$ )] (figura 6M) por parte de los ratones Tg. De nuevo, los ratones tratados con

wtTIDM presentaron un mayor número de giros positivos [ $p < 0,001$  ( $=0,0000954$ )] y menos giros negativos [ $p < 0,001$  ( $=0,000123$ )] en comparación con los ratones Tg tratados con mTIDM (figuras 6L-M). Los inventores también monitorizaron la memoria a corto plazo de los ratones Tg mediante la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR). Los ratones Tg presentaron déficits significativos [ $p < 0,001$  ( $=0,0000149$ )] en la prueba de NOR demostrados por el índice de discriminación (figura 6N) en comparación con los ratones no Tg de la misma edad. Sin embargo, los ratones tratados con el péptido wtTIDM mostraron una mejora significativa ( $p < 0,001$ ) en la memoria a corto plazo en comparación con los ratones Tg sin tratar o los Tg tratados con mTIDM (figura 6N). Por otro lado, las actividades de motricidad gruesa de los ratones Tg y no Tg fueron casi similares (figura 23). Además, ni el péptido wtTIDM ni el mTIDM modularon las actividades de motricidad gruesa en los ratones Tg, como se desprende del número de movimientos, la actividad horizontal, el tiempo de descanso y la estereotipia (figuras 23A-D), lo que sugiere que la mejora de la memoria mediante el tratamiento con el péptido wtTIDM no se debe a ninguna alteración en las actividades de motricidad gruesa.

Ejemplo 29: El péptido wtTIDM requiere TLR2 para reducir las placas y mejorar la memoria en ratones Tg 5XFAD:

**[0078]** Para confirmar que el péptido wtTIDM requiere de hecho que el TLR2 presente su función *in vivo*, se cruzaron ratones Tlr2<sup>-/-</sup> con ratones Tg para crear ratones 5XFAD nulos para Tlr2 (Tg-Tlr2<sup>-/-</sup>). La atenuación del Tlr2 no alteró la inserción o expresión de los transgenes 5XFAD, y viceversa (figura S24A). Los ratones WT, Tlr2<sup>-/-</sup>, Tg y Tg-Tlr2<sup>-/-</sup> de seis meses no difirieron significativamente con respecto al peso corporal bruto o al peso cerebral húmedo (figuras 24B-C). Tampoco se encontraron diferencias fenotípicas manifiestas, incluidas la dieta, los bolos fecales, la interacción social y la agitación entre los genotipos a esta edad. Aunque el péptido wtTIDM redujo la carga de placas y mejoró el aprendizaje espacial y la memoria en ratones Tg (figuras 5-6), siguió siendo incapaz de hacerlo en ratones Tg-Tlr2<sup>-/-</sup> (figuras 24D-G), lo que indica que el péptido wtTIDM es ineficaz en ausencia de Tlr2.

Ejemplo 30: El péptido wtTIDM, pero no el mTIDM, suprime el proceso patológico de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) y la artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones:

**[0079]** Al ser un miembro importante de las vías inmunitarias innatas, la señalización del TLR2 dependiente de MyD88 desempeña una función importante en la patogenia de una amplia variedad de trastornos infecciosos y autoinmunitarios (31, 32). Por lo tanto, se examinó si la función del péptido wtTIDM se limitaba solo a ratones 5XFAD o también a otros modelos de enfermedad. La EAE es el modelo animal de esclerosis múltiple (EM) ampliamente utilizado y la forma crónica de la EAE se modela en ratones C57/BL6 machos tras la inmunización con MOG35-55. De manera similar a su efecto en ratones 5XFAD, el tratamiento intranasal de ratones con EAE con el péptido wtTIDM inhibió fuertemente los síntomas clínicos de la EAE (figura 7A). Al comparar las medias entre grupos con análisis de comparaciones múltiples de Dunnett, se descubrió que había una diferencia significativa de las medias entre EAE y EAE+wtTIDM ( $p$  ajustado  $< 0,001$ ). Por otro lado, el péptido mTIDM no tuvo ningún efecto (figura 7A), lo que sugiere la especificidad del efecto. Como era de esperar, la inducción de la EAE redujo las actividades locomotoras en ratones, lo que resulta evidente por el análisis del gráfico cromático (figura 7B), la distancia recorrida (figura 7C), el levantamiento (figura 7D), la velocidad (figura 7E) y la aceleración (figura 7F). El análisis de la huella (figura 25) también indicó una disminución en la longitud de la zancada (figura 7G) y la longitud de la punta (figura 7H) y un aumento en la longitud de balanceo (figura 7I) y la extensión de los dedos de los pies (figura 7J) en ratones con EAE en comparación con los ratones normales. También se encontró que los ratones con EAE arrastraban los dedos con frecuencia (figura 25). Sin embargo, el tratamiento intranasal con el péptido wtTIDM, pero no con mTIDM, mejoró las actividades locomotoras y normalizó las huellas en ratones con EAE (figuras 7A-K y figura 25). La AIC es un modelo animal de artritis reumatoide muy utilizado. Al igual que en los ratones EAE, el péptido wtTIDM, pero no mTIDM, también disminuyó los síntomas clínicos de la AIC en ratones (figura 7L). Al comparar las medias entre grupos con análisis de comparaciones múltiples de Dunnett, se descubrió que había una diferencia significativa de las medias entre AIC y AIC+wtTIDM [ $p$  ajustado =  $0,0148$  ( $< 0,05$ )]. El péptido wtTIDM también mejoró las actividades locomotoras (figuras 7N-R) y mejoró el comportamiento de la huella (figuras 7S-V y figura 26).

Ejemplo 31: La administración intranasal del dominio del péptido MyD88 que interactúa con TLR2 (TIDM) reduce la  $\alpha$ -sinucleinopatía: Implicaciones para la enfermedad de Parkinson, la atrofia multisistémica y la demencia con cuerpos de Lewy

**[0080]** Los hallazgos patológicos de la enfermedad de Parkinson (EP) incluyen una pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en el SNpc y la presencia de agregación intracitoplasmática de la proteína  $\alpha$ -sin en forma de cuerpos de Lewy en las neuronas supervivientes. Además de la EP, la acumulación de  $\alpha$ -sin también es una característica patológica importante de la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y atrofia multisistémica (AMS). Por lo tanto, la disminución de la patología con cuerpos de Lewy tiene importancia terapéutica en la EP, la DCL y la AMS. La activación microglial desempeña una función importante en la patogenia de las enfermedades con cuerpos de Lewy y se ha demostrado que la  $\alpha$ -sin fibrilar requiere TLR2 para la activación de la microglía. Recientemente, los inventores han demostrado que el péptido correspondiente al dominio de MyD88 que interactúa con TLR2 (TIDM) inhibe selectivamente la activación de TLR2. Este estudio subraya la importancia del péptido TIDM para reducir la  $\alpha$ -sinucleinopatía. La administración intranasal del péptido TIDM natural (wt) redujo la expresión microglial del óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en la sustancia negra de ratones transgénicos A53T (figuras 28 A-B). Aunque el péptido wtTIDM inhibió la expresión de iNOS, se observó un aumento de la arginasa-1 en la sustancia negra de los

ratones A53T después del tratamiento con wtTIDM (figuras 29 A-B), lo que sugiere cambiar la activación microglial del modo M1 al M2 mediante el péptido wtTIDM. El tratamiento intranasal diario de ratones A53T con el péptido wtTIDM también condujo a una reducción de la  $\alpha$ -sin oligomérica y monomérica (figuras 30 A-C) y a la supresión de los cuerpos de inclusión de  $\alpha$ -sin dentro de las neuronas dopaminérgicas positivas para la tirosina hidroxilasa (figuras 31 A-D). También se observó una disminución de la  $\alpha$ -sin microglial en la sustancia negra de los ratones A53T después del tratamiento con el péptido wtTIDM (figuras 32 A-B). Finalmente, el tratamiento con el péptido wtTIDM mejoró las actividades locomotoras de los ratones A53T (figuras 33 A-E). Estos resultados fueron específicos ya que el péptido TIDM mutado no presentó ningún efecto protector de este tipo en ratones A53T. Por lo tanto, el tratamiento intranasal del péptido wtTIDM puede ser beneficioso para la EP, la AMS y la DCL.

## Referencias

### [0081]

1. Tanzi RE y Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. 2005;120(4):545-55.
2. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J y Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci*. 1998;1(5):355-8.
3. Raichlen DA y Alexander GE. Exercise, APOE genotype, and the evolution of the human lifespan. *Trends Neurosci*. 2014;37(5):247-55.
4. Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP y Ferreira A. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(9):6364-9.
5. Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T y col. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 2007;316(5825):750-4.
6. Benilova I, Karran E y De Strooper B. The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*. 2012;15(3):349-57.
7. Heppner FL, Ransohoff RM y Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(6):358-72.
8. Xu H, Gelyana E, Rajsombath M, Yang T, Li S y Selkoe D. Environmental Enrichment Potently Prevents Microglia-Mediated Neuroinflammation by Human Amyloid beta-Protein Oligomers. *J Neurosci*. 2016;36(35):9041-56.
9. Nathan C, Calingasan N, Nezezon J, Ding A, Lucía MS, La Perle K y col. Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 2005;202(9):1163-9.
10. Jana A y Pahan K. Fibrillar amyloid-beta-activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2010;30(38):12676-89.
11. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Jr., Baron P, Villalba M y col. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*. 1995;374(6523):647-50.
12. Mark RE, Sheng JG y Griffin WS. Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55(3):273-9.
13. Vlad SC, Miller DR, Kowall NW y Felson DT. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*. 2008;70(19):1672-7.
14. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430(6996):257-63.
15. O'Neill LA, Golenbock D y Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):453-60.
16. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(6):429-39.
17. Jana M, Palencia CA y Pahan K. Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *J Immunol*. 2008;181(10):7254-62.
18. Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, Penke B y col. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J Immunol*. 2012;188(3):1098-107.

19. Reed-Geaghan EG, Reed QW, Cramer PE y Landreth GE. Deletion of CD14 attenuates Alzheimer's disease pathology by influencing the brain's inflammatory milieu. *J Neurosci*. 2010;30(46):15369-73.
- 5 20. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M y Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(8):546-58.
21. Gonzalez-Scarano F y Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:219-40.
- 10 22. Rangasamy SB, Corbett GT, Roy A, Modi KK, Bennett DA, Mufson EJ y col. Intranasal Delivery of NEMO-Binding Domain Peptide Prevents Memory Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;47(2):385-402.
- 15 23. Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM y col. Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(47):18754-9.
24. Mondal S, Roy A, Jana A, Ghosh S, Kordower JH y Pahan K. Testing NF-kappaB-based therapy in hemiparkinsonian monkeys. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(3):544-56.
- 20 25. Saha RN y Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(5-6):929-47.
- 25 26. Corbett GT, Gonzalez FJ y Pahan K. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(27):8445-50.
27. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J y col. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*. 2006;26(40):10129-40.
- 30 28. Mondragon-Rodriguez S, Perry G, Luna-Munoz J, Acevedo-Aquino MC y Williams S. Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40(2):121-35.
- 35 29. Regan P, Piers T, Yi JH, Kim DH, Huh S, Park SJ y col. Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *J Neurosci*. 2015;35(12):4804-12.
30. Kanno T, Tsuchiya A y Nishizaki T. Hyperphosphorylation of Tau at Ser396 occurs in the much earlier stage than appearance of learning and memory disorders in 5XFAD mice. *Behav Brain Res*. 2014;274:302-6.
- 40 31. Liu Y, Yin H, Zhao M y Lu Q. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014;47(2):136-47.
- 45 32. Oliveira-Nascimento L, Massari P y Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol*. 2012;3:79.
33. Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG y Landreth GE. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A{beta}-stimulated microglial activation. *J Neurosci*. 2009;29(38):11982-92.
- 50 34. Yu JT, Mou SM, Wang LZ, Mao CX y Tan L. Toll-like receptor 2 -196 to -174 del polymorphism influences the susceptibility of Han Chinese people to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2011;8:136.
35. Zhang W, Wang LZ, Yu JT, Chi ZF y Tan L. Increased expressions of TLR2 and TLR4 on peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 2012;315(1-2):67-71.
- 55 36. Balayssac S, Burlina F, Convert O, Bolbach G, Chassaing G y Lequin O. Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency. *Biochemistry*. 2006;45(5):1408-20.
- 60 37. Borrelli A, Tornesello AL, Tornesello ML y Buonaguro FM. Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Moléculas*. 2018;23(2).
38. Bera S, Kar RK, Mondal S, Pahan K y Bhunia A. Structural Elucidation of the Cell-Penetrating Penetratin Peptide in Model Membranes at the Atomic Level: Probing Hydrophobic Interactions in the Blood-Brain Barrier. *Biochemistry*. 2016;55(35):4982-96.
- 65

39. Richard KL, Filali M, Prefontaine P y Rivest S. Toll-like receptor 2 acts as a natural innate immune receptor to clear amyloid beta 1-42 and delay the cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2008;28(22):5784-93.
- 5 40. Friis LM, Keelan M y Taylor E. *Campylobacter jejuni* drives MyD88-independent interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2009;77(4):1553-60.
- 10 41. Gao Q, Qi L, Wu T y Wang J. *Clostridium butyricum* activates TLR2-mediated MyD88-independent signaling pathway in HT-29 cells. *Mol Cell Biochem*. 2012;361(1-2):31-7.
42. Buggia-Prevot V, Sevalle J, Rossner S y Checler F. NFkappaB-dependent control of BACE1 promoter transactivation by Abeta42. *J Biol Chem*. 2008;283(15):10037-47.
- 15 43. Atri A. Effective pharmacological management of Alzheimer's disease. *Am J Manag Care*. 2011;17 supl 13:S346-55.
44. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC y col. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology*. 2006;66(12):1837-44.
- 20 45. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z y Wilson RS. Overview and findings from the religious orders study. *Curr Alzheimer Res*. 2012;9(6):628-45.
46. Bennett DA, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA y Wilson RS. Mild cognitive impairment is related to Alzheimer disease pathology and cerebral infarctions. *Neurology*. 2005;64(5):834-41.
- 25 47. Wilson RS, Beckett LA, Barnes LL, Schneider JA, Bach J, Evans DA y col. Diferencias individuales en las tasas de cambio en las capacidades cognitivas de las personas mayores. *Psychol Aging*. 2002;17(2):179-93.
- 30 48. Braak H y Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.
49. Jana A, Modi KK, Roy A, Anderson JA, van Breemen RB y Pahan K. Up-regulation of neurotrophic factors by cinnamon and its metabolite sodium benzoate: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(3):739-55.
- 35 50. Corbett GT, Roy A y Pahan K. Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, upregulates IL-1 receptor antagonist in mouse cortical neurons: implications for neuronal self-defense. *J Immunol*. 189(2):1002-13.
- 40 51. Khasnavis S y Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, upregulates neuroprotective Parkinson disease protein DJ-1 in astrocytes and neurons. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(2):424-35.
52. Roy A, Jana M, Kundu M, Corbett GT, Rangaswamy SB, Mishra RK y col. HMG-CoA Reductase Inhibitors Bind to PPARalpha to Upregulate Neurotrophin Expression in the Brain and Improve Memory in Mice. *Cell Metab*. 2015;22(2):253-65.
- 45 53. Roy A, Kundu M, Jana M, Mishra RK, Yung Y, Luan CH y col. Identificación y caracterización de los ligandos de PPARalfa en el hipocampo. *Nat Chem Biol*. 2016;12(12):1075-83.
- 50 54. Mondal S, Martinson JA, Ghosh S, Watson R y Pahan K. Protection of Tregs, suppression of Th1 and Th17 cells, and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis by a physically-modified saline. *PLoS ONE*. 2012;7(12):000.
- 55 55. Mondal S y Pahan K. Cinnamon ameliorates experimental allergic encephalomyelitis in mice via regulatory T cells: implications for multiple sclerosis therapy. *PLoS One*. 2015;10(1):e0116566.
56. Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG y Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci*. 1993;13(4):1676-87.
- 60 57. Roy A, Jana M, Corbett GT, Ramaswamy S, Kordower JH, Gonzalez FJ y col. Regulation of cyclic AMP response element binding and hippocampal plasticity-related genes by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Cell Rep*. 2013;4(4):724-
- 65 58. Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, Kandel ER y Bach ME. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell*. 1998;92(1):39-49.

59. Khasnavis S, Roy A, Ghosh S, Watson R y Pahan K. Protection of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease by a physically-modified saline containing charge-stabilized nanobubbles. J Neuroimmune Pharmacol. 2013;9(2):218-32.

5

Tabla S1

10

15

20

25

30

35

40

45

Número de muestras	AIC (n = 12)	DCL (n = 11)	EA (n = 10)
Edad (años) al fallecer	82,18±5,13	84,87±6,23	88,73±5,89
Número de hombres	4	7	5
Número de mujeres	8	4	5
Número de alelos ApoE e4	4	2	5
MEC	27,25±2,77	25,95±1,92	13,30±5,27
GCS	0,44±0,32	0,09±0,27	-1,13 ± 0,39
PMI (horas)	7,45±6,36	5,15±3,12	6,57±3,33
Distribución de las puntuaciones de Braak			
Sin EA	0	0	0
I/II	2	2	1
III/IV	10	7	5
V/VI	0	2	4
NIA Reagan			
Sin EA	0	0	0
Baja	5	3	1
Intermedia	7	7	6
Alta	0	1	3
CERAD			
Sin EA	5	3	0
Posible	0	0	0
Probable	5	6	6
Seguro	2	2	4

ADC, ausencia de deterioro cognitivo; DCL, deterioro cognitivo leve; AD, enfermedad de Alzheimer; ApoE, apolipoproteína E; MEC, Miniexamen Cognoscitivo; GCS, puntuación z cognitiva global; IPM, intervalo posmortal; NIA, Instituto Nacional de Envejecimiento de los EE. UU.; CERAD, consorcio para establecer un registro de la enfermedad de Alzheimer

50 Tabla S2

**Tabla S2:** Correlaciones de TLR2, TLR4 y MyD88 con las puntuaciones de las pruebas cognitivas

55

60

	ADC	DCL	EA	$p^0$	Por pares	$r_s^b$		
						MEC	GCS	Braak
MyD88	6,38 ± 1,26	14,69 ± 4,41	45,66 ± 7,72	<001	ADC, DCL < EA	-0,538, $p = 0,001$	-0,475, $p = 0,005$	0,371, $p = 0,033$
TLR2	34,75 ± 6,05	29,98 ± 11,44	69,37 ± 11,47	0,018	ADC, DCL < EA	-0,278, $p = 0,117$	-0,177, $p = 0,326$	-0,463, $p = 0,007$
TLR4	15,36 ± 3,82	14,61 ± 4,92	10,55 ± 1,61	0,620	N/A	-173, $p = 0,336$	0,047, $p = 0,794$	-0,012, $p = 0,947$

65

Los homogeneizados de la corteza prefrontal de ADC, DCL y EA se sometieron a inmunoelectrotransferencia con anticuerpos contra TLR2, TLR4 y MyD88. Se usó B-actina para normalizar la carga. Los valores representan la media ± SEM (rango). Los niveles de proteína de TLR2, TLR4 y MyD88 se correlacionaron con MMSE, GCS y Braak. AD, enfermedad de Alzheimer; DCL, deterioro cognitivo leve; ADC, ausencia de deterioro cognitivo; MEC, Miniexamen Cognoscitivo; GCS, puntuación z cognitiva global. <sup>a</sup>Prueba de Kruskal-Wallis corregida para

comparaciones múltiples; Correlación de rangos de Spearman (bilateral), sin ajustar.

Tabla S3

5

Tabla S3. **Anticuerpos, fuentes, aplicaciones y diluciones utilizadas**

Anticuerpo	Fabricante	Catálogo	Anfitrión	Aplicación	Dilución/cantidad
TLR2	Millipore	06-1119	Conejo	WB/IF	1:1000/1:100
10 TLR4	Abcam	Ab13556	Conejo	WB/IF	1:1000/1:150
MyD88	Millipore	AB16527	Conejo	WB	1:1000
MyD88	Abcam	Ab2068	Conejo	IF	1:150
15 MyD88	Santa Cruz	Sc11356	Conejo	IP	2 µg/reacción
β-actina	Abcam	Ab6276	Ratón	WB	1:6000
6E10	Covance	sig-39320	Ratón	WB	1:1000
20 p65 <sup>S536</sup> fosforilado	Señalización celular	3031S	Conejo	WB/IF	1:1000
82EI	IBL	10323	Ratón	IHC	1:1000
Iba-1	Abcam	Ab5076	Cabra	IF	1:500
GFAP	Dako	20334	Conejo	WB/ IF	1:1000/1:2000
25 NeuN	Millipore	NAB377	Ratón	IF	1:500
iNOS	BD Biosciences	610432	Ratón	WB/IF	1:200
Caspasa 3 escindida	Santa Cruz	sc-7148	Conejo	WB	1:100
30 PSD95	Abcam	Ab2723	Ratón	WB	1:1000
NR2A	Señalización celular	4205S	Conejo	WB	1:250
GluR1	Señalización celular	131855	Conejo	WB	1:250
35	WB, Western blot; IP, inmunoprecipitación; IHC, inmunohistoquímica; IF, inmunofluorescencia				

40

45

50

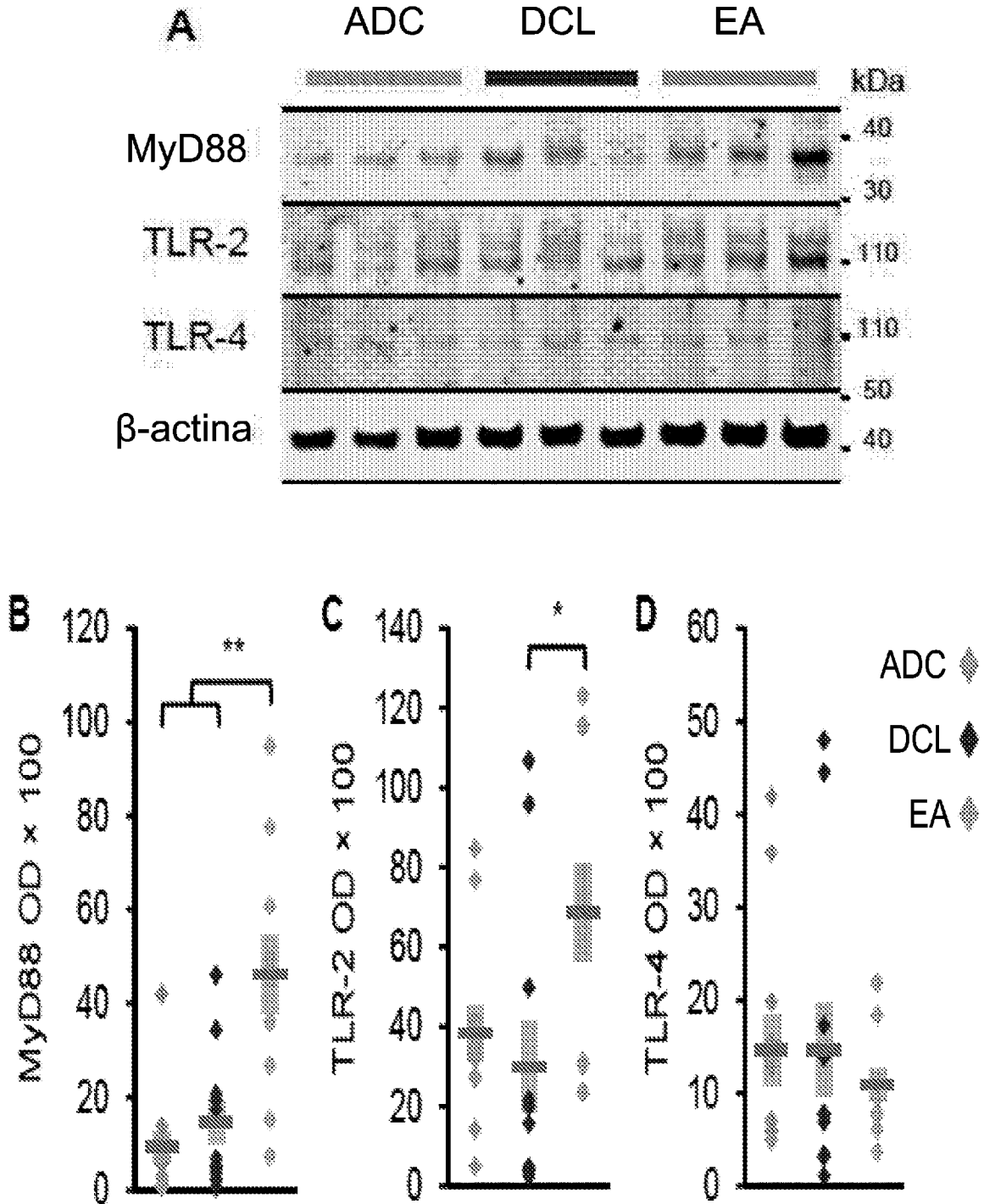
55

60

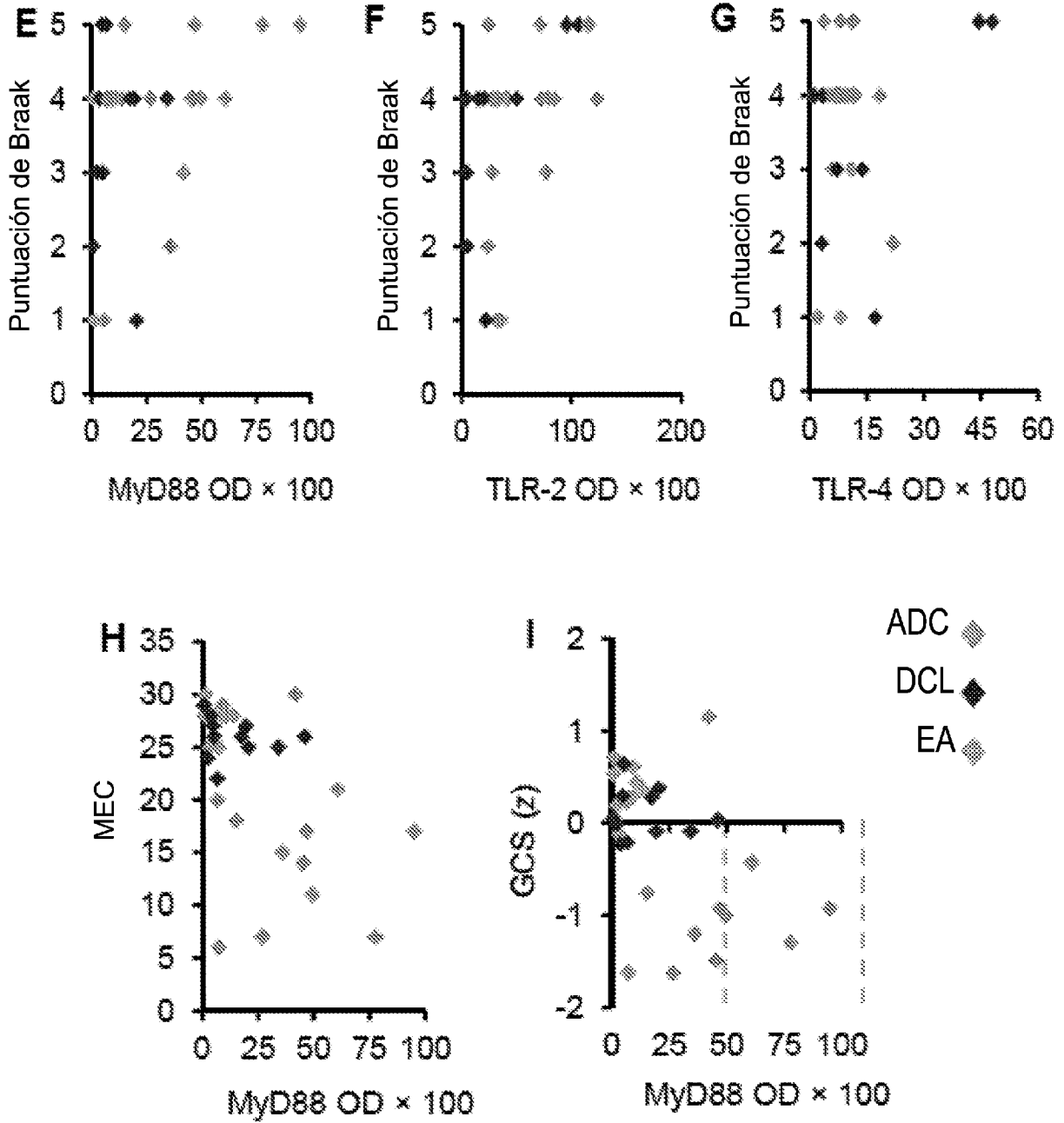
65

REIVINDICACIONES

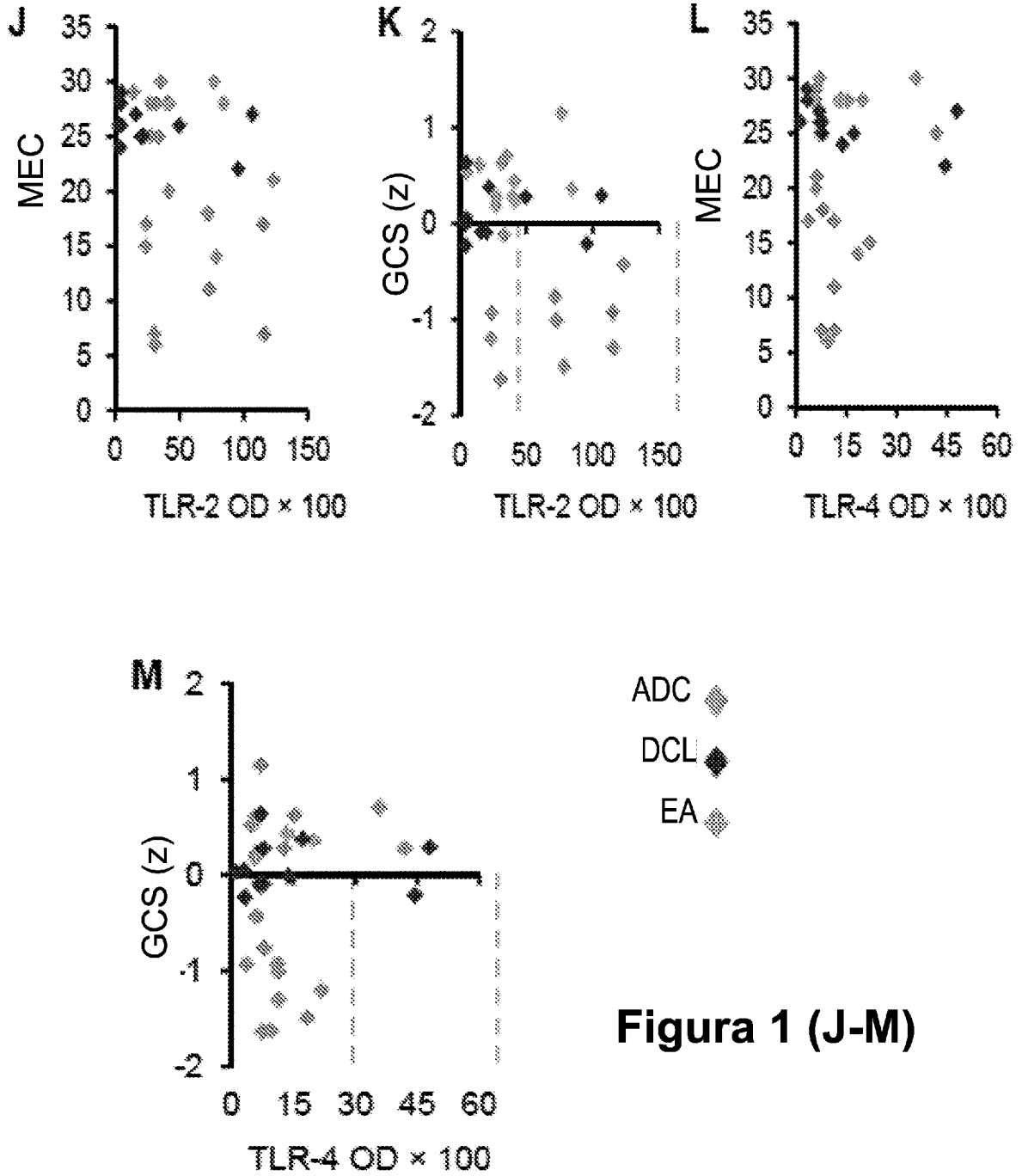
- 5 1. Una composición que comprende un péptido con la secuencia drqikiwfnrrmkwkkPGAHQK (Id. de sec. n.º: 2) para su uso como medicamento, en donde el uso comprende administrar al paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que al menos reduce la señalización de TLR2-MyD88.
- 10 2. Una composición que comprende un péptido con la secuencia drqikiwfnrrmkwkkPGAHQK (Id. de sec. n.º: 2) para su uso en el tratamiento de un trastorno en el que la señalización de TLR2-MyD88 desempeña una función en la patogenia de la enfermedad,
- 15 en donde el uso comprende administrar al paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que al menos reduce la señalización de TLR2-MyD88;
- 20 en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Huntington, la atrofia multisistémica, la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide.
- 25 3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el péptido se une a un vector de suministro que proporciona al menos uno de suministro intracelular a la célula y acceso a través de la barrera hematoencefálica.
- 30 4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el vector de suministro es el homeodominio de Antennapedia.
- 35 5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición comprende además al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en donde la composición se administra por vía intranasal.
- 45 7. La composición para su uso según la reivindicación 5, en donde la composición se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en las vías oral, subcutánea, intraarticular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal e intramuscular.
- 50 8. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el paciente es un paciente humano.
- 55 9. Una composición que comprende una secuencia peptídica PGAHQK (Id. de sec. n.º: 1) unida a un vector de suministro que proporciona al menos uno de suministro intracelular a la célula y acceso a través de la barrera hematoencefálica, en donde el vector de suministro es el homeodominio de Antennapedia.
- 60 10. La composición de la reivindicación 9, en donde la secuencia peptídica es drqikiwfnrrmkwkkPGAHQK (Id. de sec. n.º: 2).
- 65



**Figura 1 (A-D)**



**Figura 1 (E-I)**



**Figura 1 (J-M)**

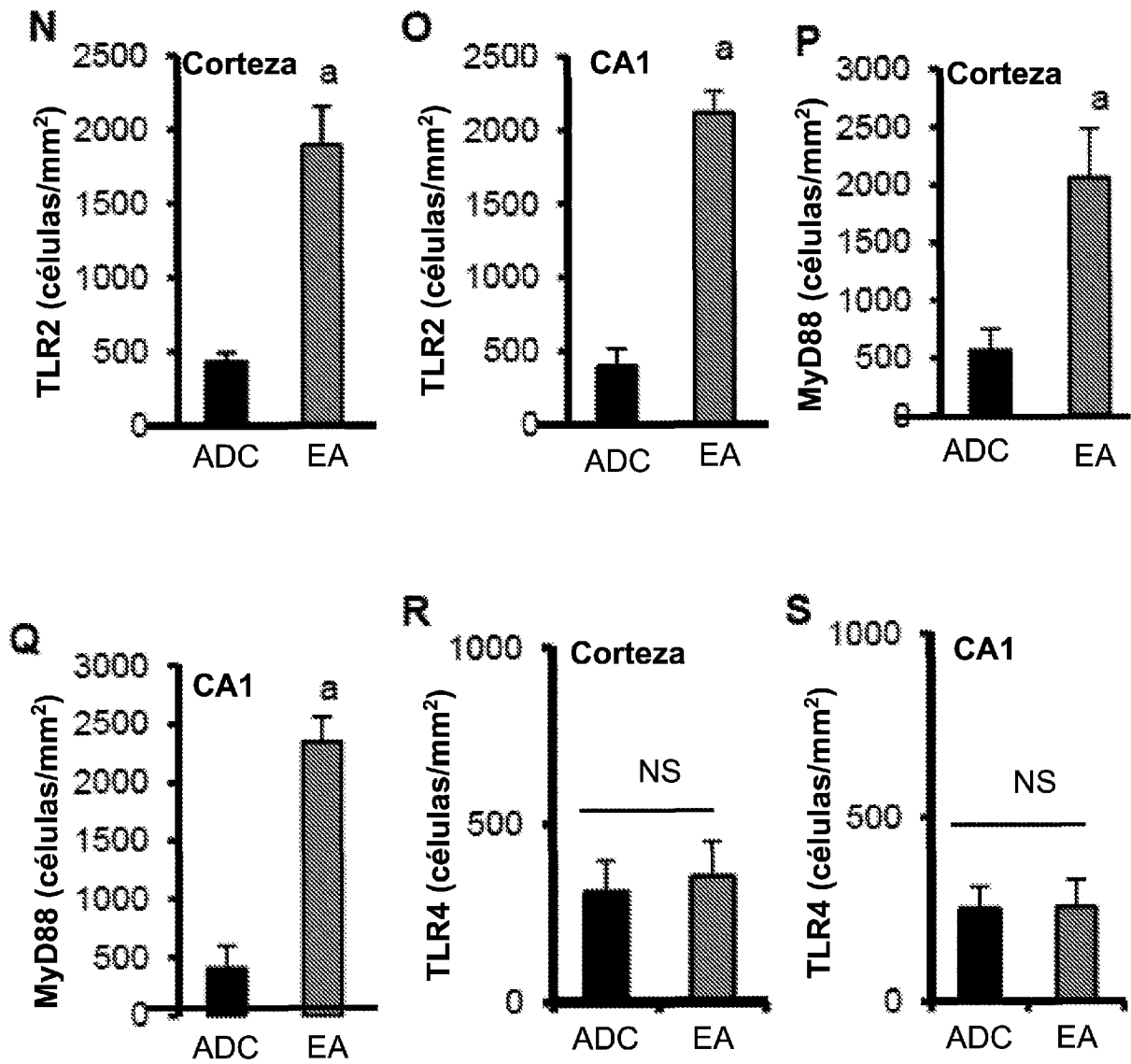
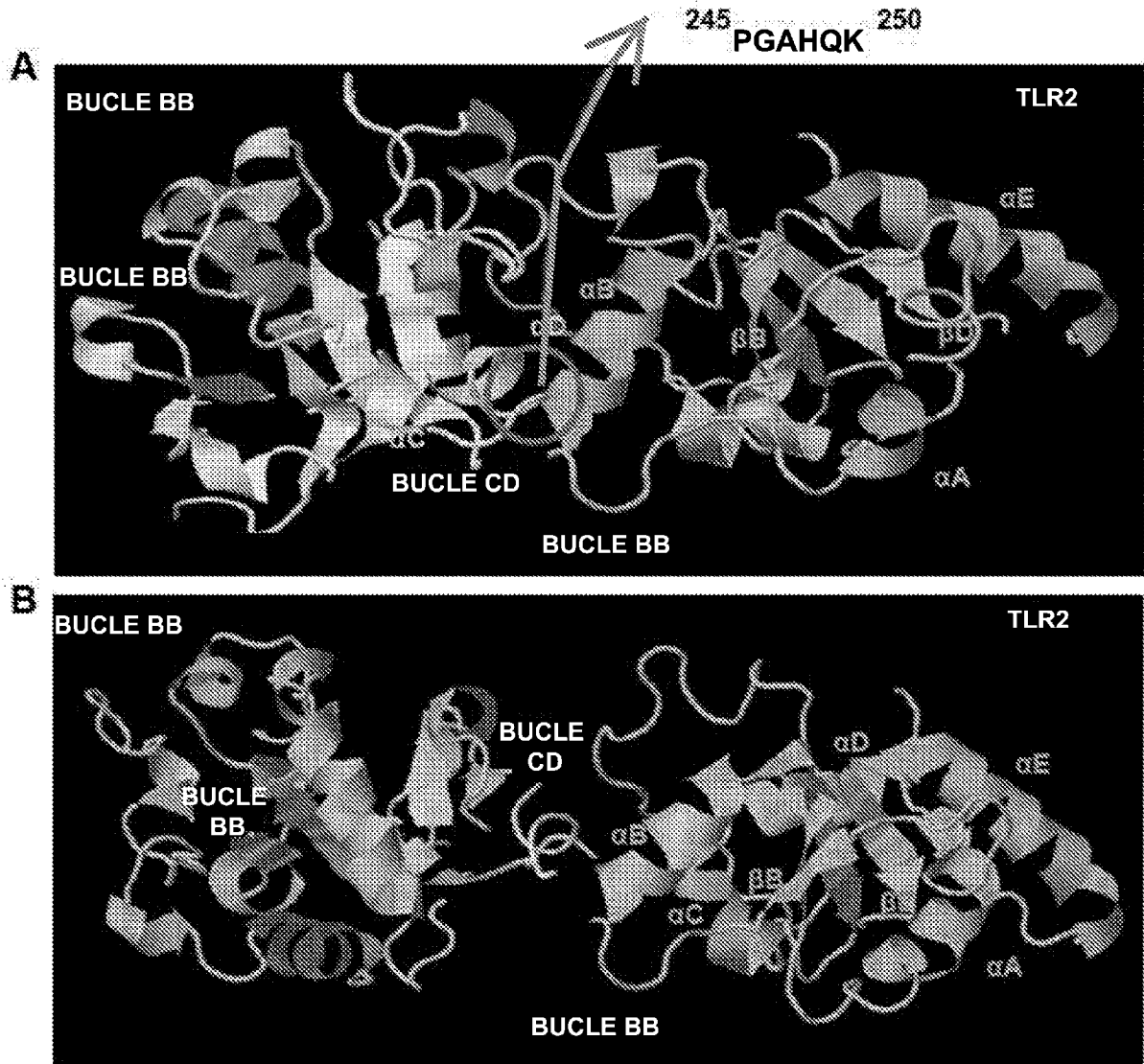


Figura 1 (N-S)



**Figura 2 (A-B)**

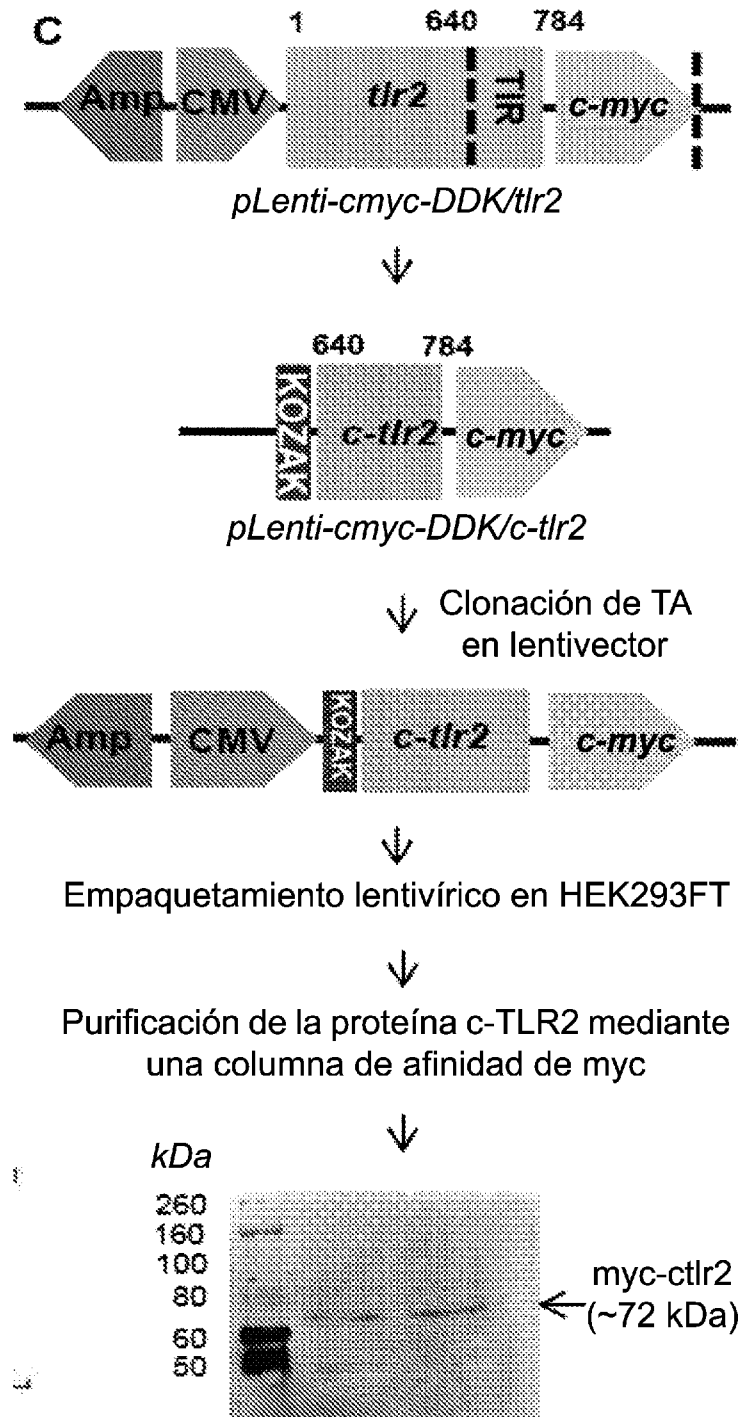


Figura 2 C

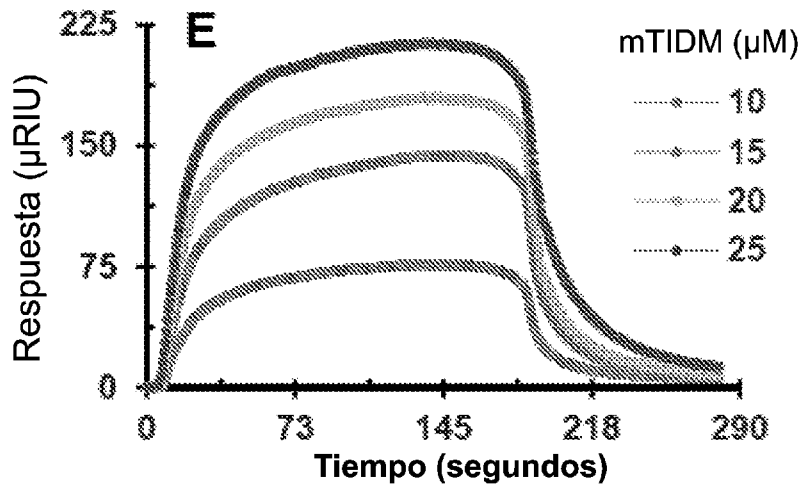
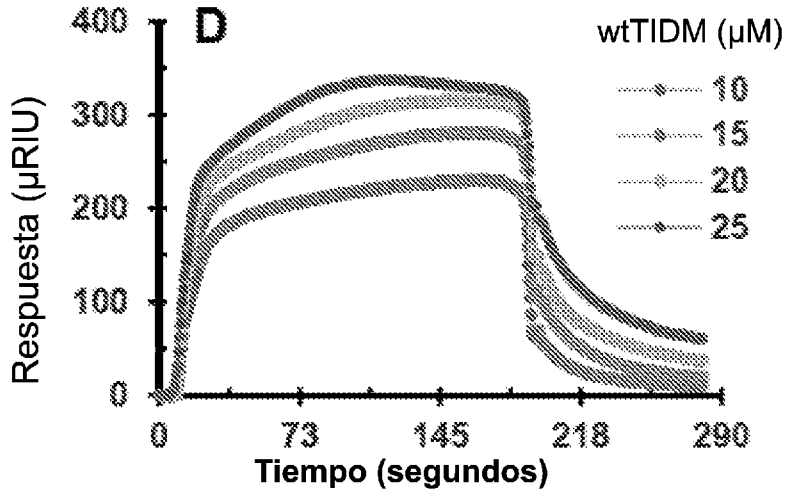
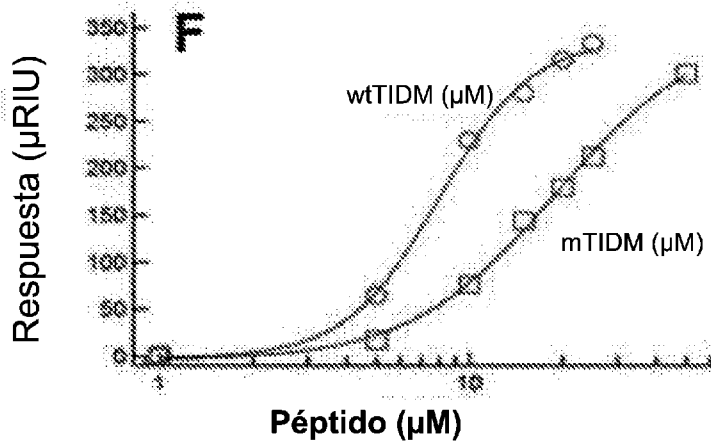


Figura 2 (D-F)



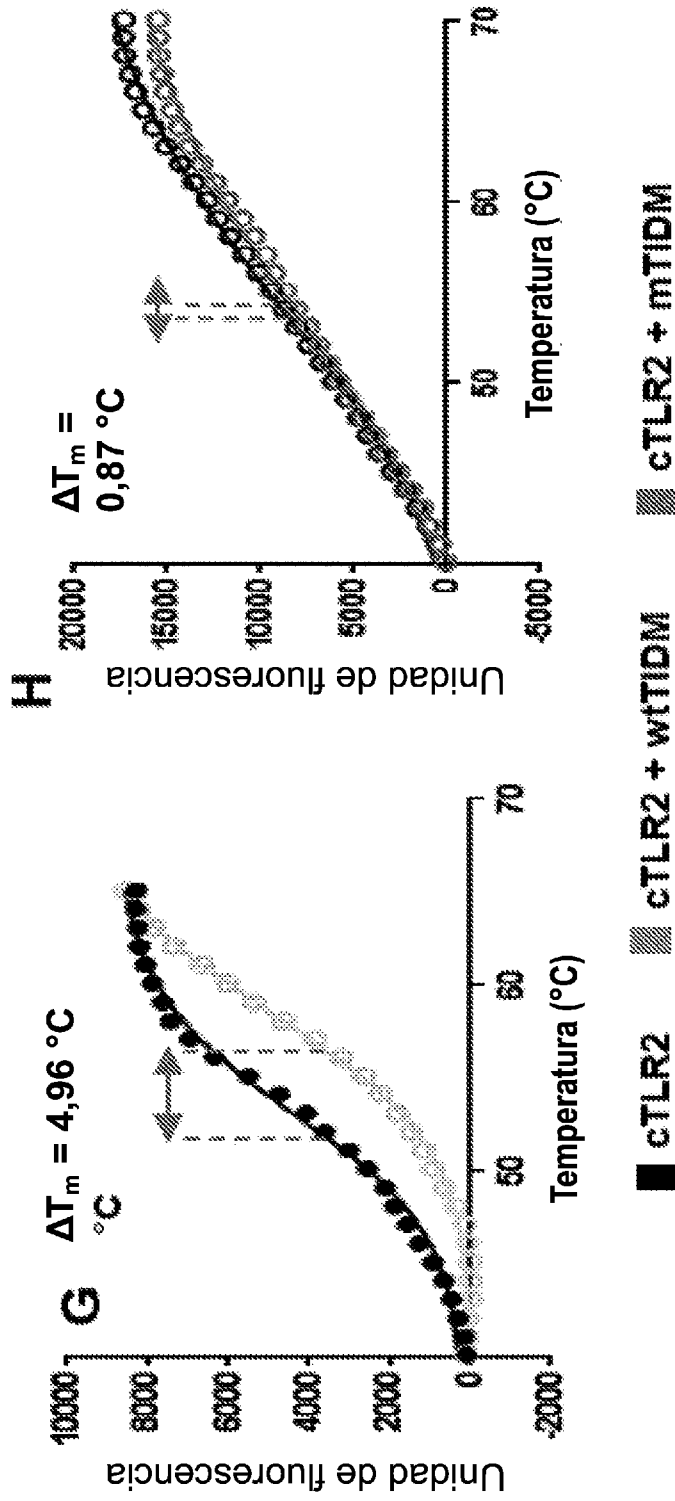


Figura 2 (G-H)

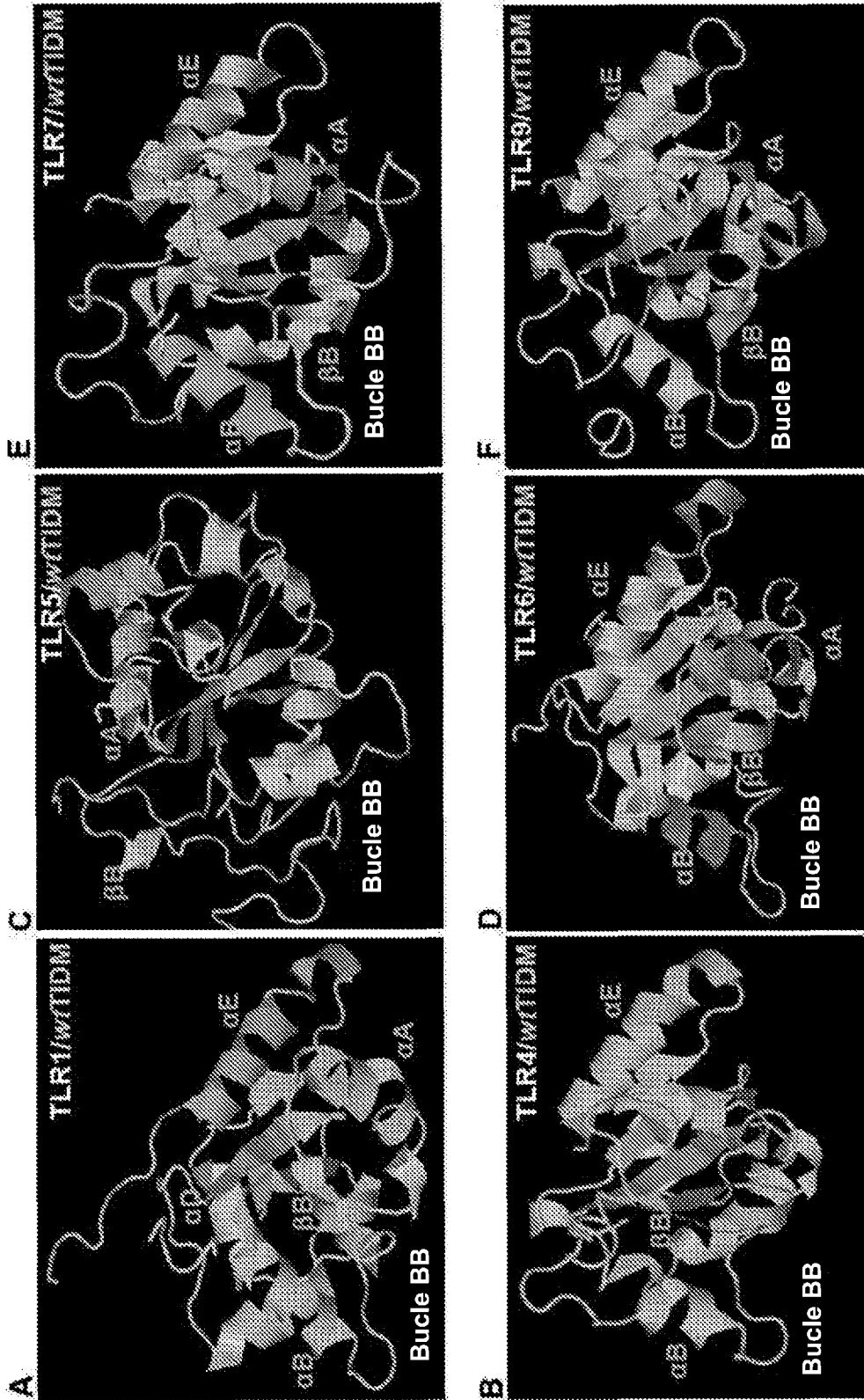
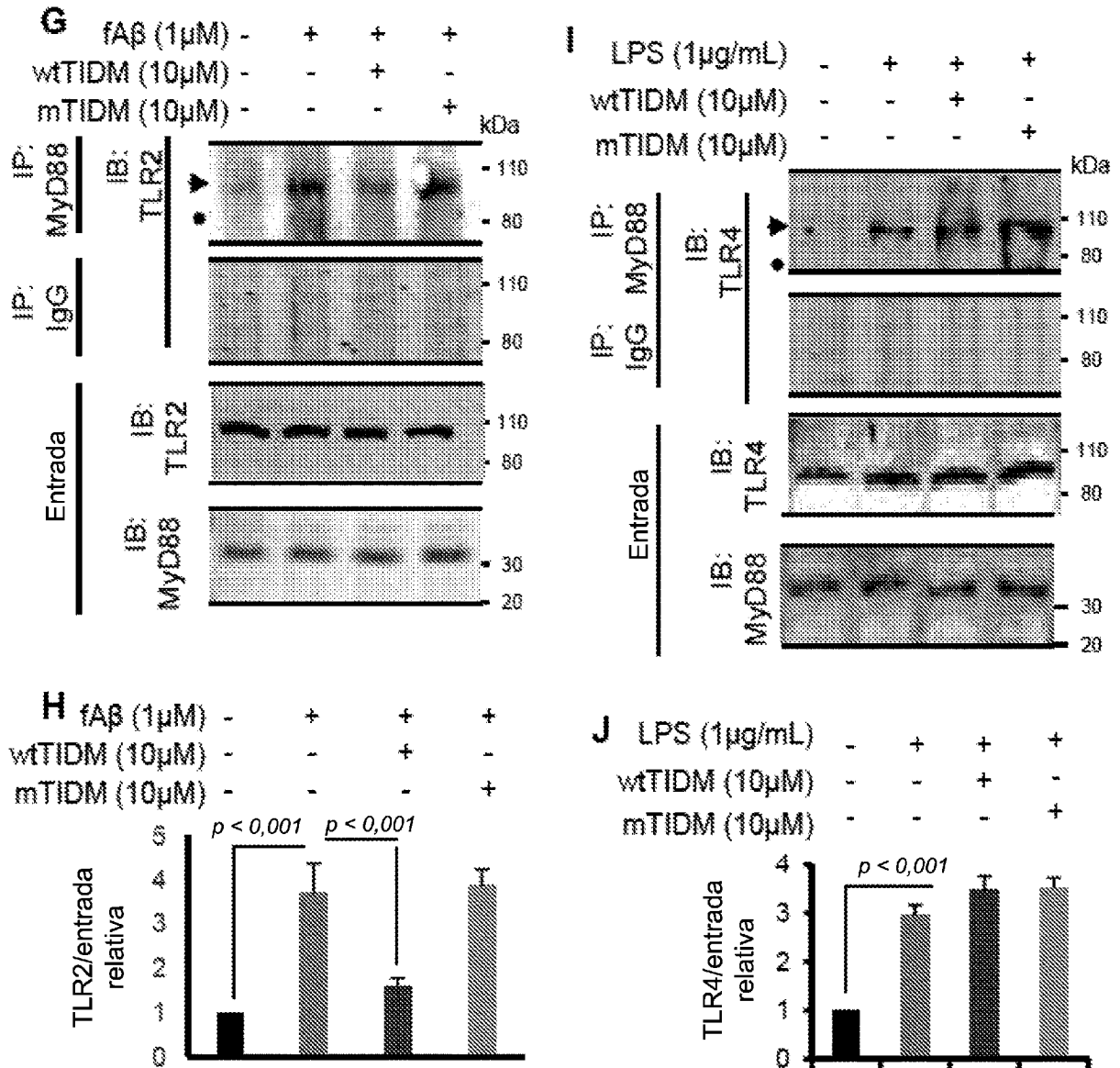
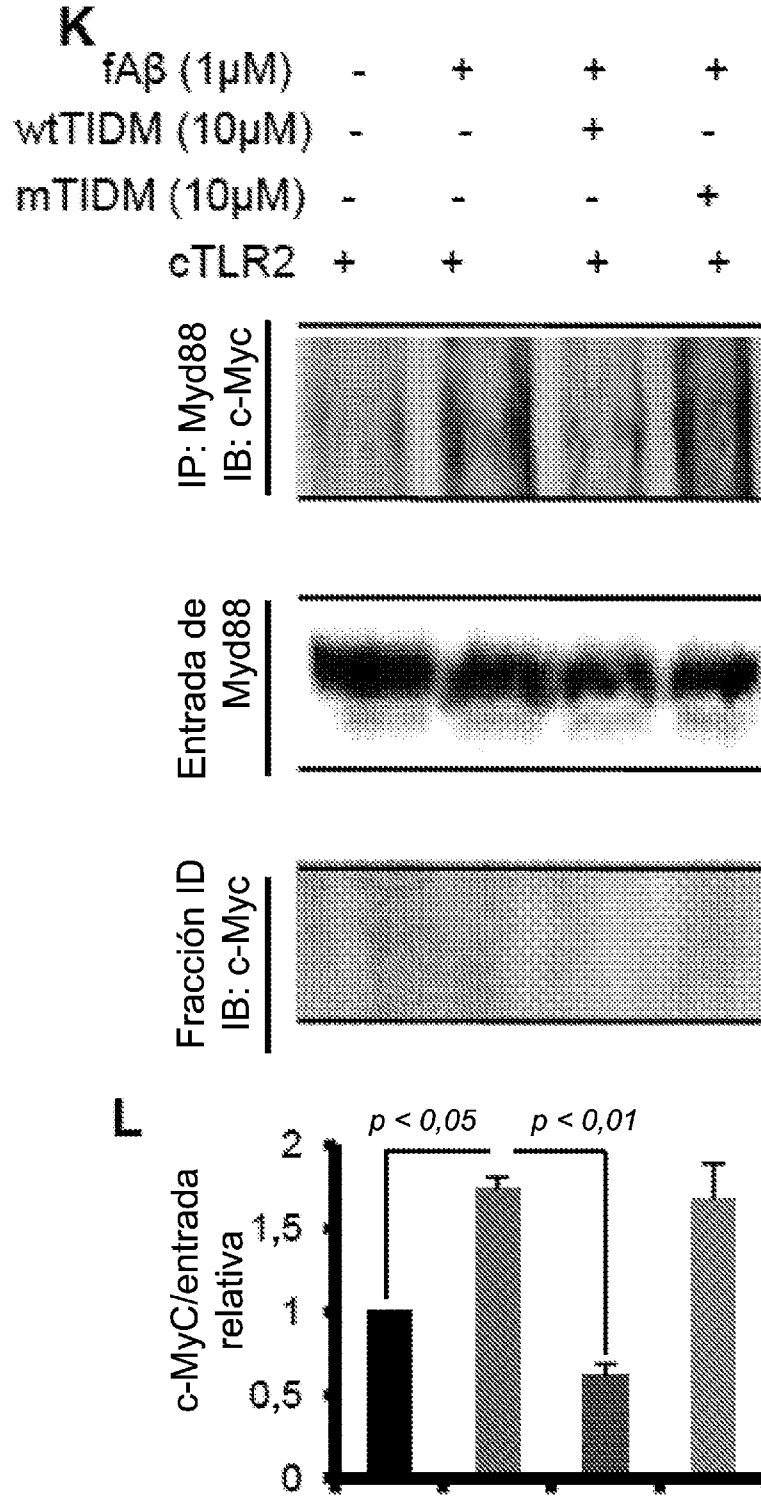


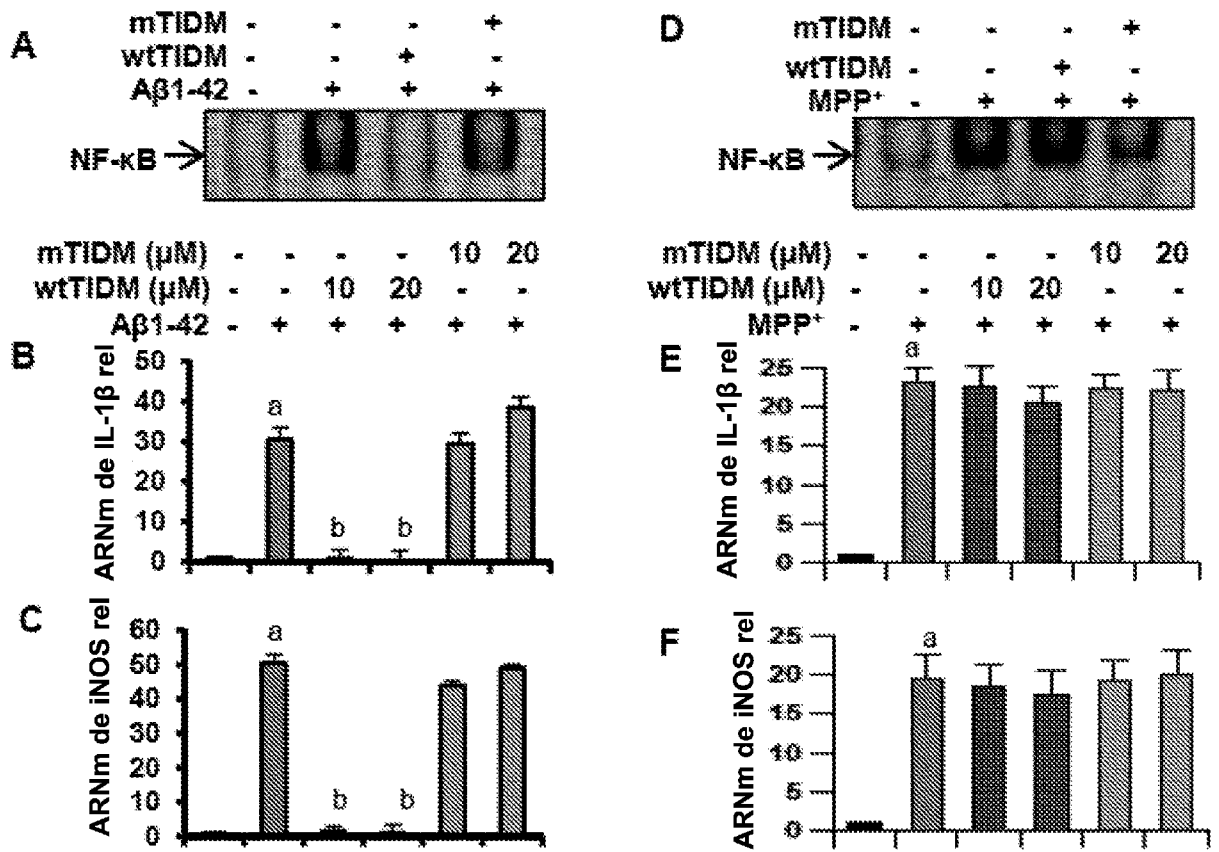
Figura 3 (A-F)



**Figura 3 (G-J)**



**Figura 3 (K-L)**



**Figura 4 (A-F)**

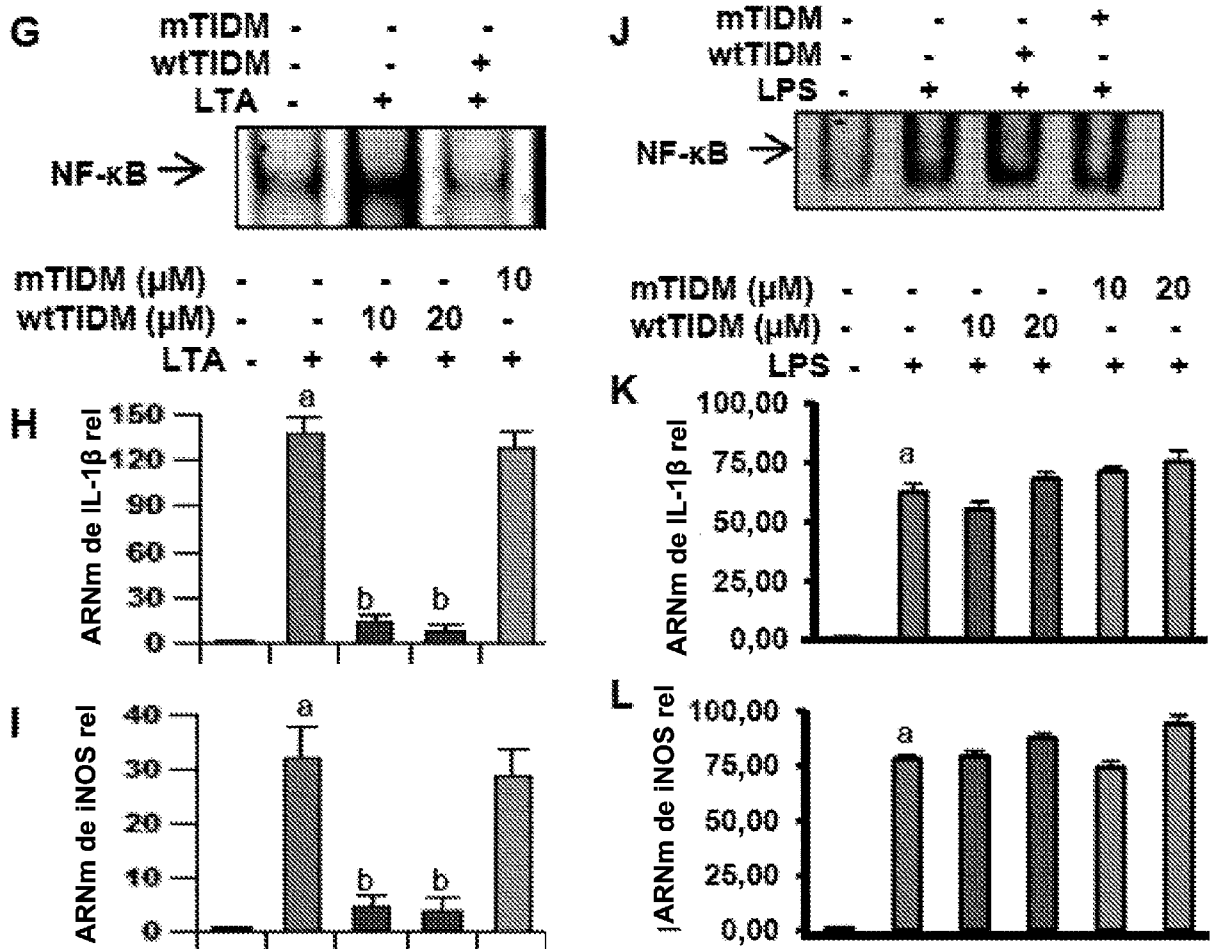


Figura 4 (G-L)

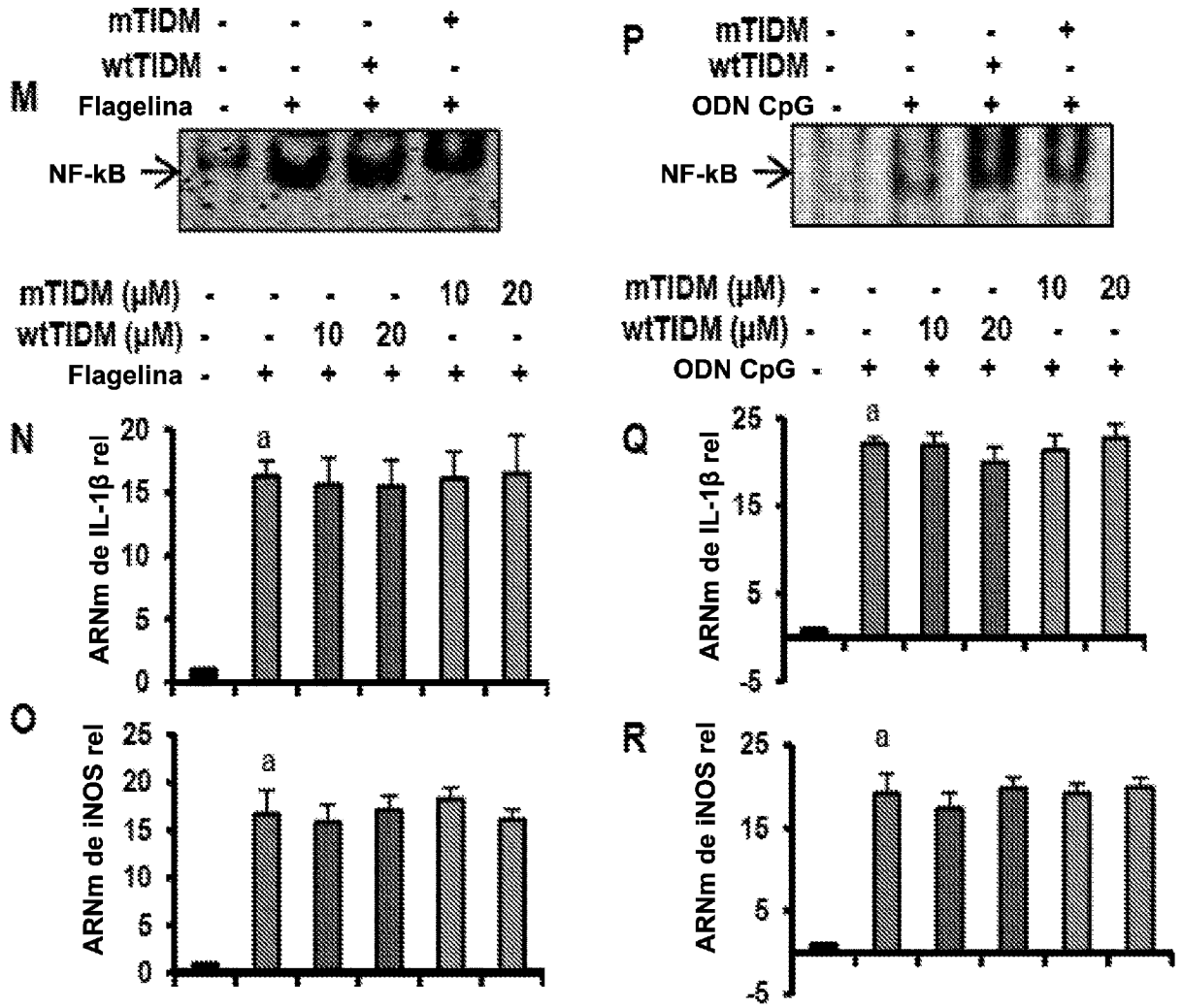


Figura 4 (M-R)

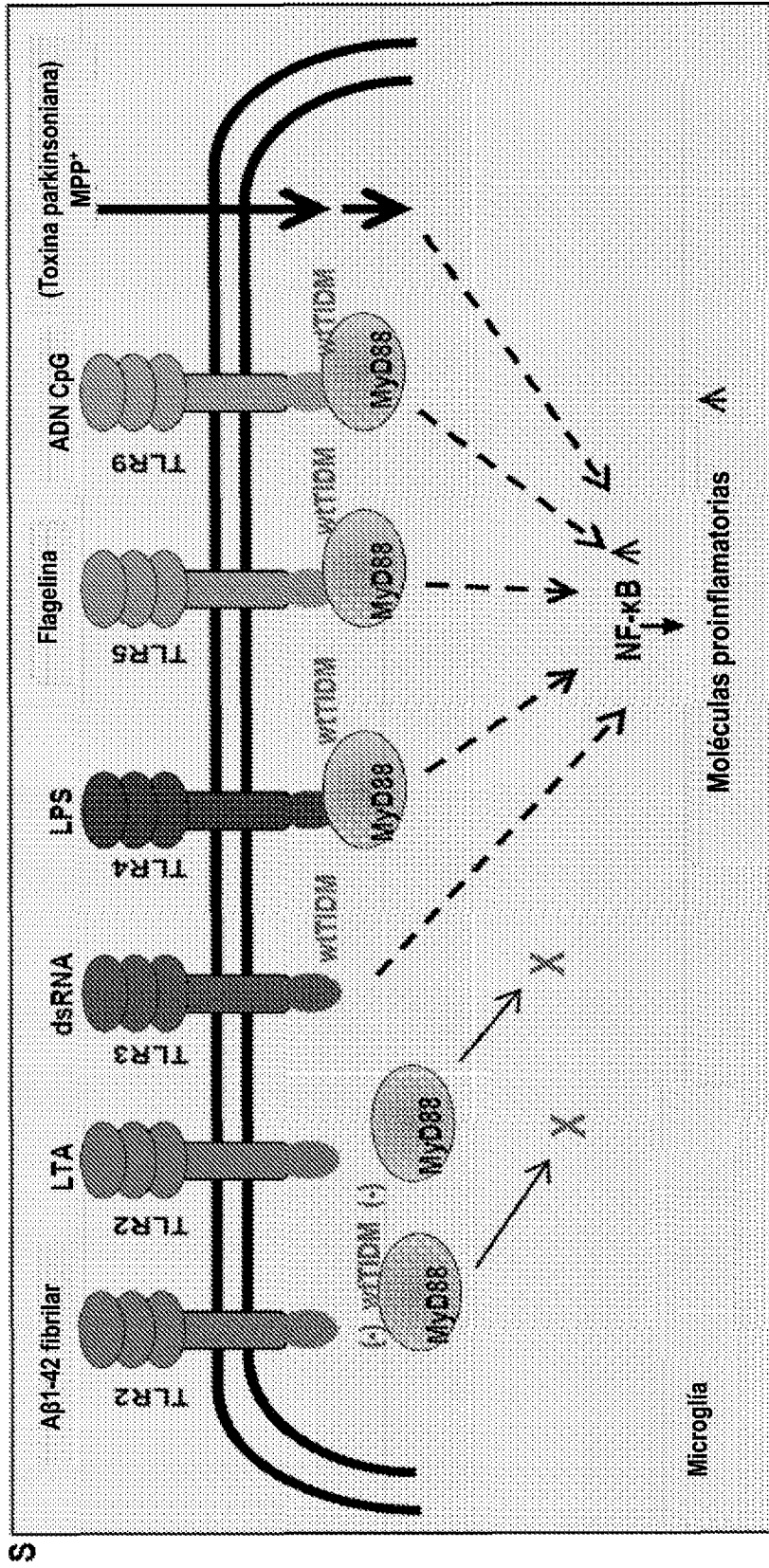


Figura 4 S

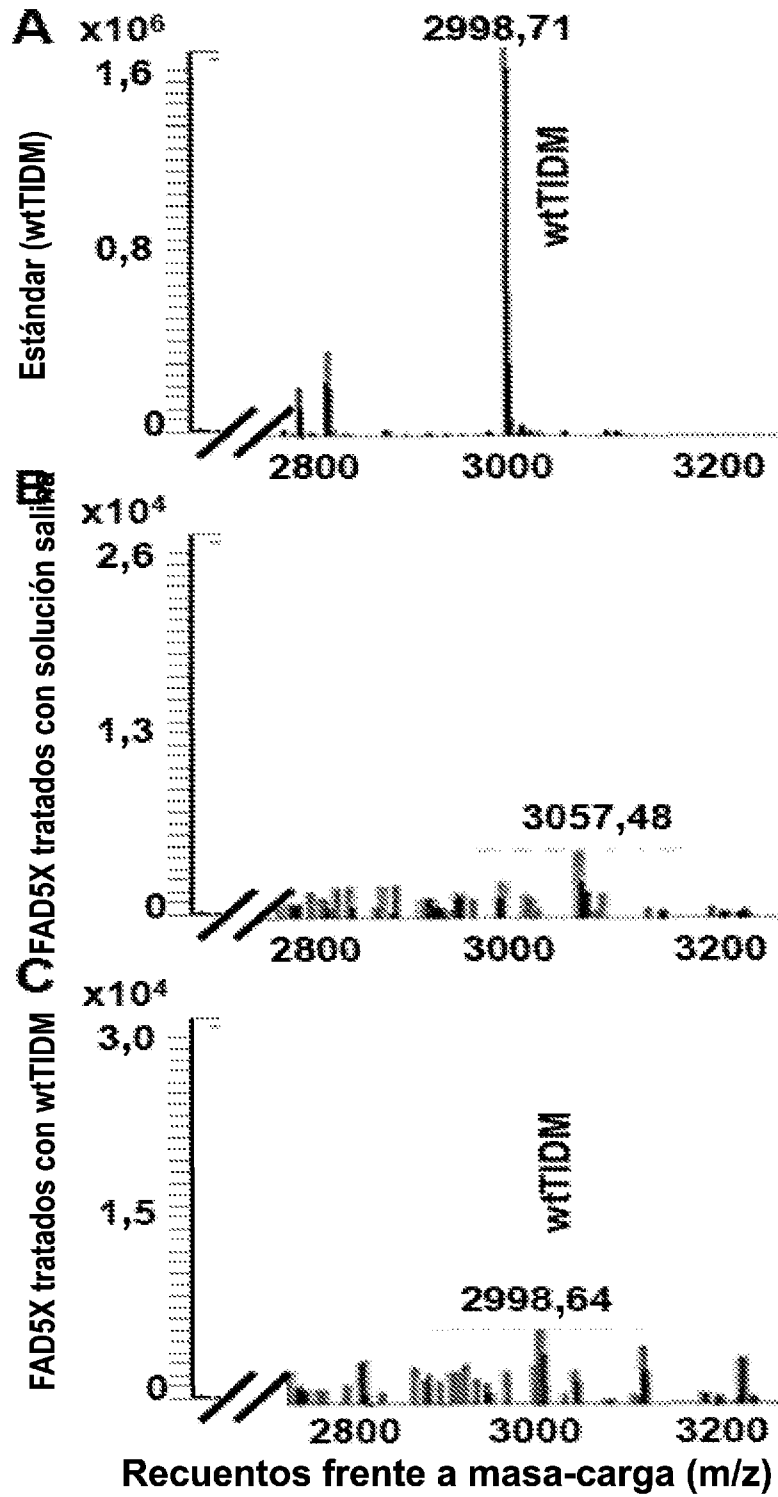
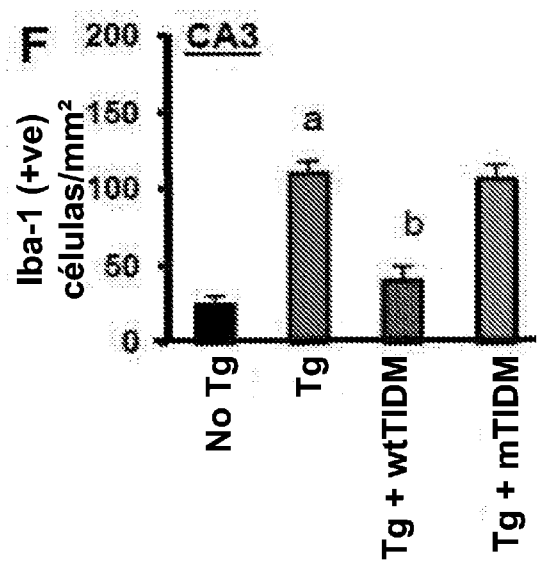
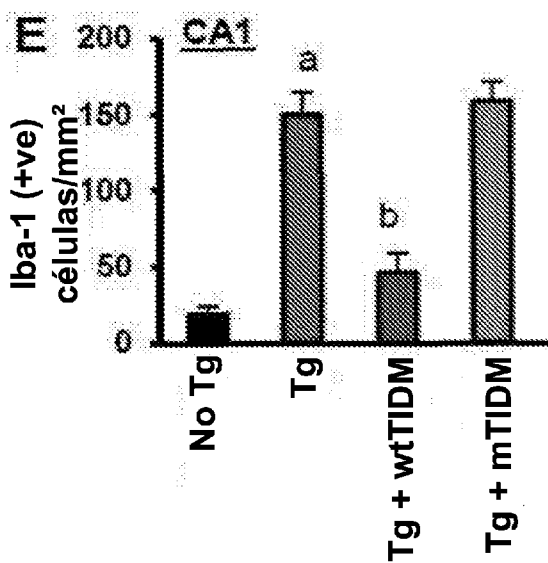
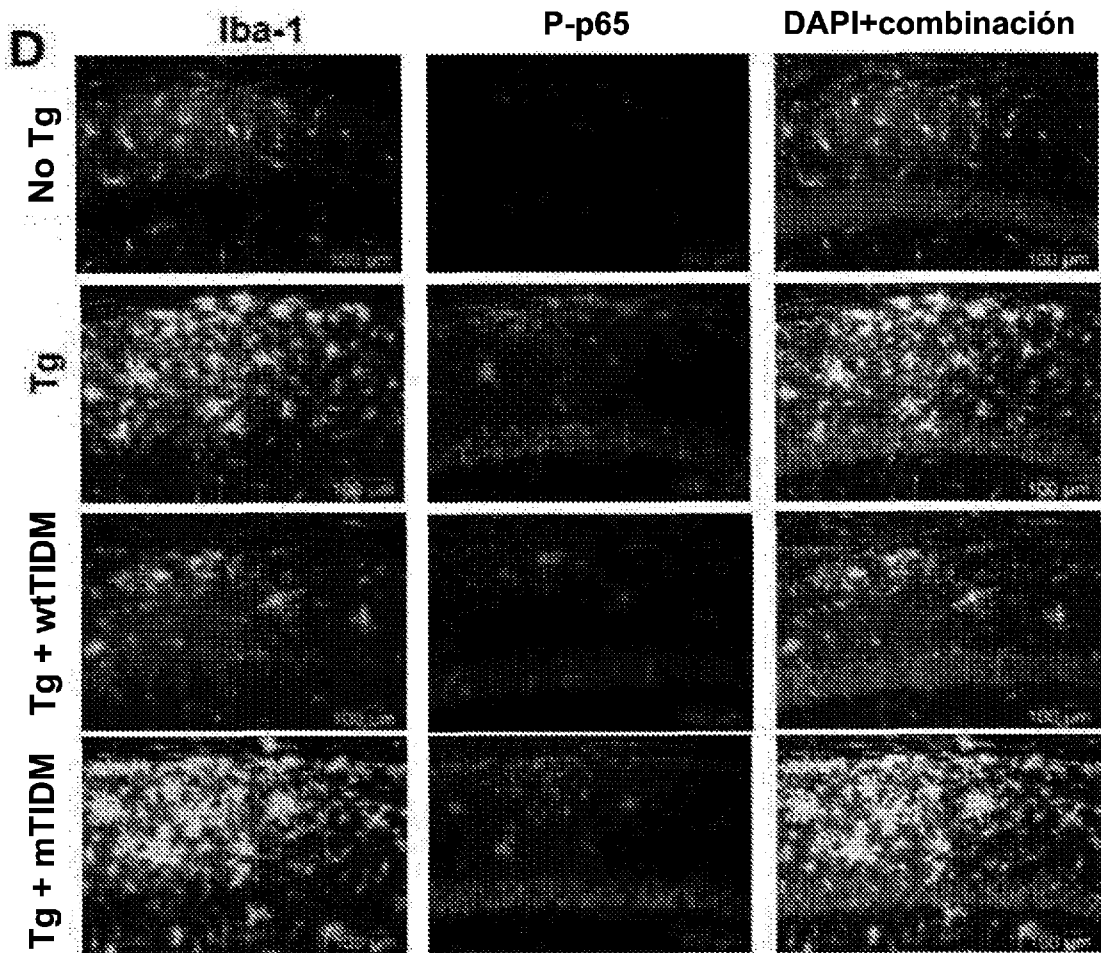


Figura 5 (A-C)



**Figura 5 (D-F)**

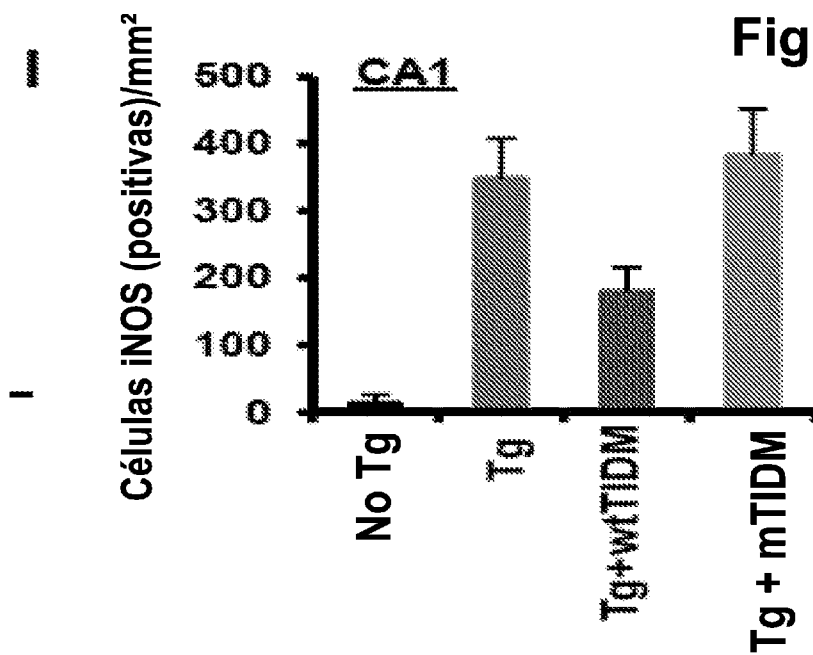
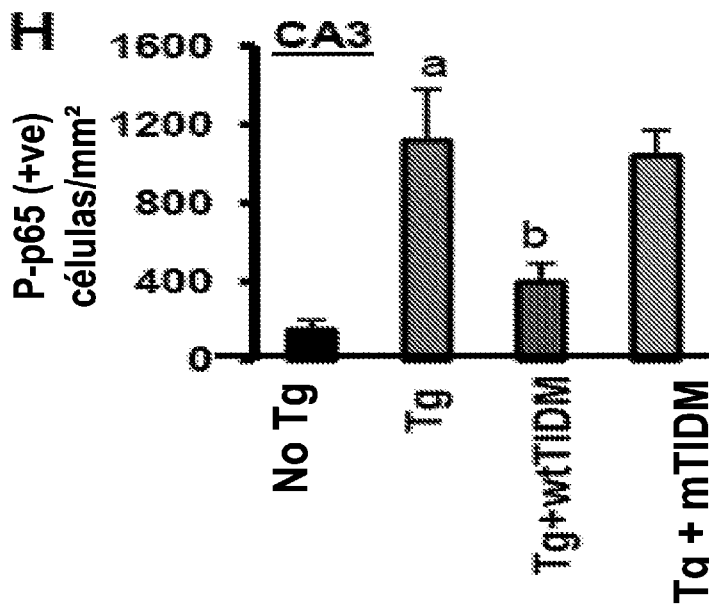
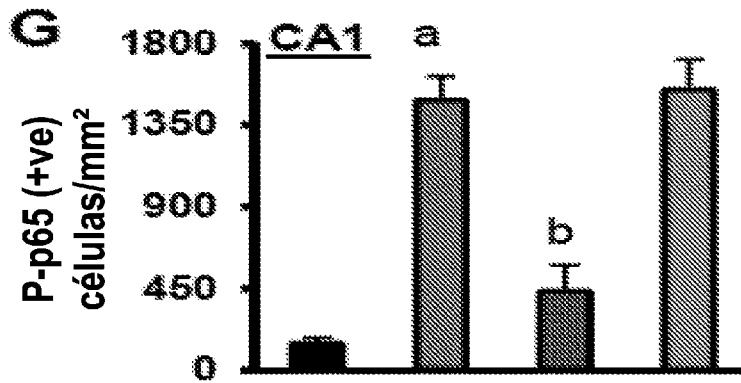
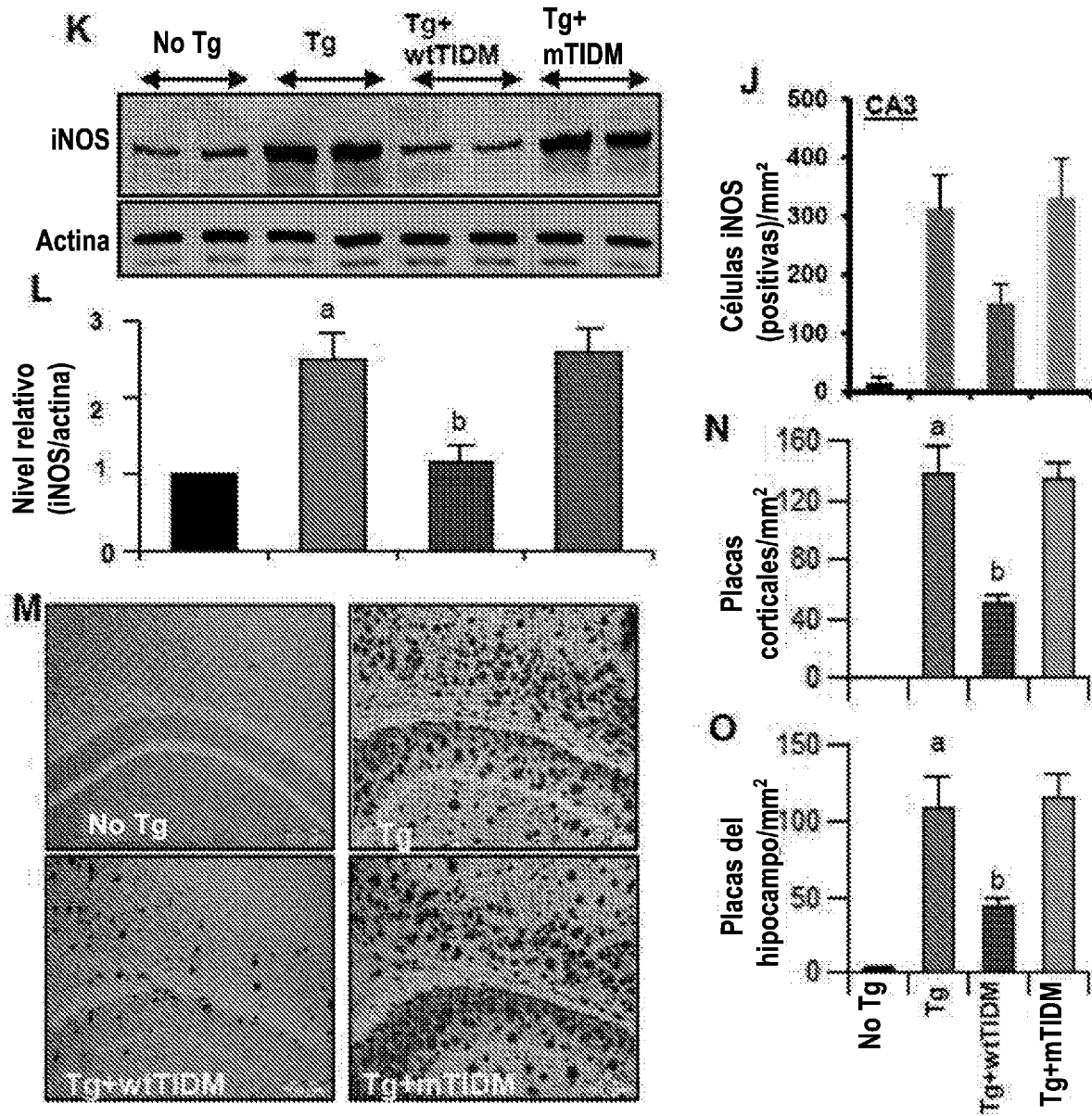


Figura 5 (G-I)



**Figura 5 (J-O)**

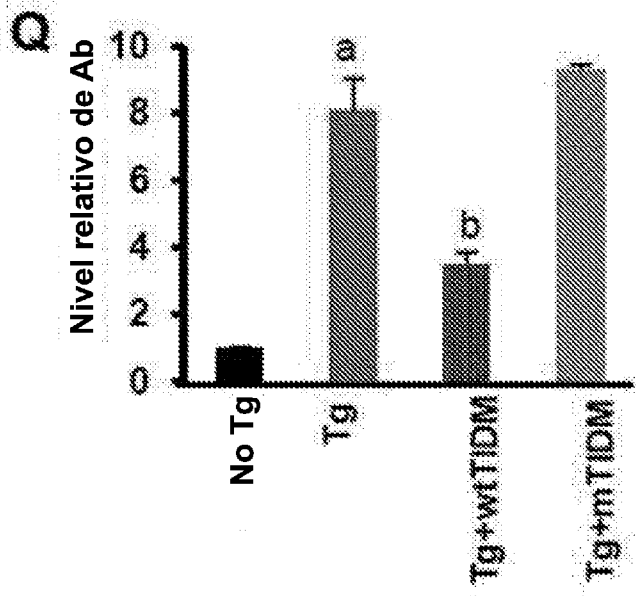
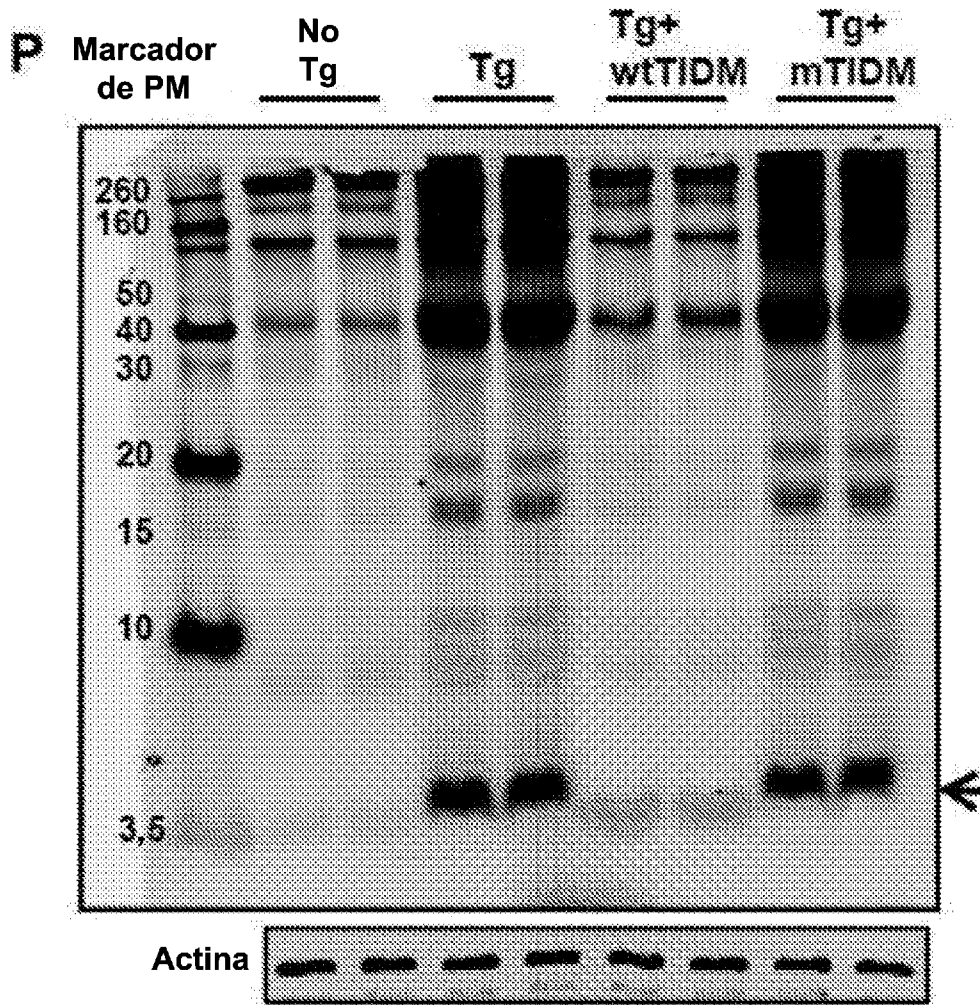


Figura 5 (P-Q)

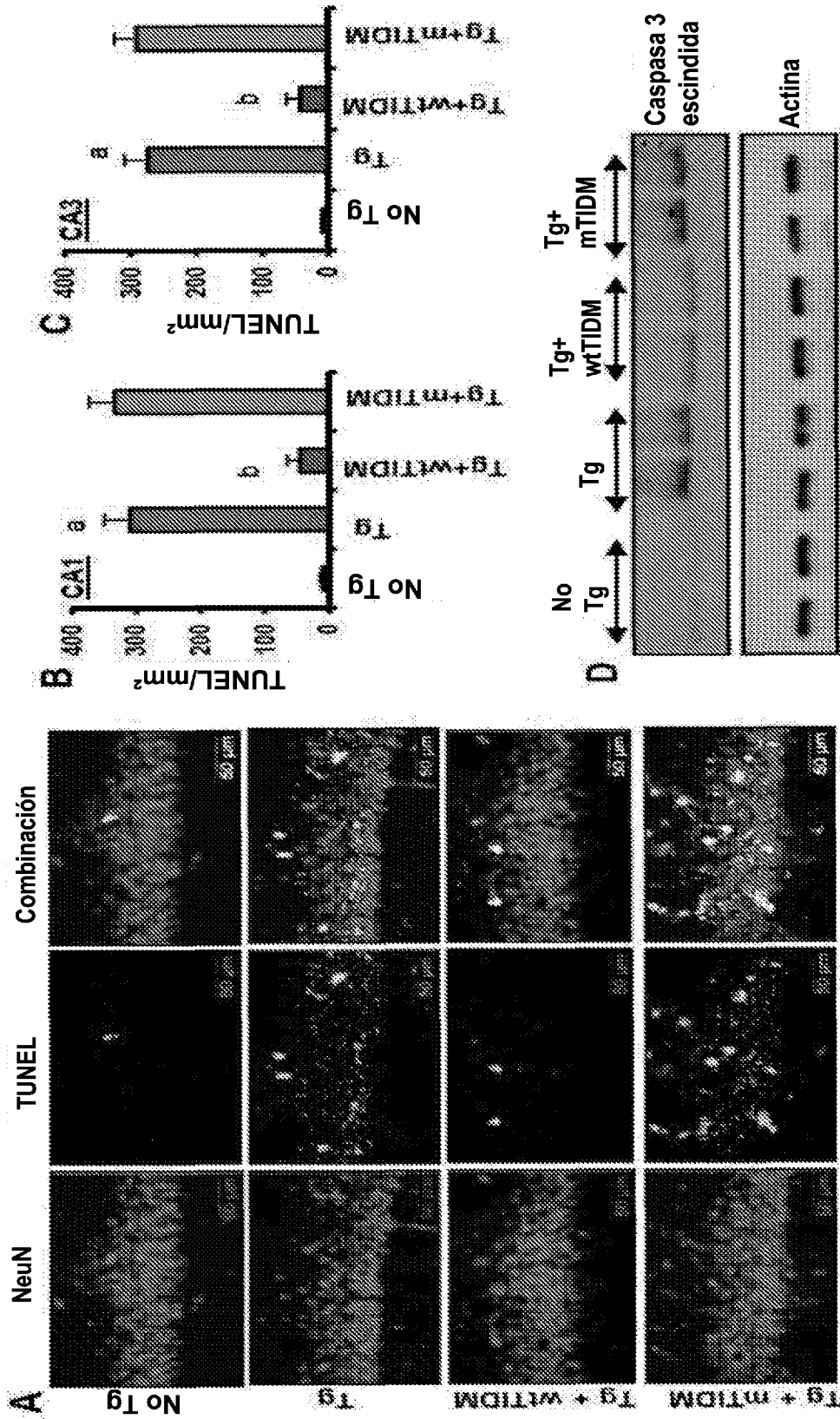


Figura 6 (A-D)

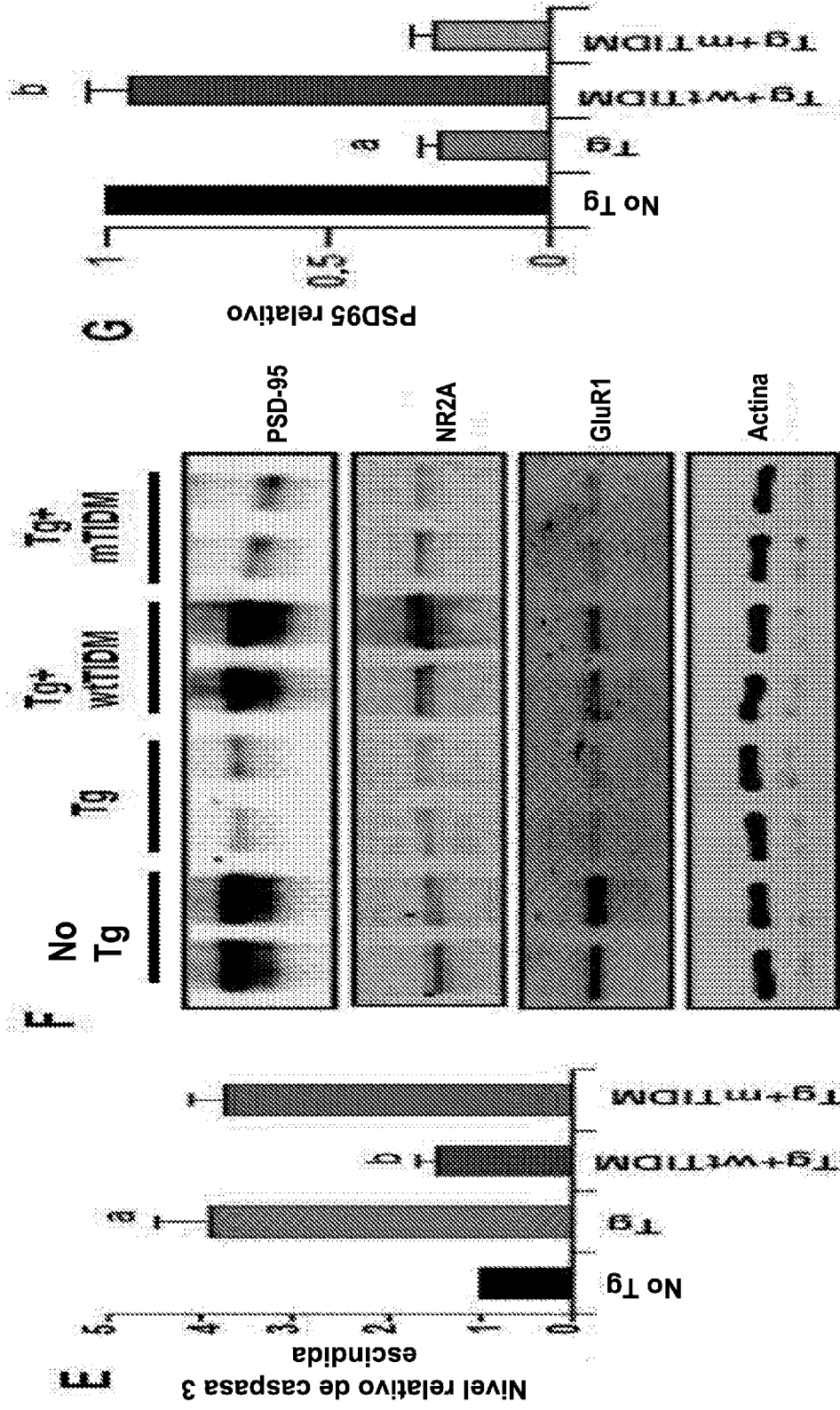


Figura 6 (E-G)

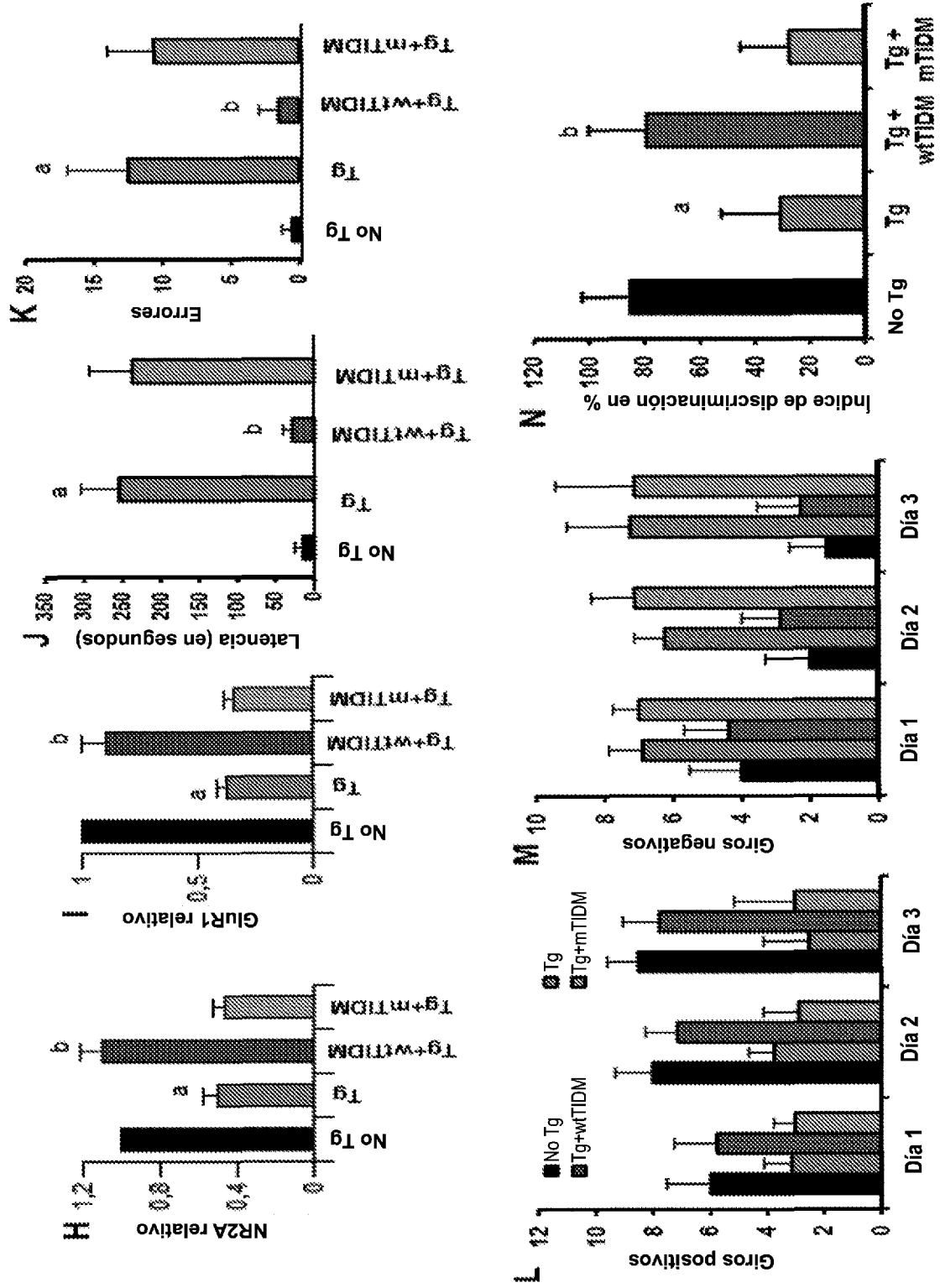


Figura 6 (H-N)

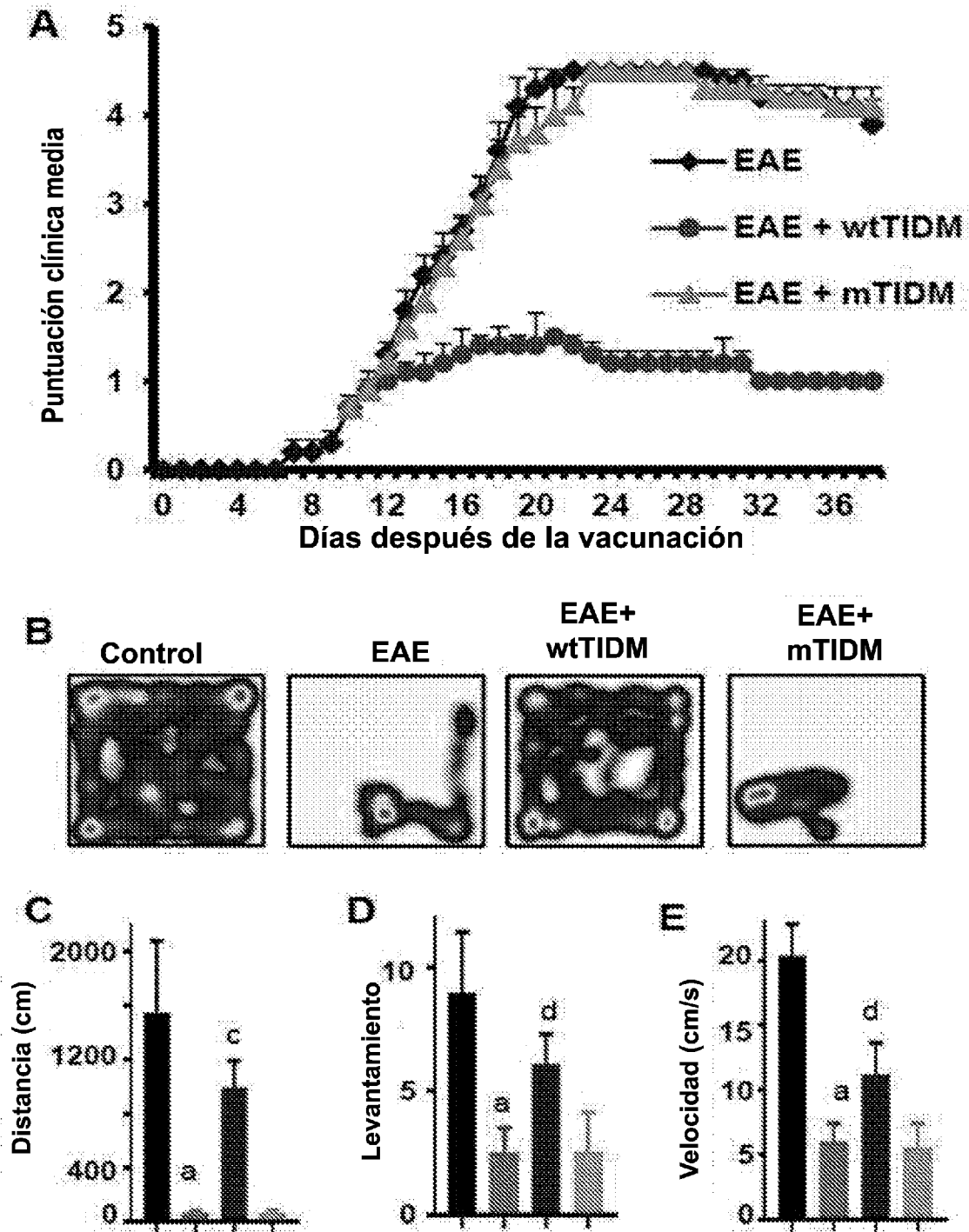


Figura 7 (A-E)

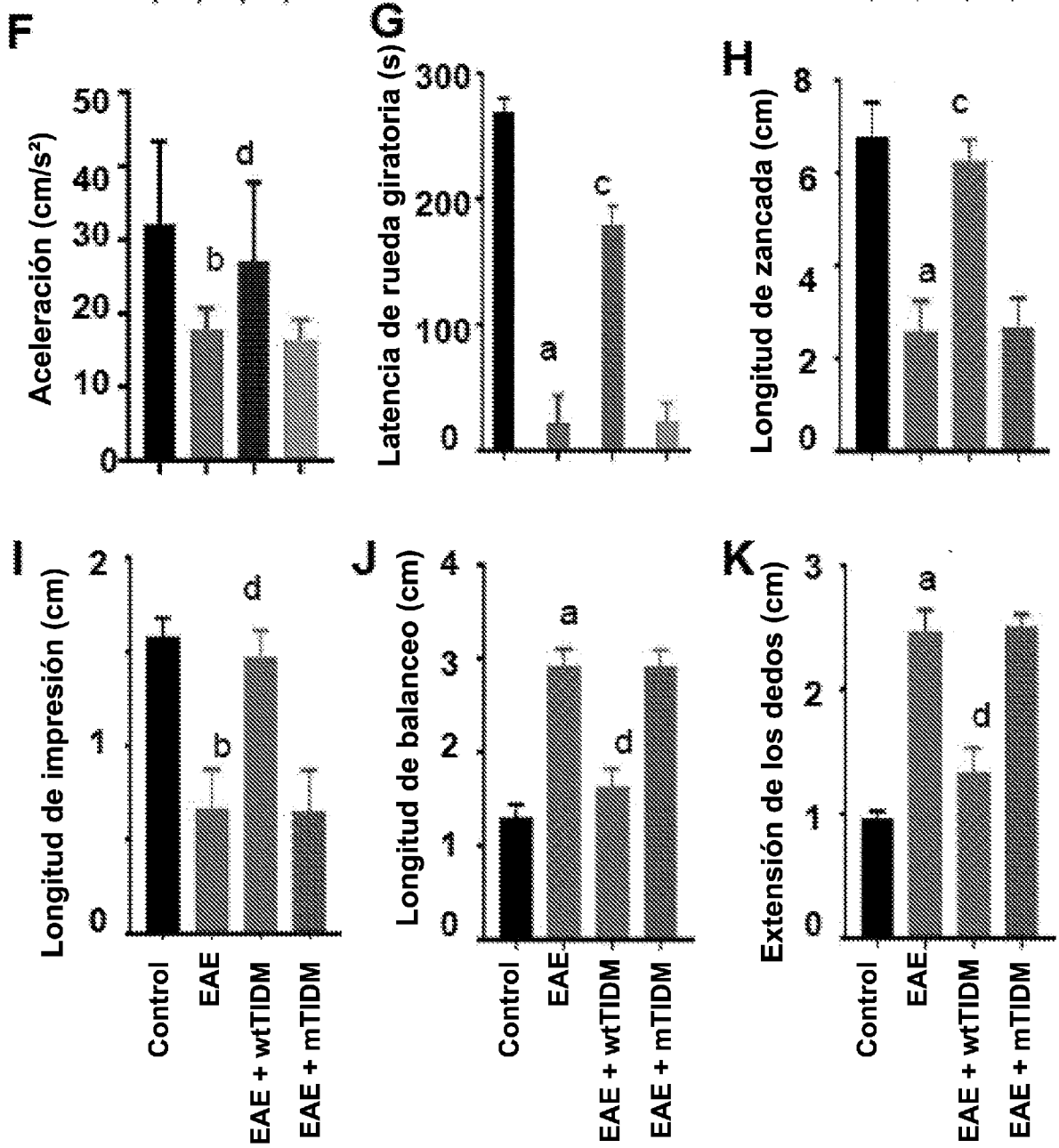
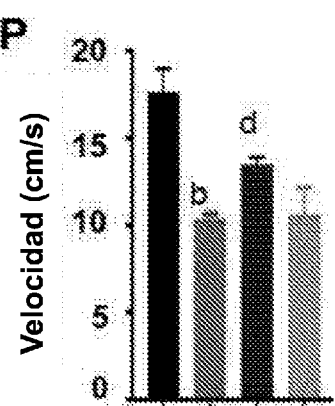
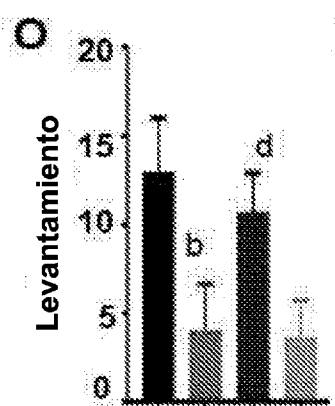
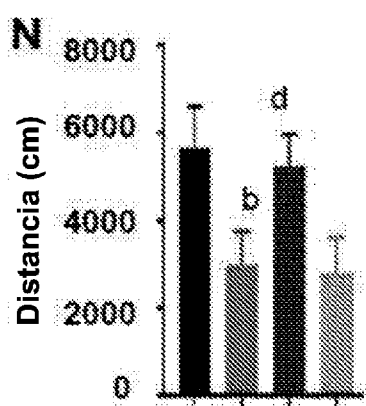
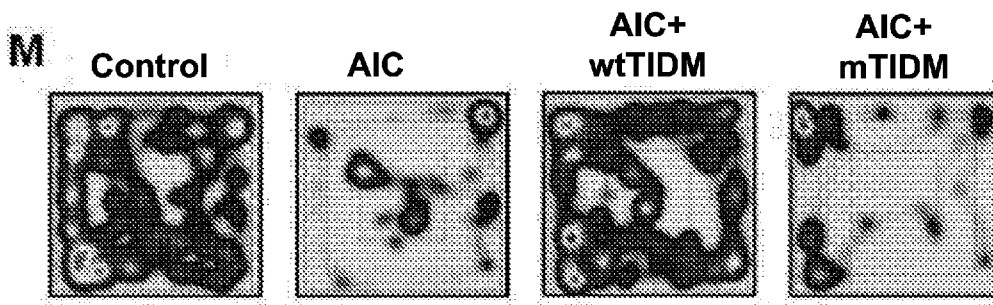
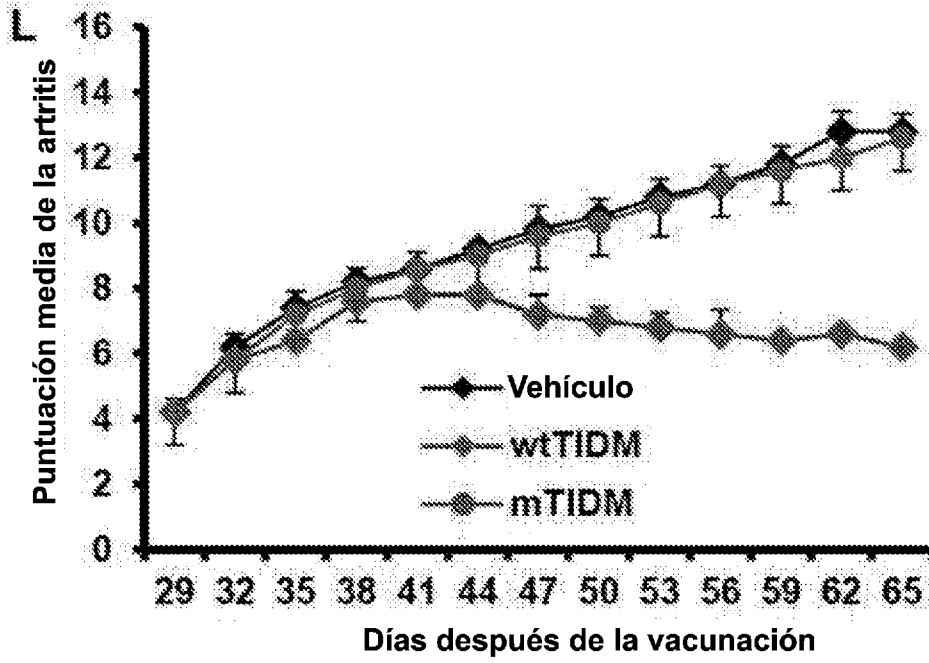


Figura 7 (F-K)



**Figura 7 (L-P)**

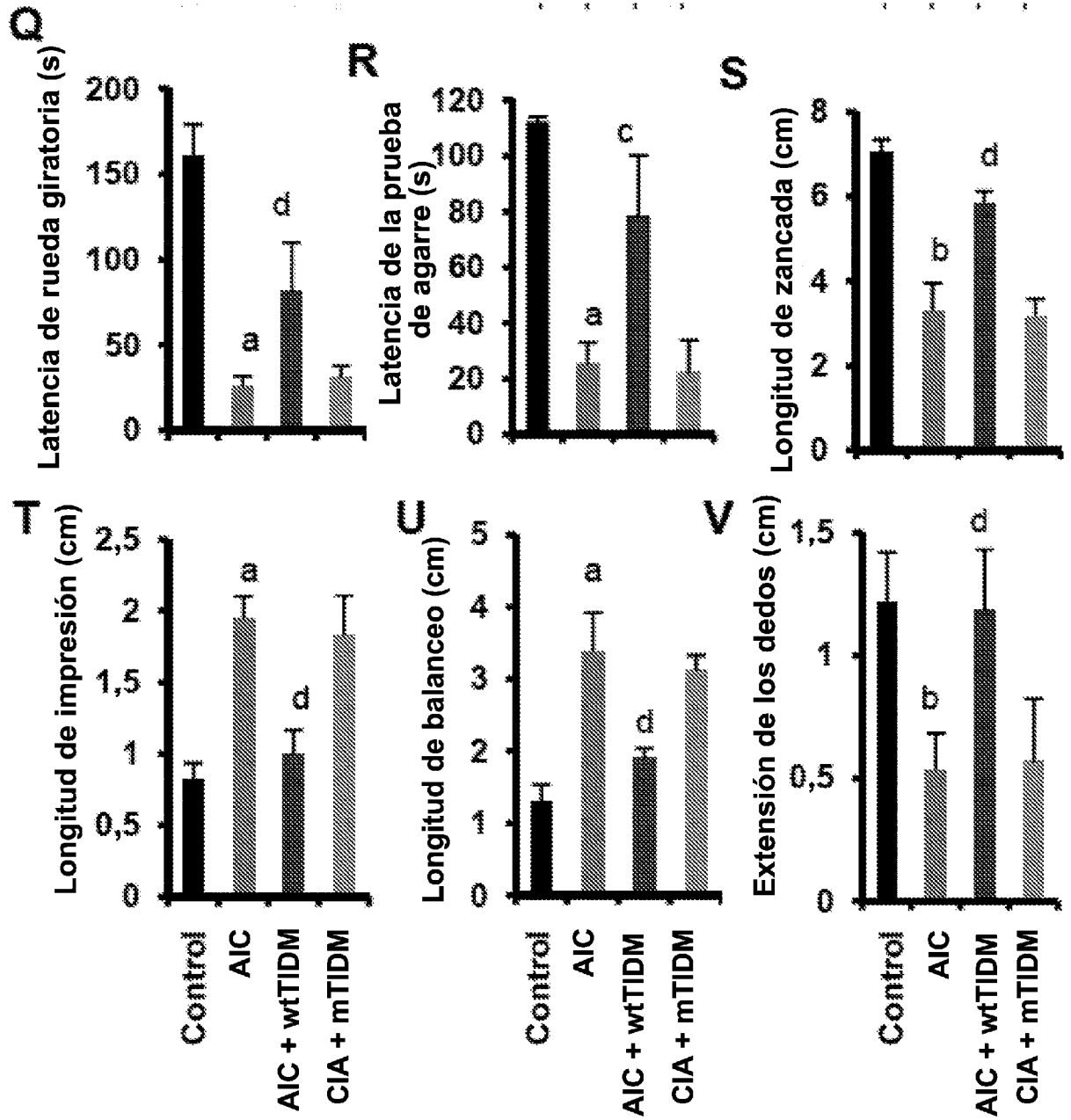
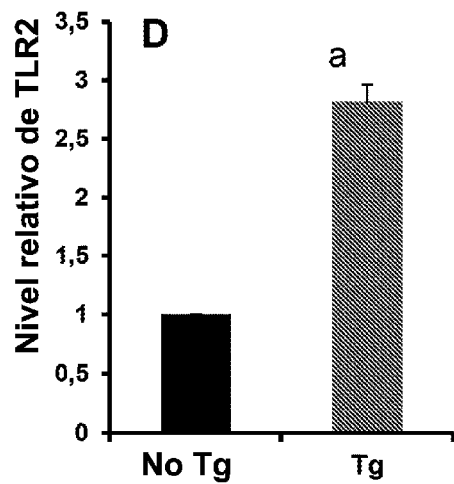
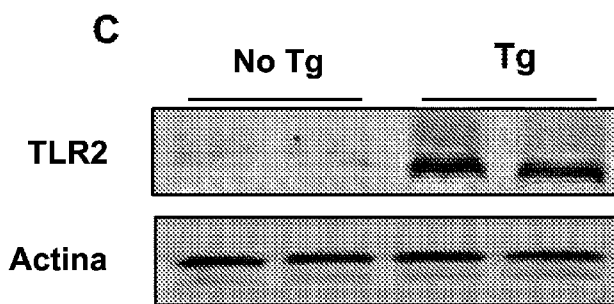
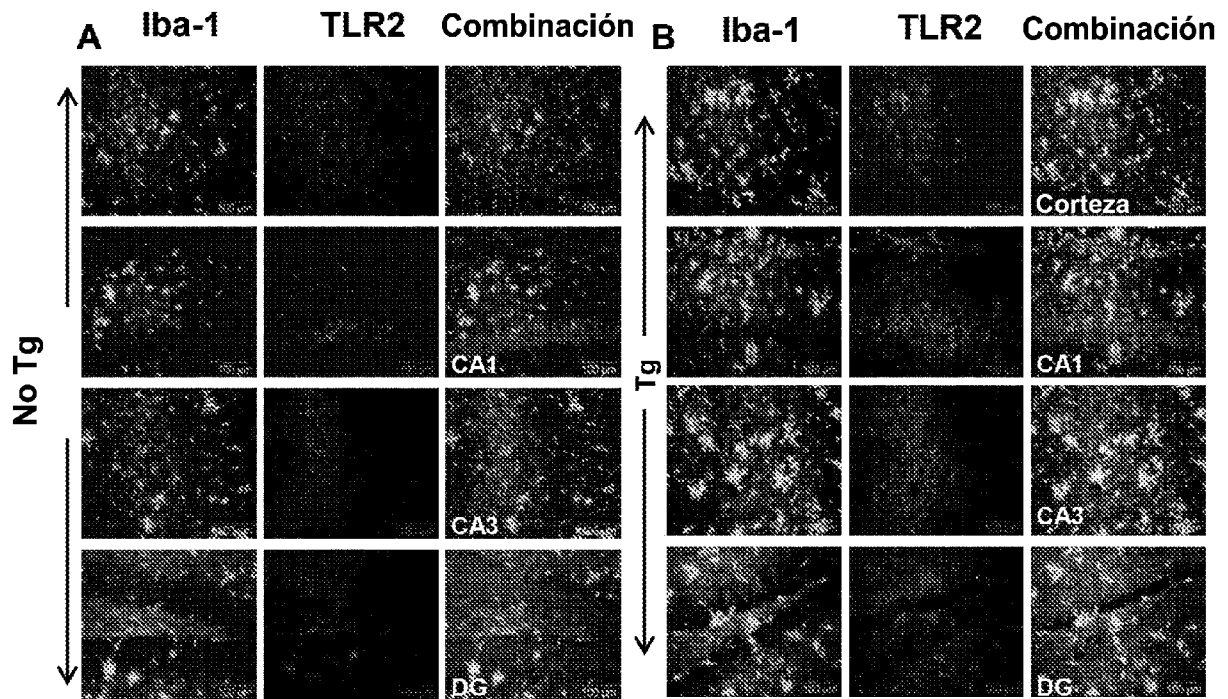


Figura 7 (Q-V)





**Figura 9 (A-D)**

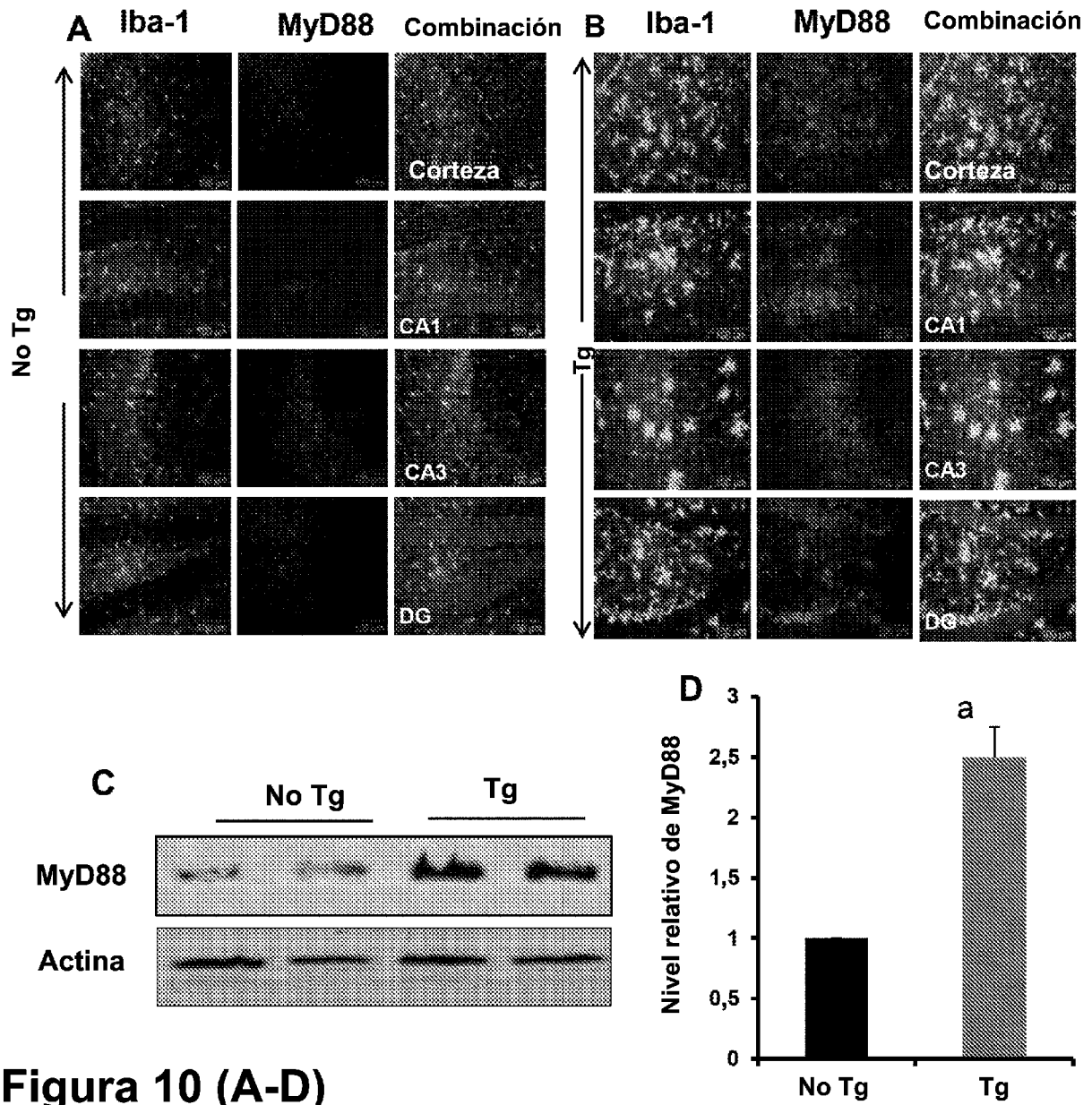
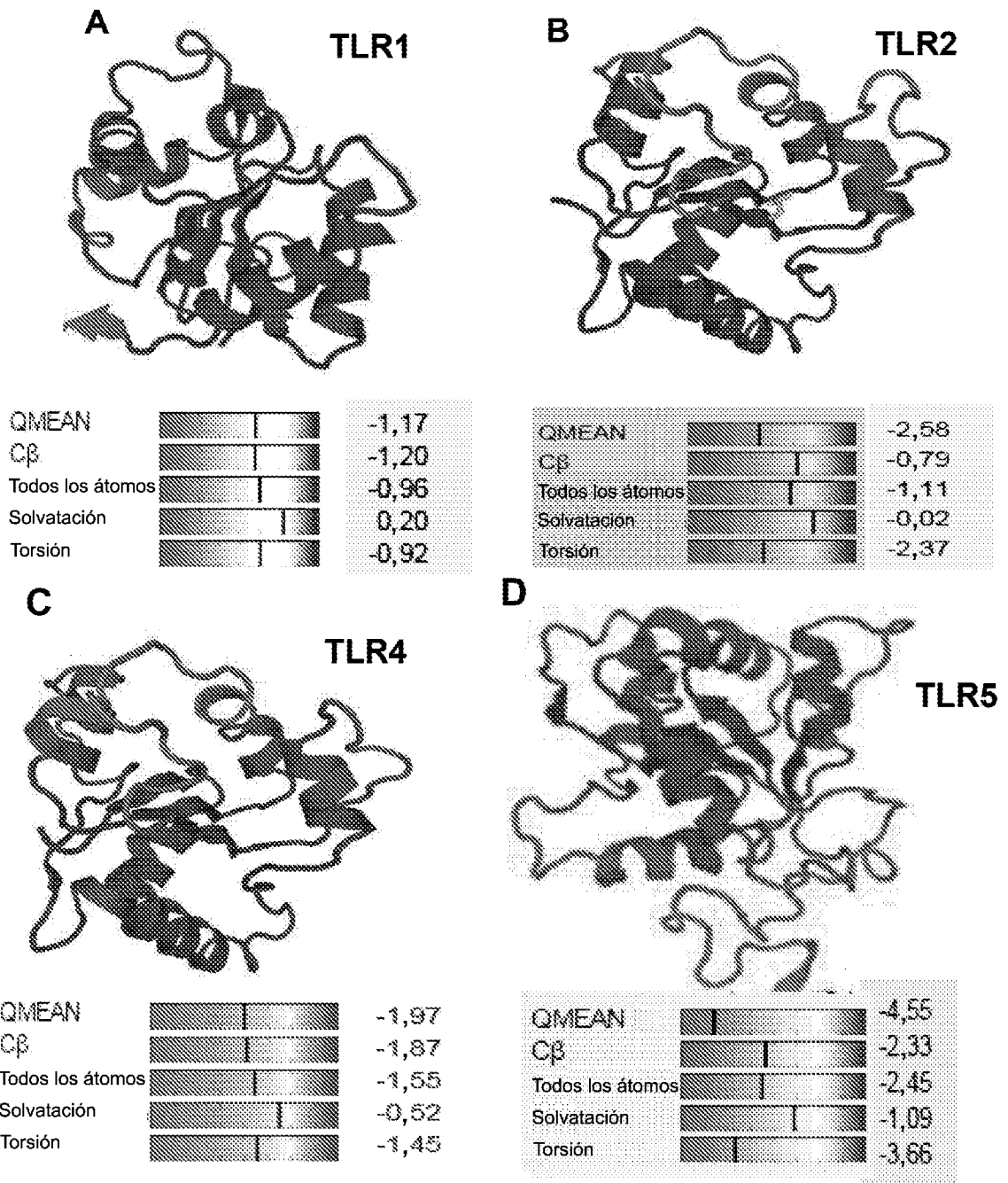
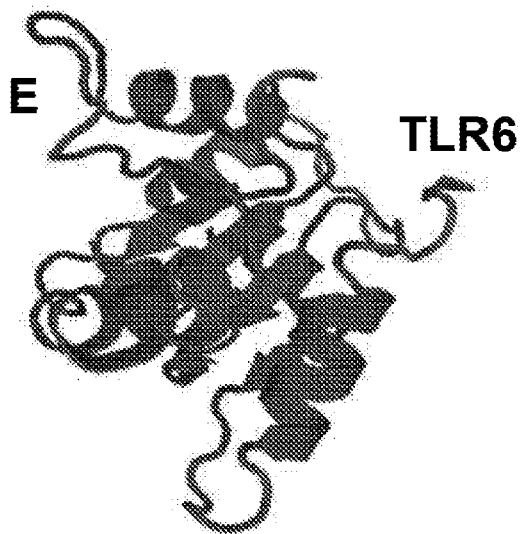


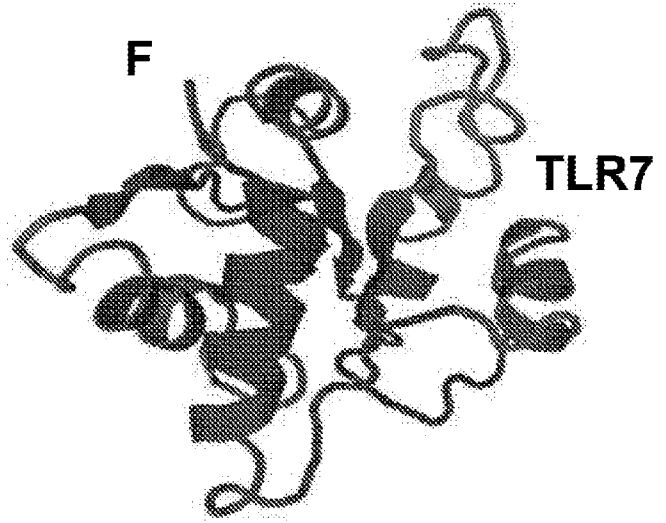
Figura 10 (A-D)



**Figura 11 (A-D)**



QMEAN		-0,79
Cβ		-0,94
Todos los átomos		-0,83
Solvatación		0,11
Torsión		-0,58



QMEAN		-3,83
Cβ		-2,56
Todos los átomos		-1,68
Solvatación		-0,55
Torsión		-3,15



QMEAN		-3,71
Cβ		-3,82
Todos los átomos		-1,90
Solvatación		-0,29
Torsión		-2,81

**Figura 11 (E-G)**

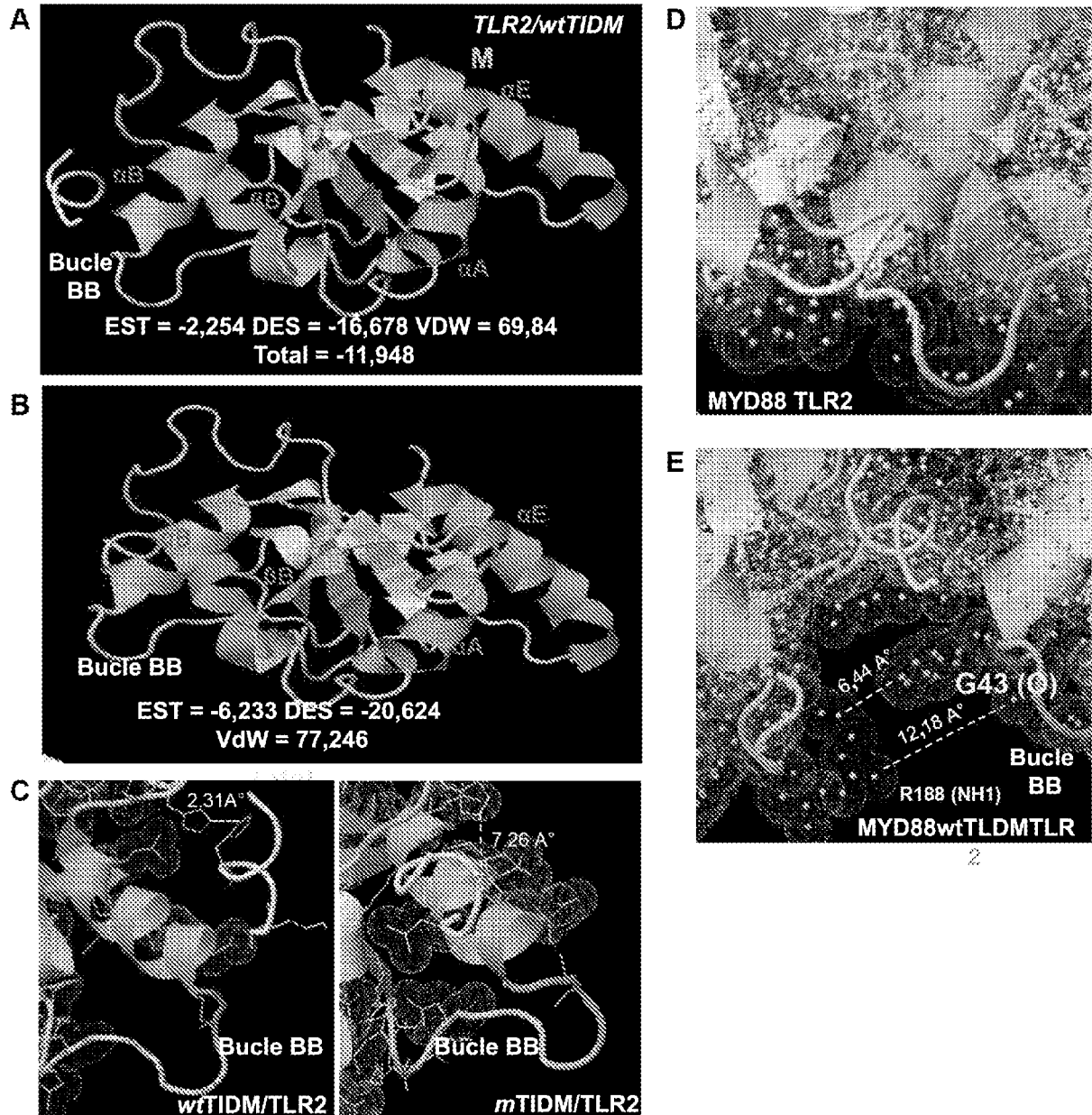


Figura 12 (A-E)

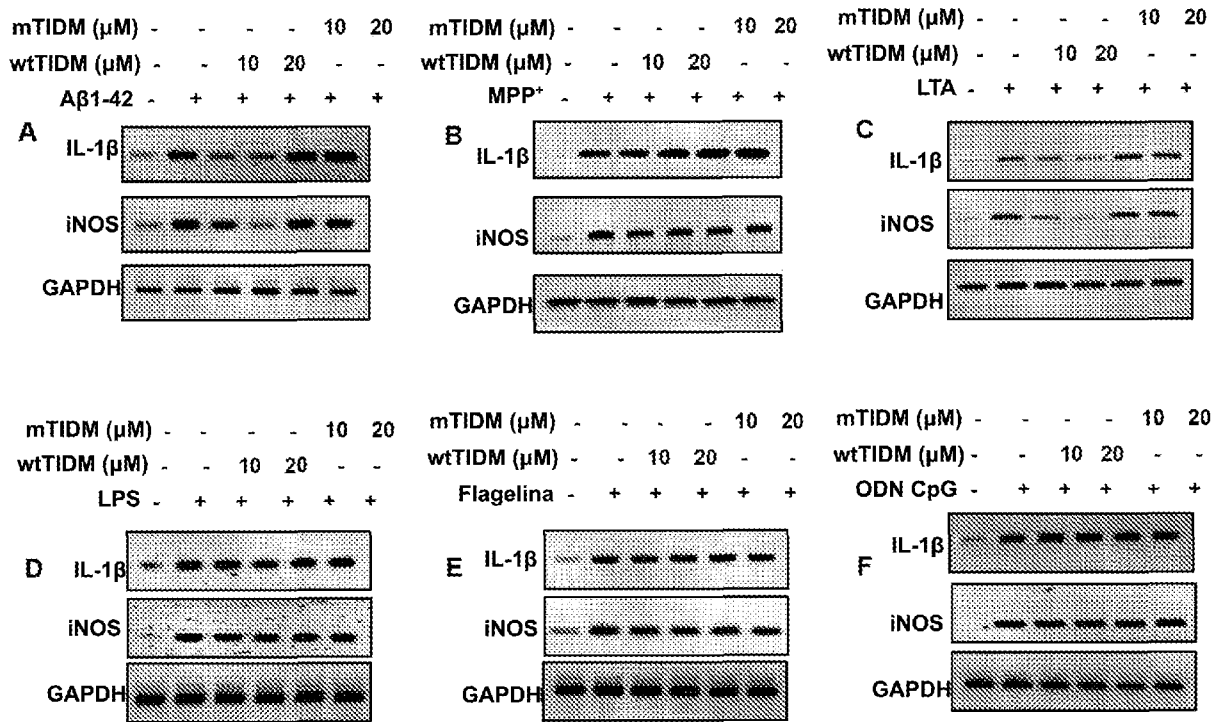


Figura 13 (A-F)

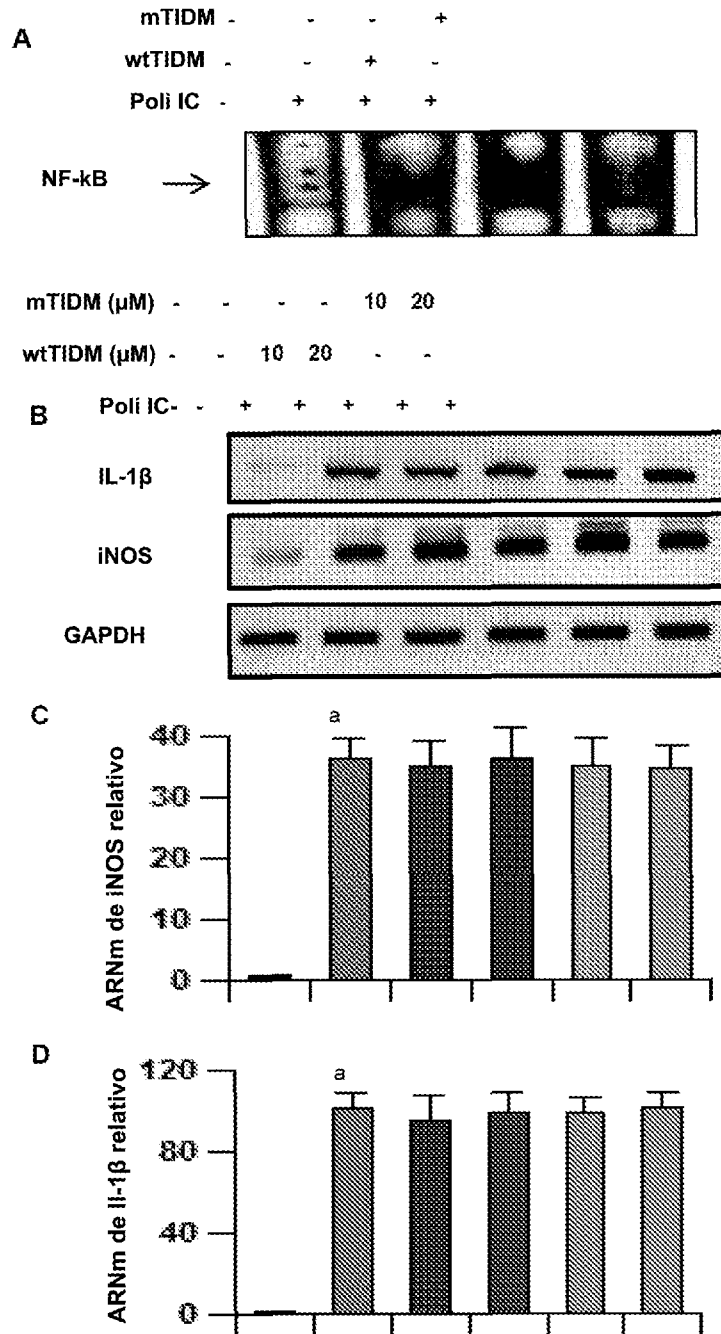
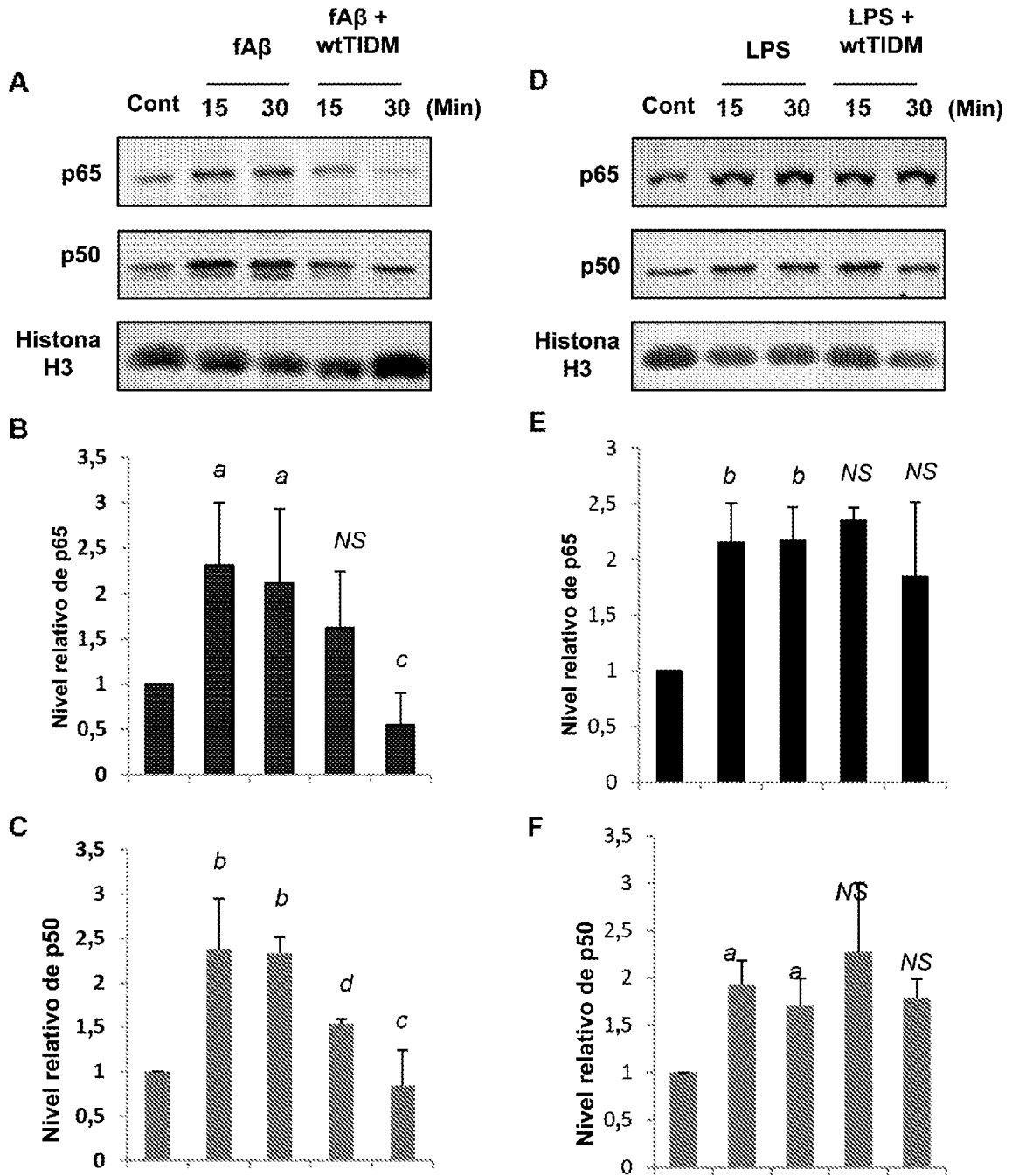


Figura 14 (A-D)



**Figura 15 (A-F)**

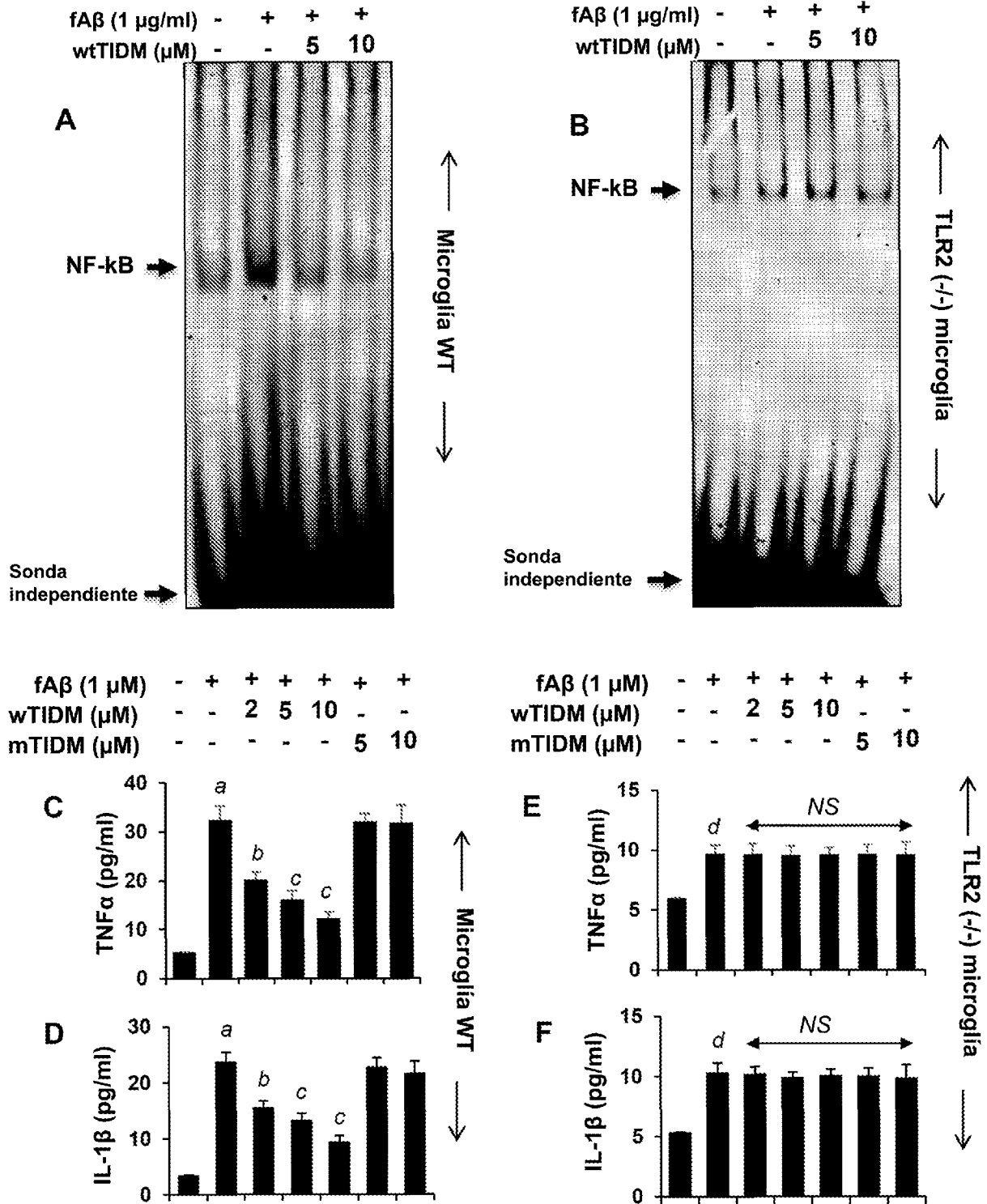
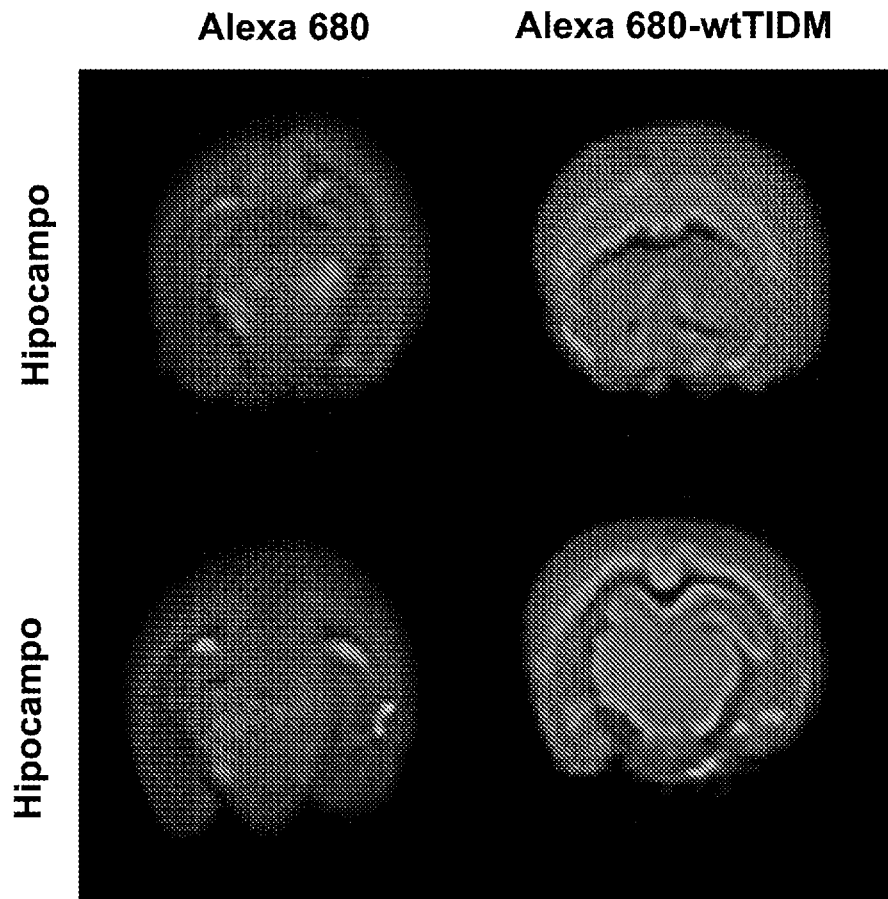
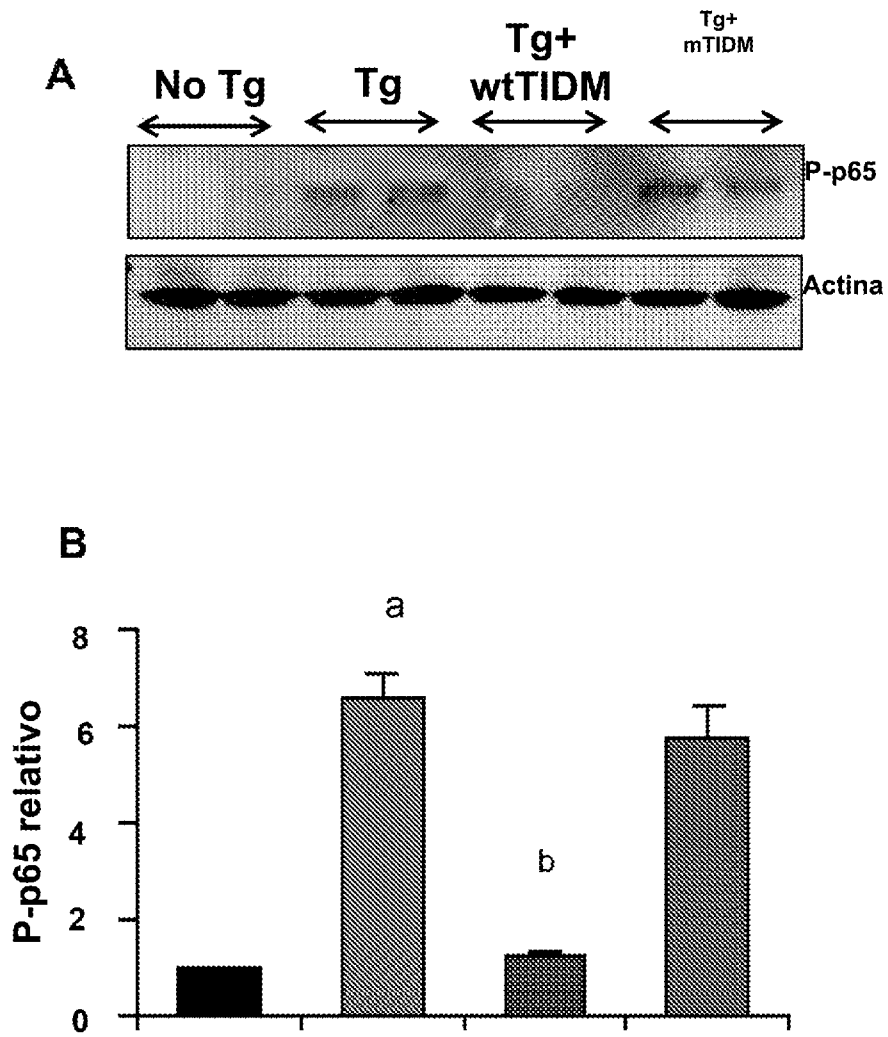


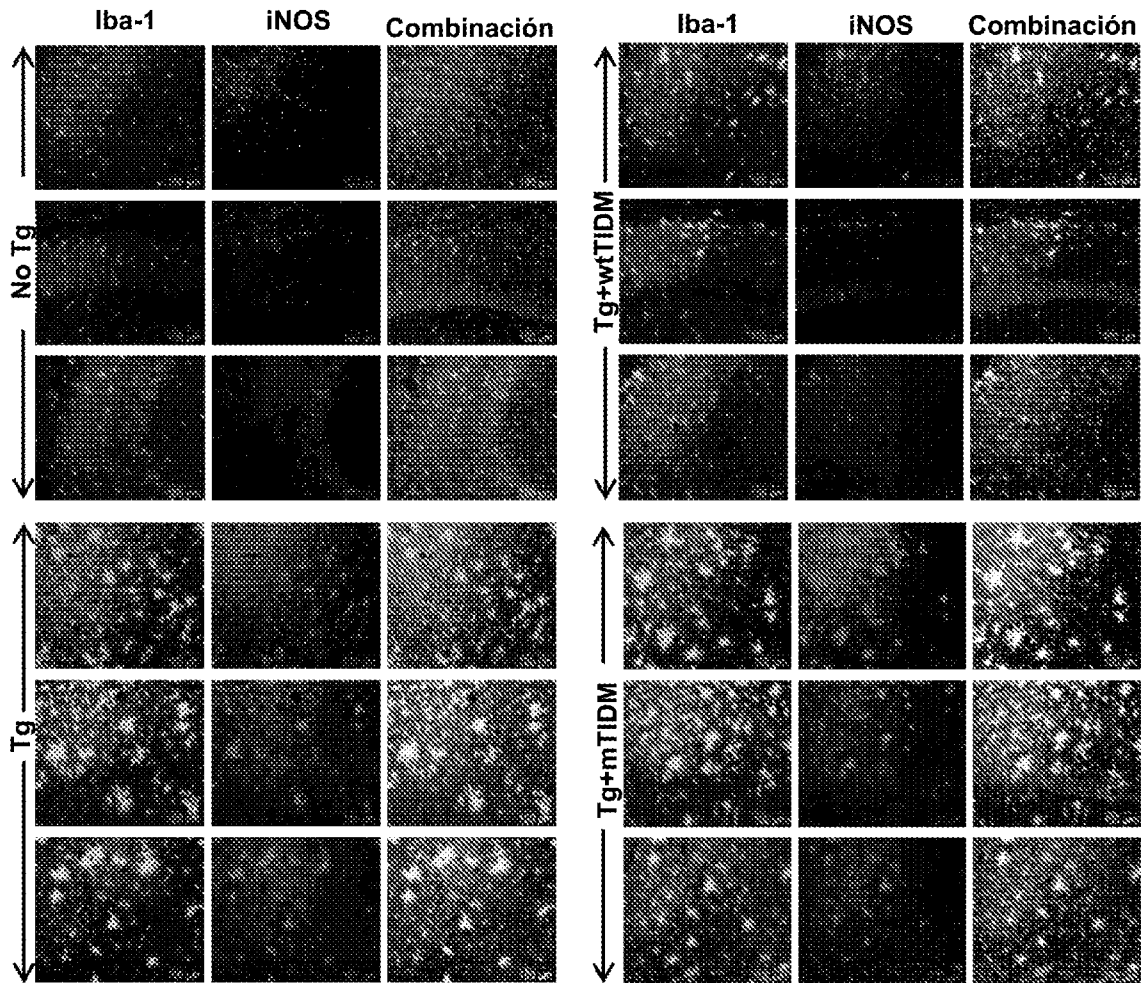
Figura 16 (A\_F)



**Figura 17**



**Figura 18 (A-B)**



**Figura 19**

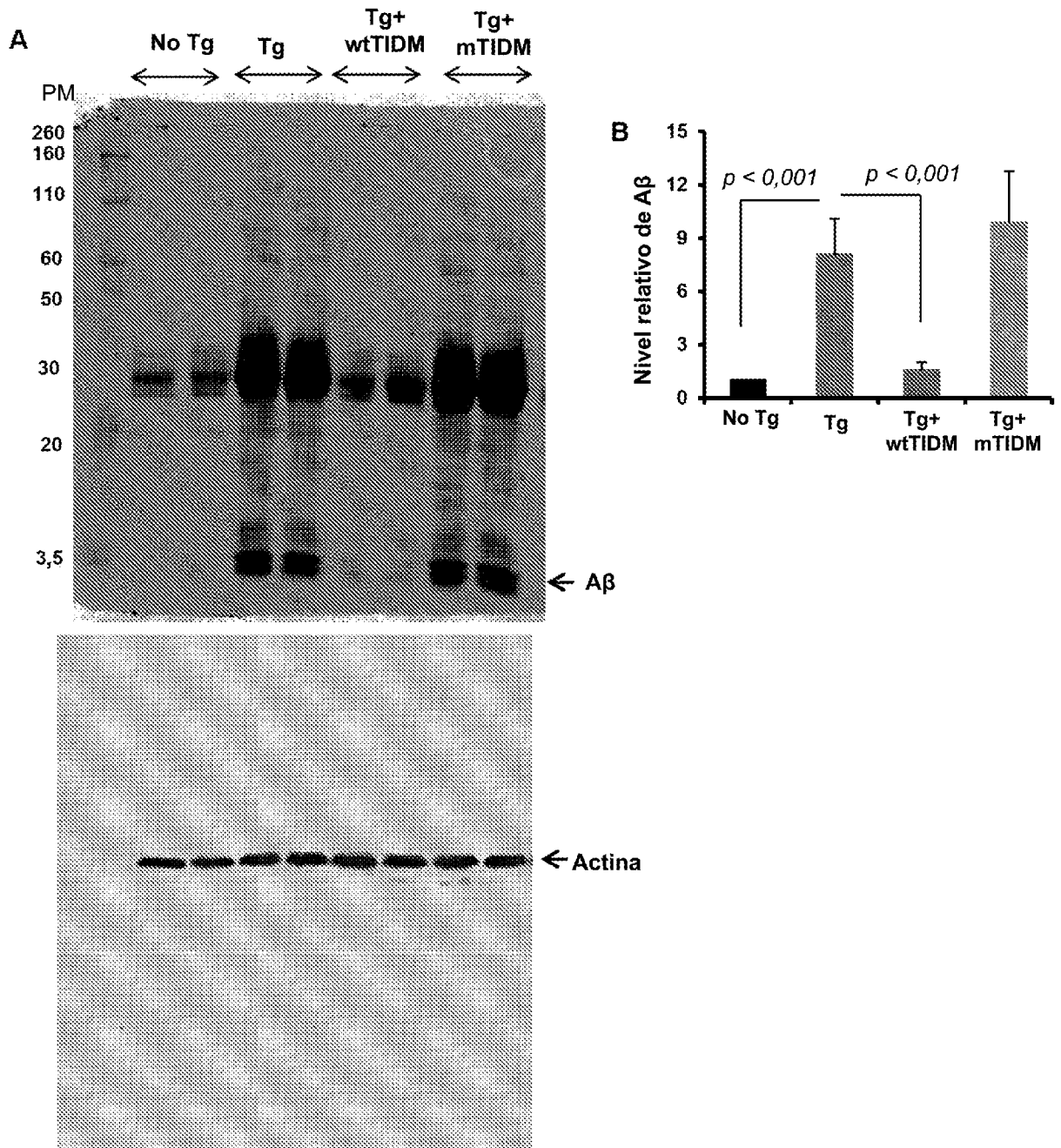


Figura 20 (A-B)

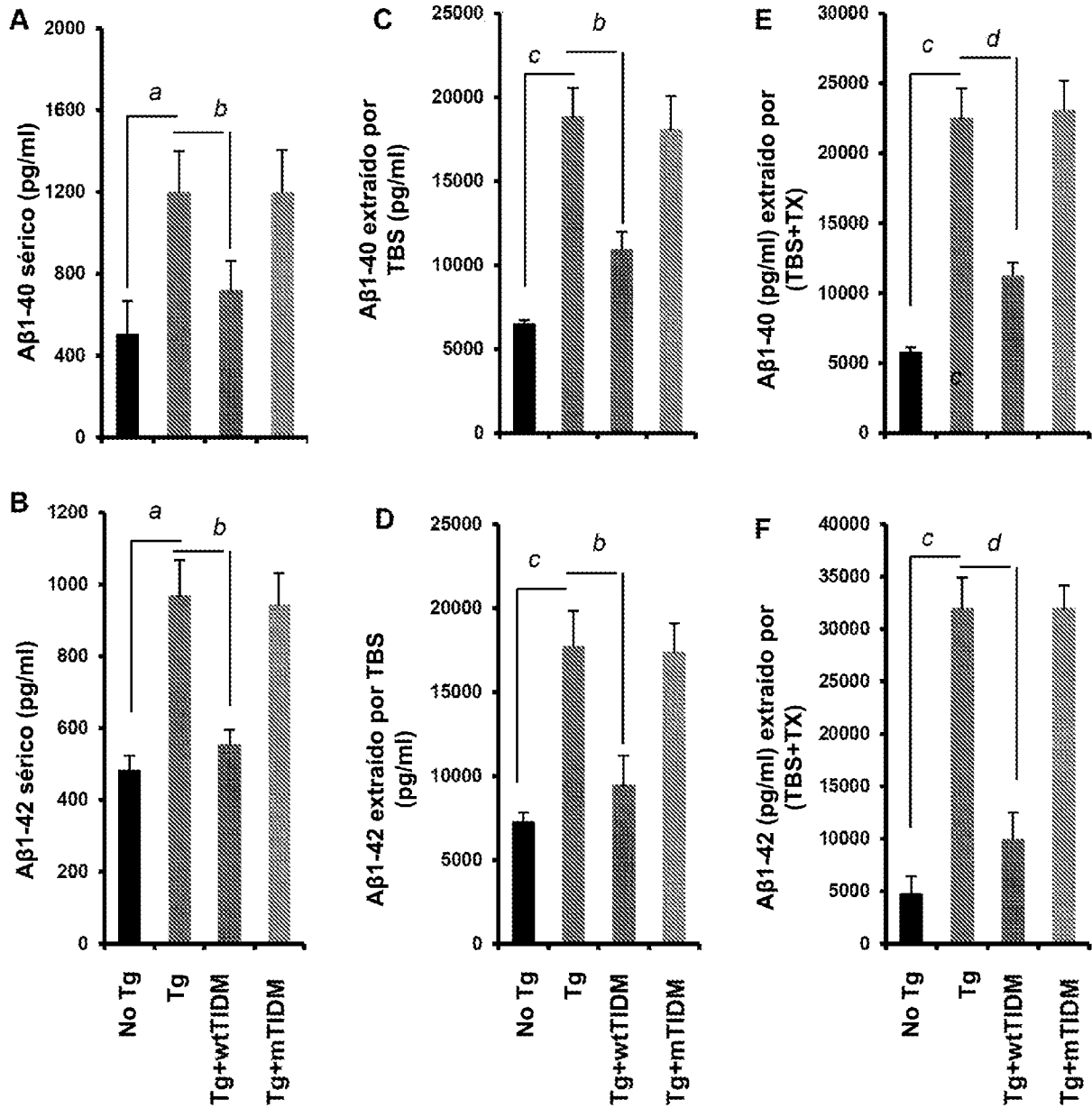
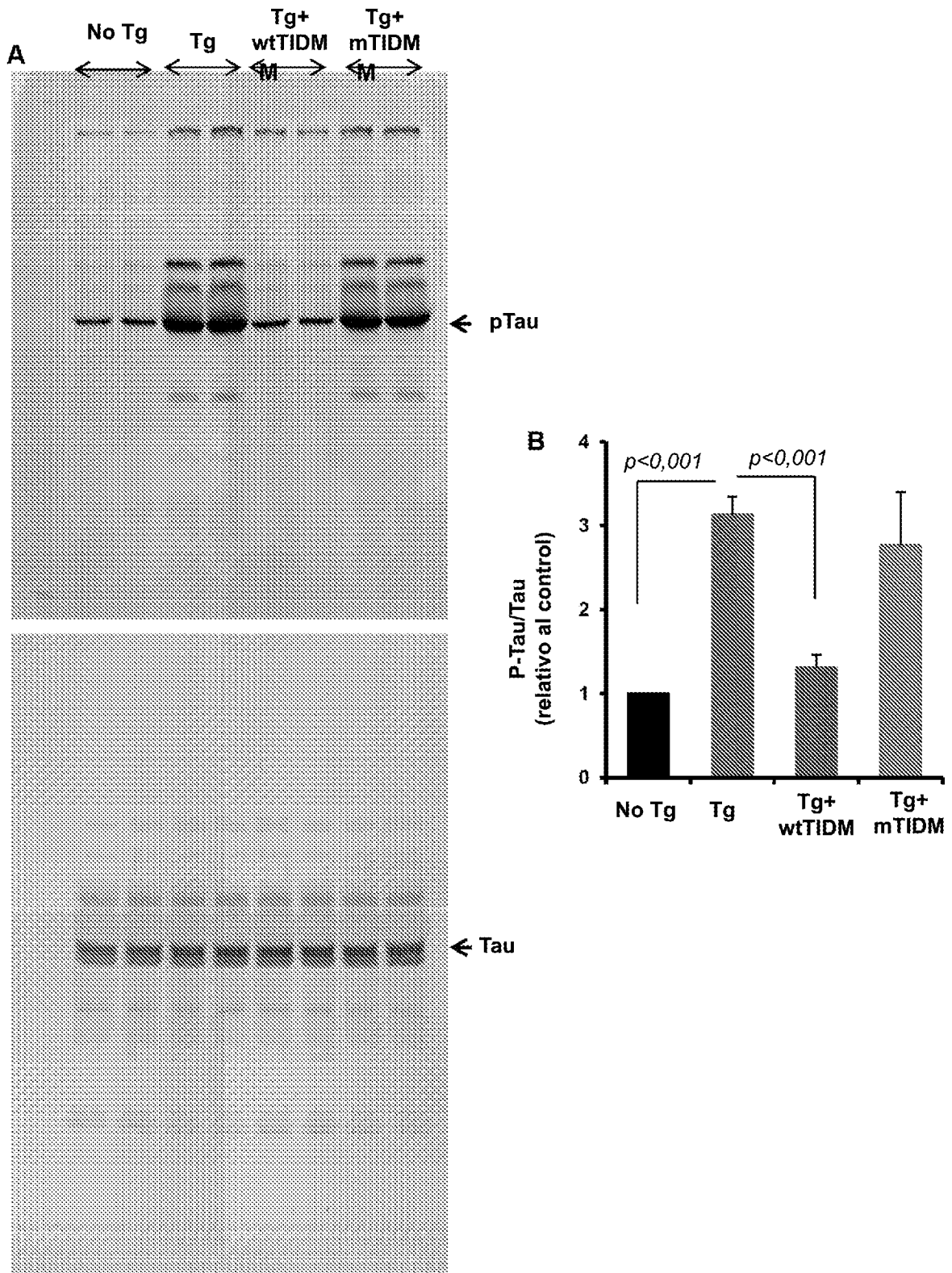
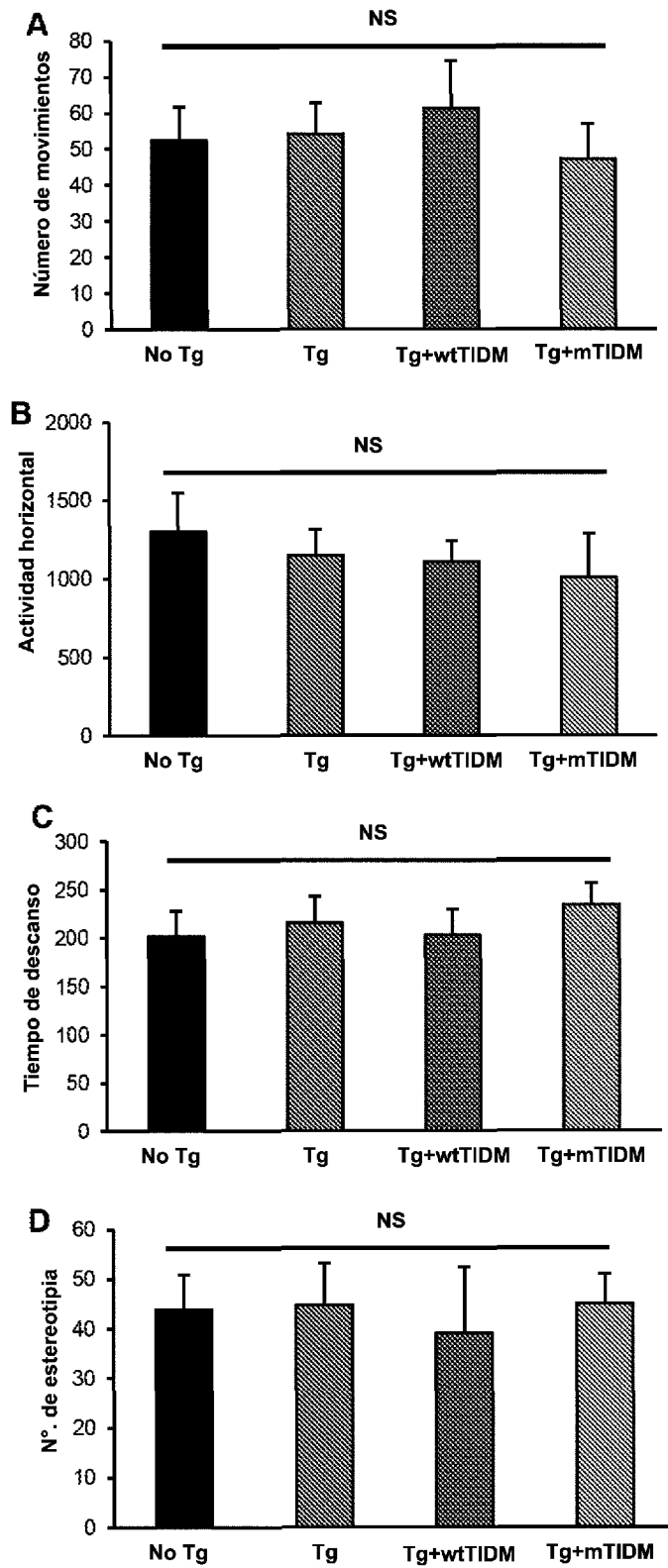


Figura 21 (A-F)



**Figura 22 (A-B)**



**Figura 23 (A-D)**

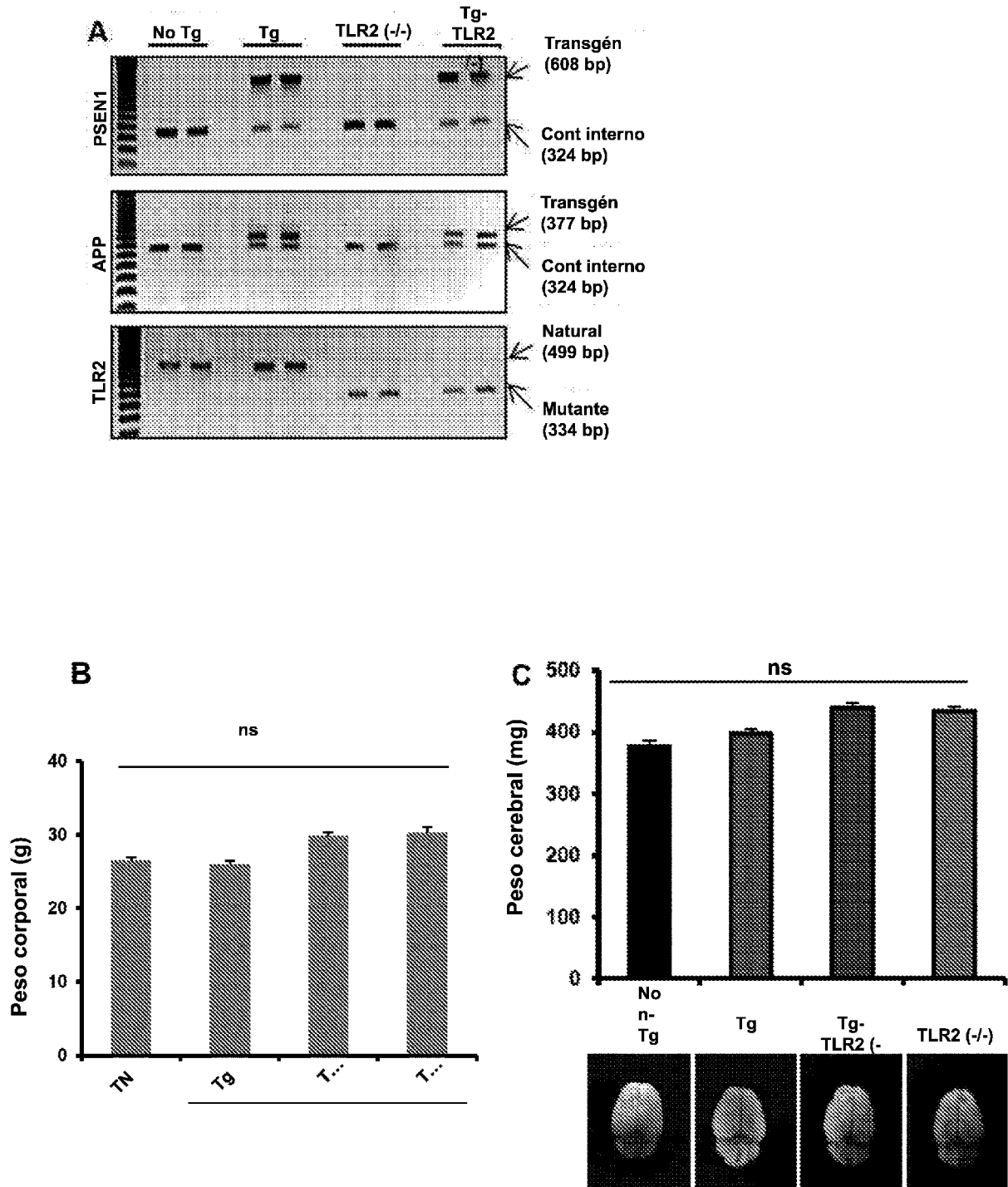
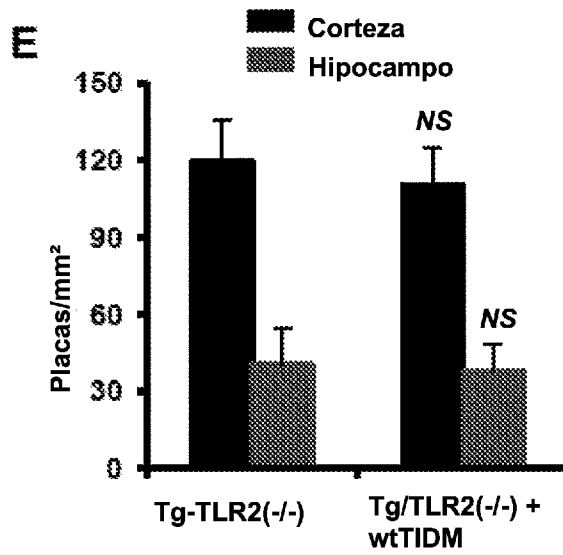
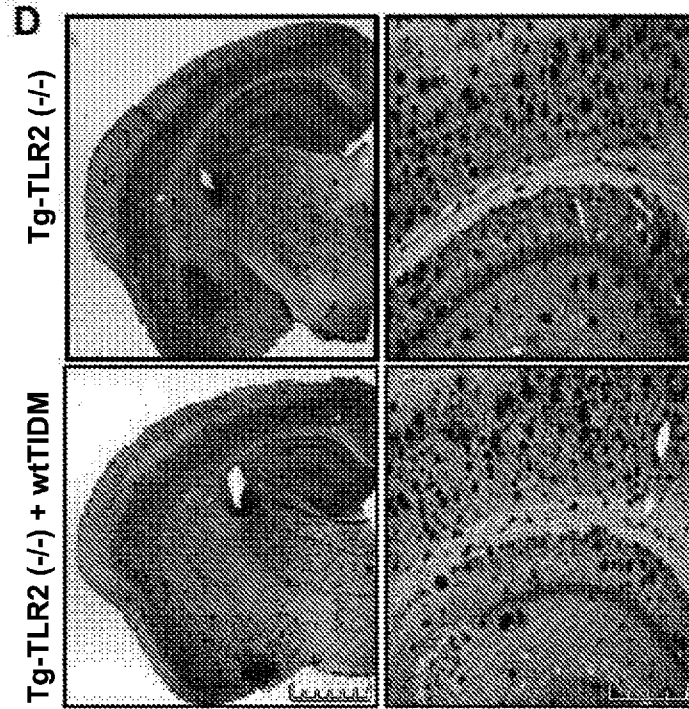
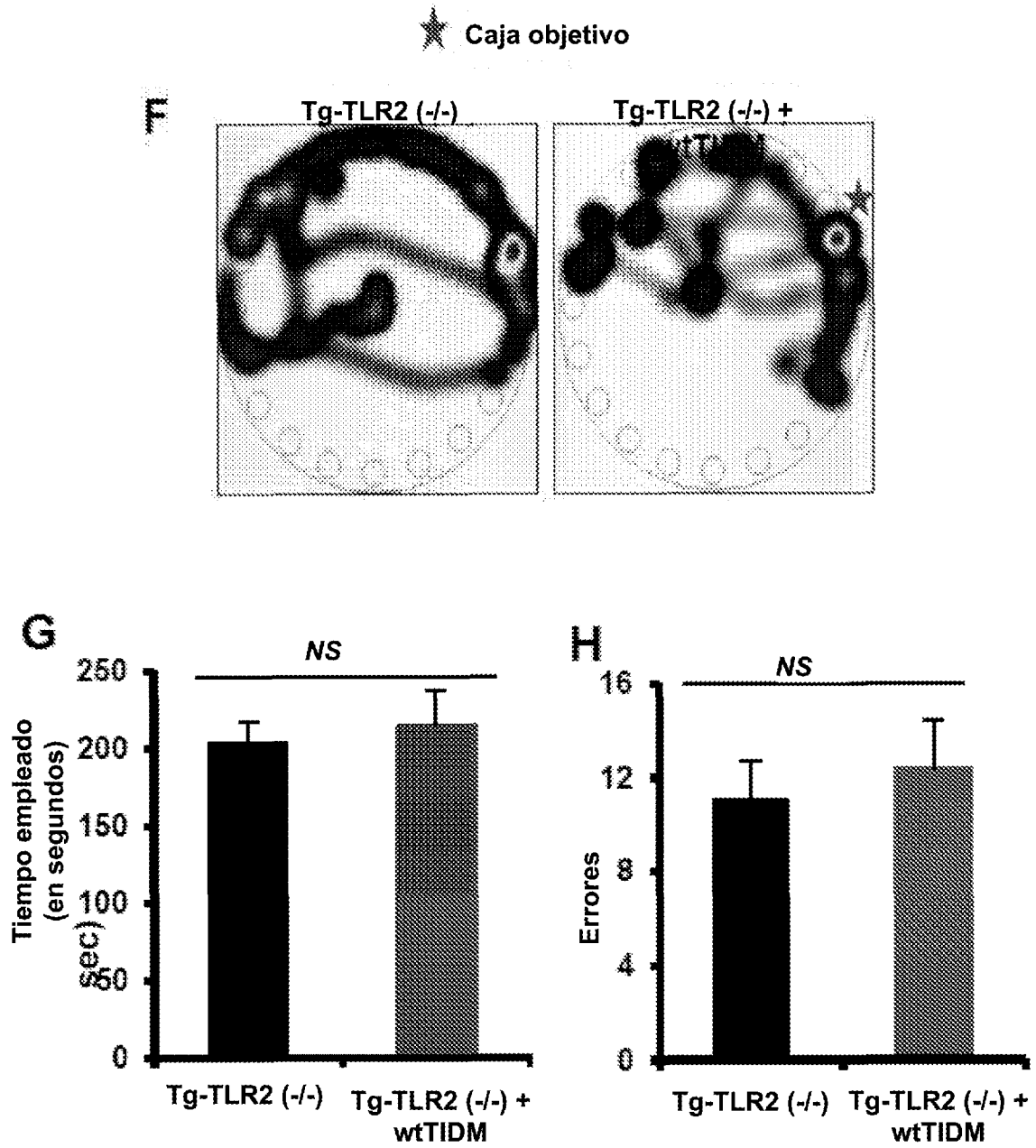


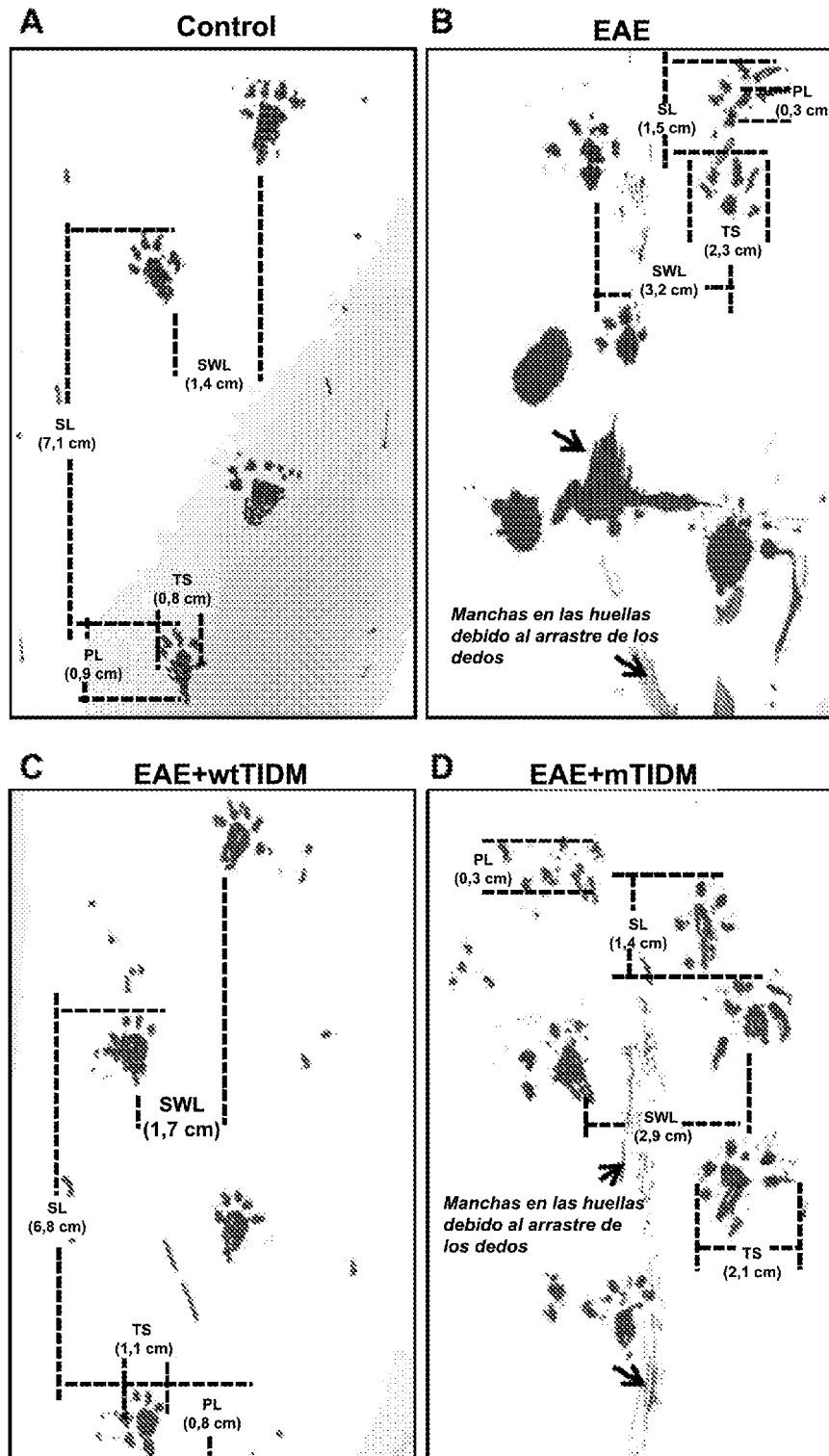
Figura 24 (A-C)



**Figura 24 (D-E)**

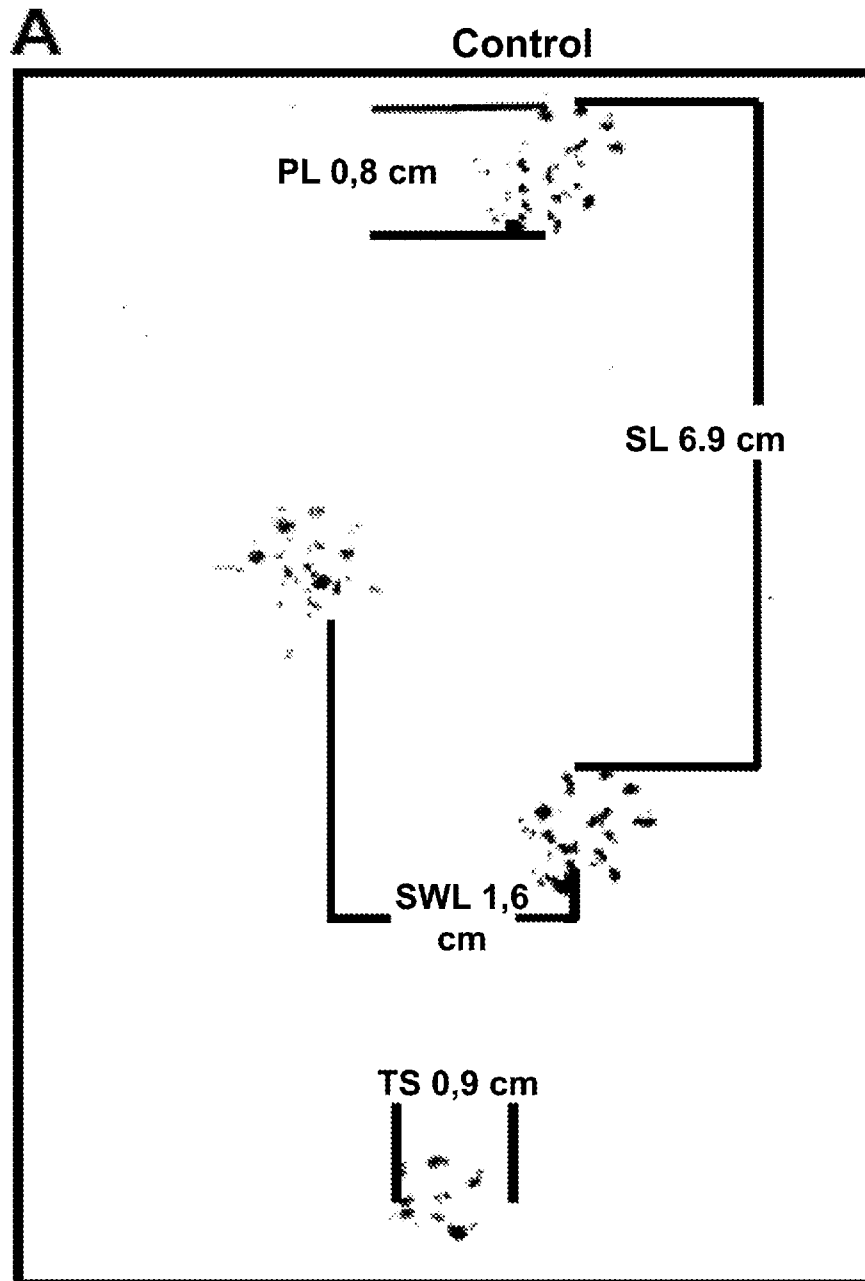


**Figura 24 (F-H)**



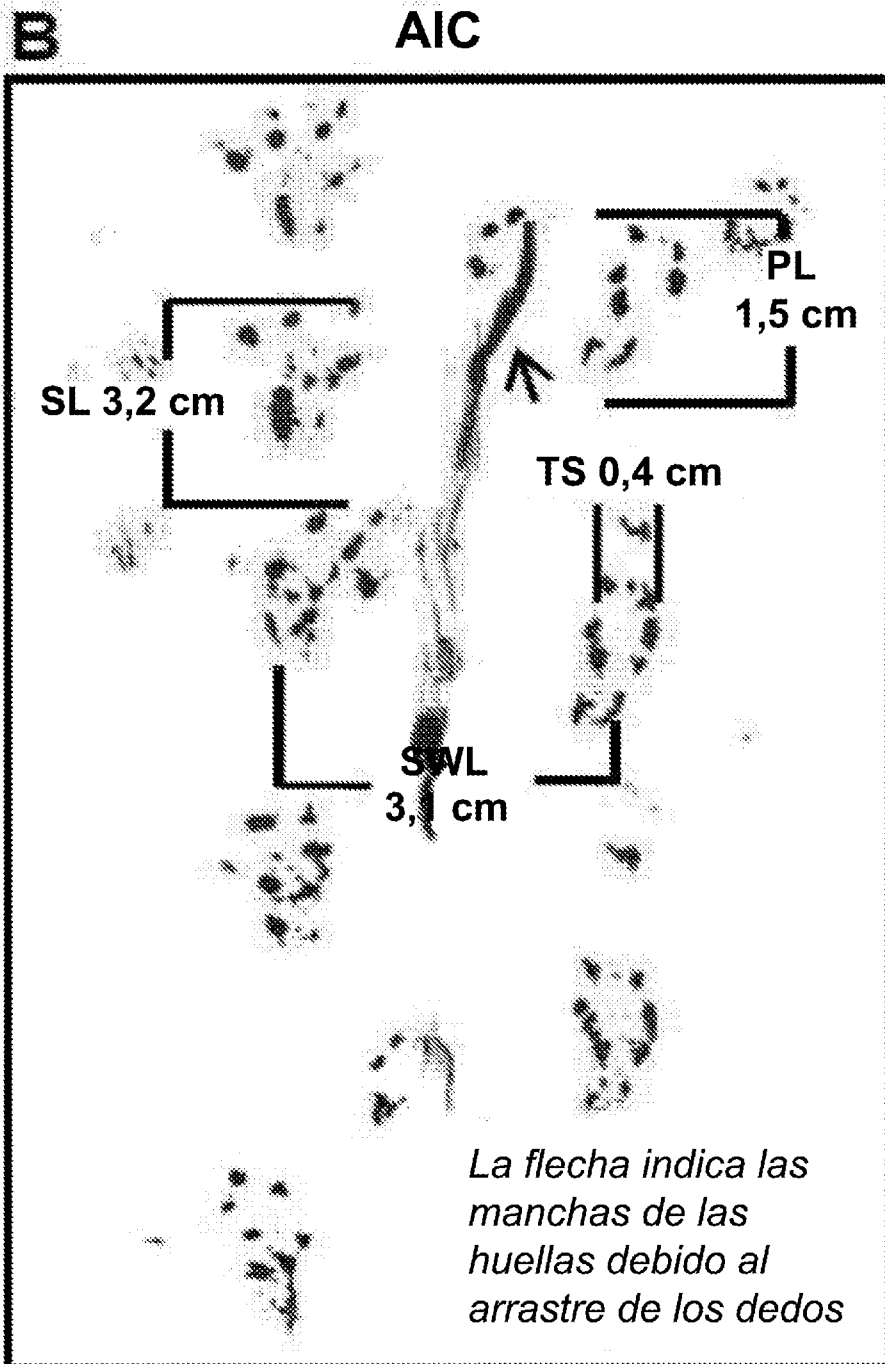
SL, longitud de zancada; SWL, longitud de balanceo; PL, longitud de impresión; TS, extensión de los dedos

**Figura 25 (A-D)**

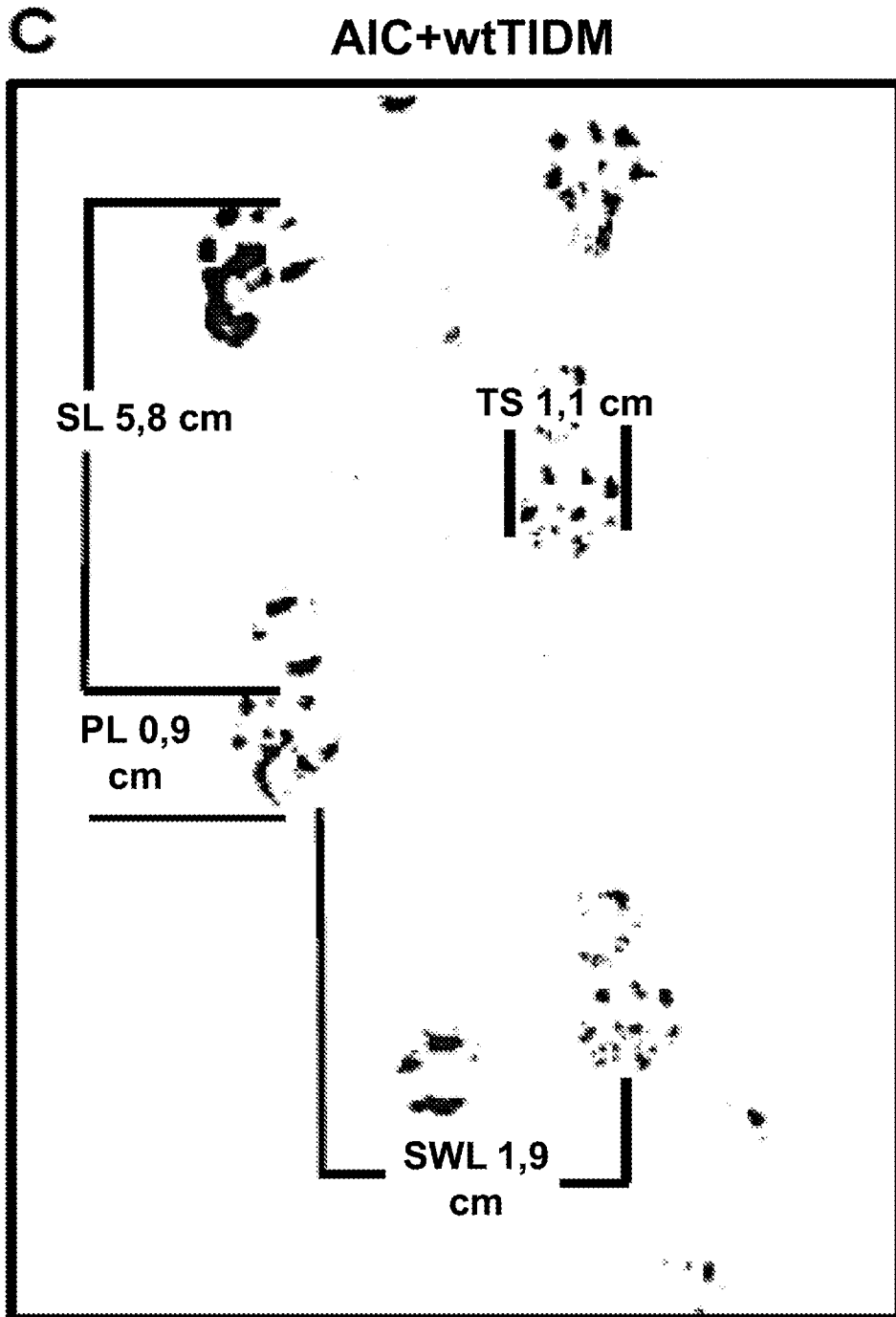


SL, longitud de zancada; SWL, longitud de balanceo; PL, longitud de impresión; TS, extensión de los dedos

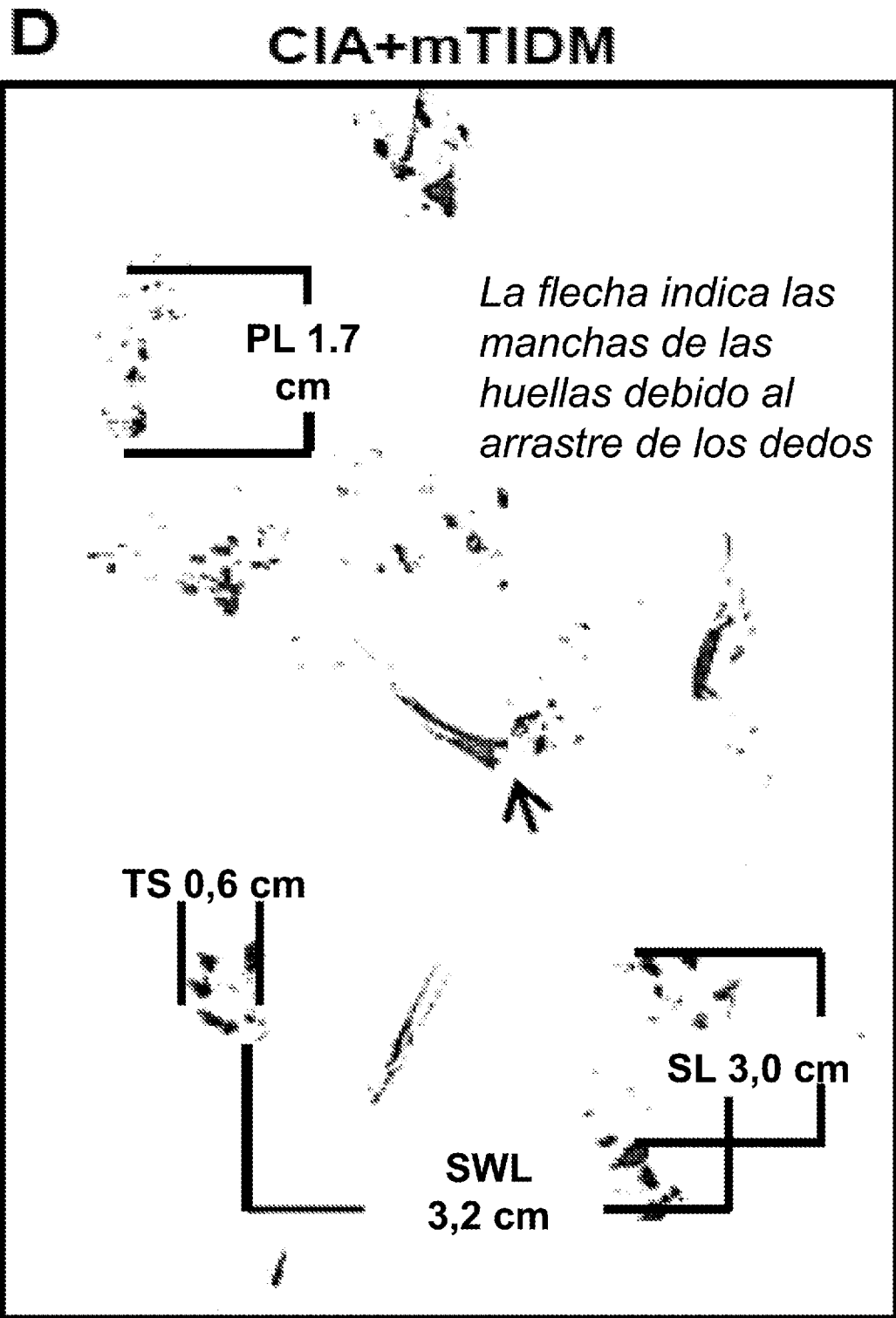
**Figura 26 A**



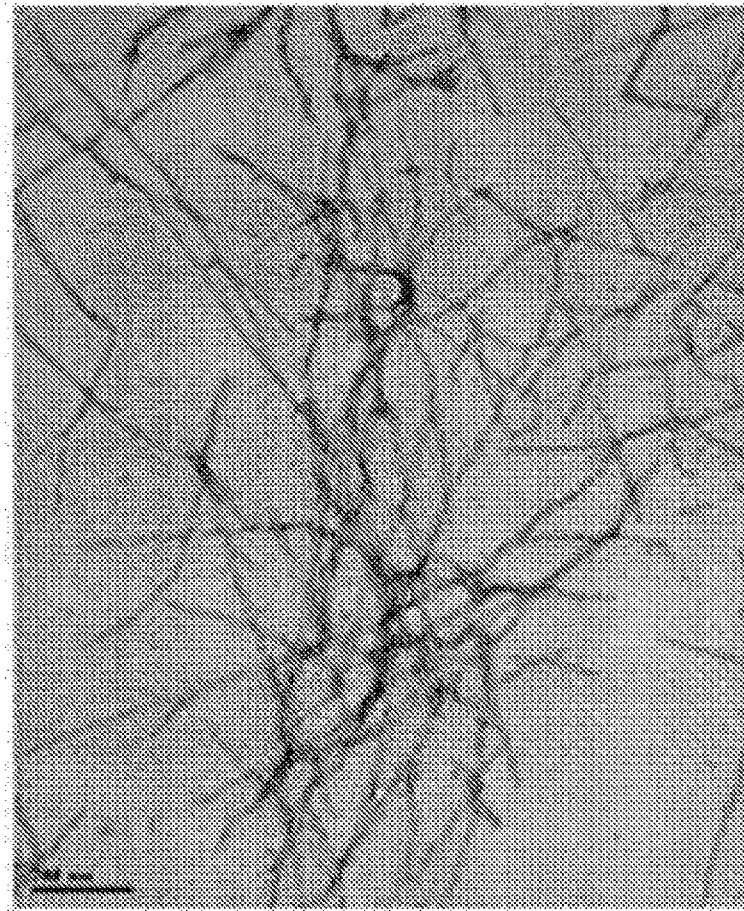
**Figura 26 B**



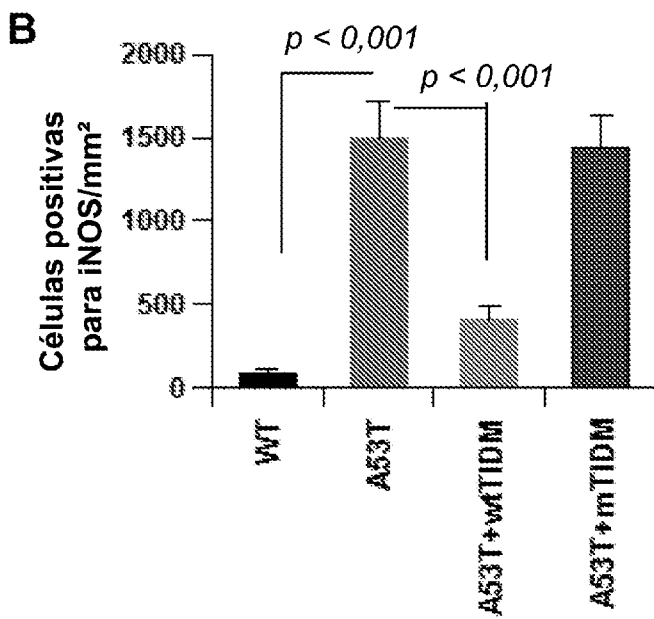
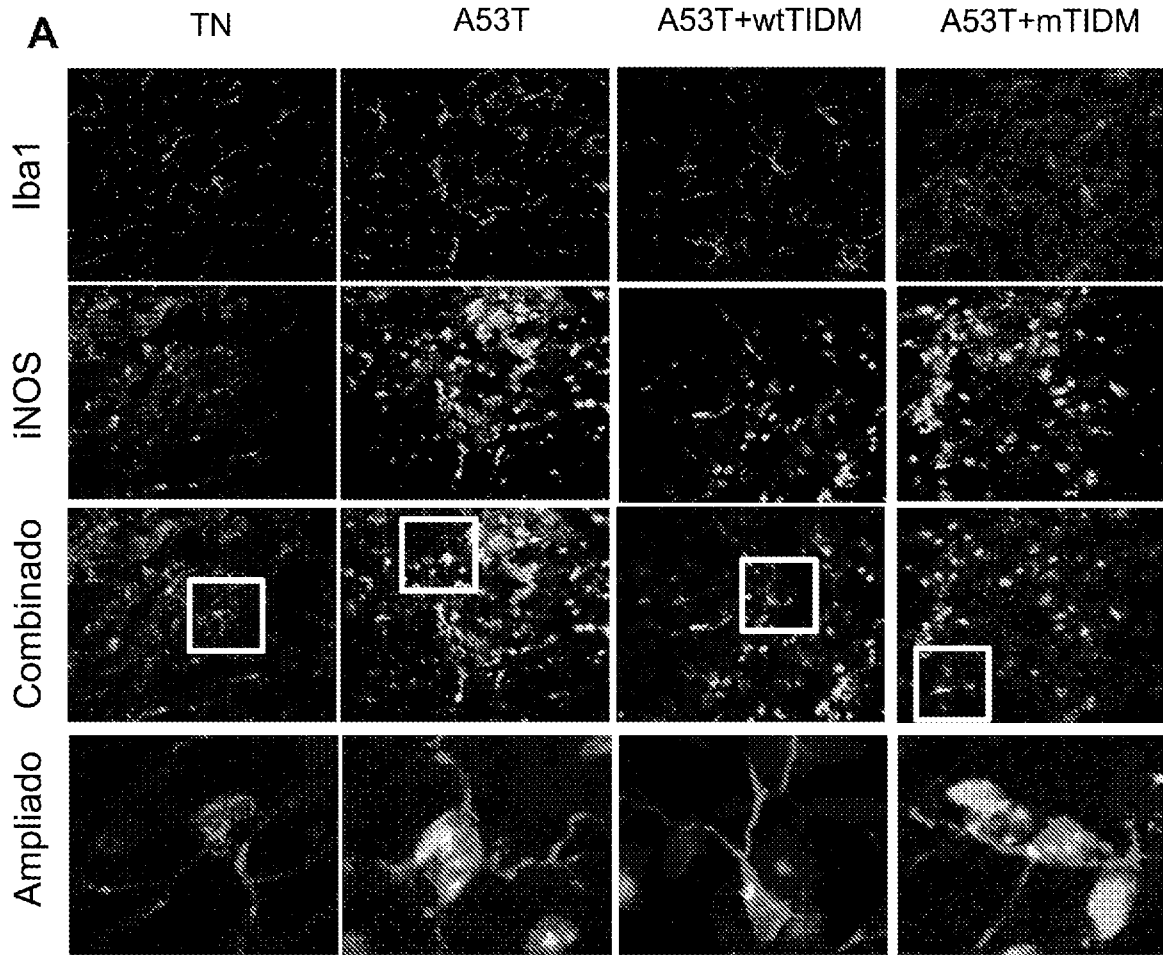
**Figura 26 C**



**Figura 26D**



**Figura 27**



**Figura 28 (A-B)**

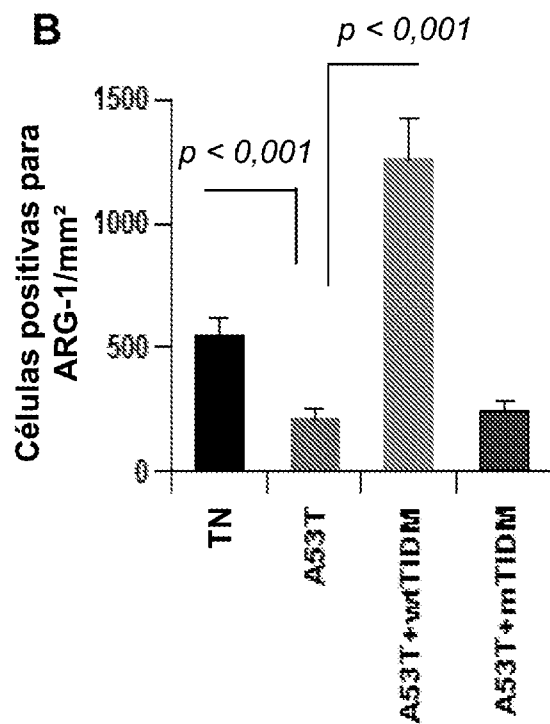
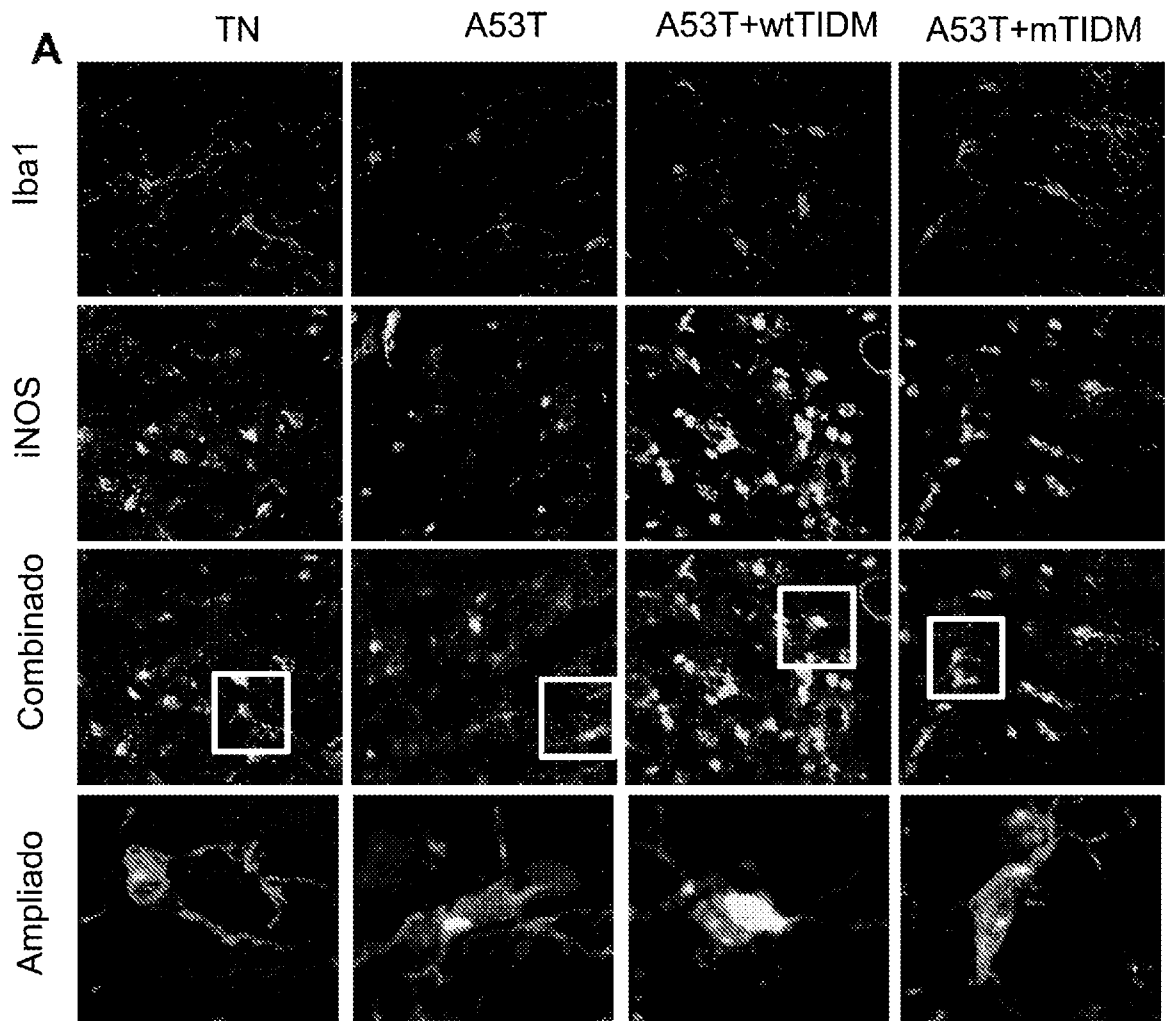
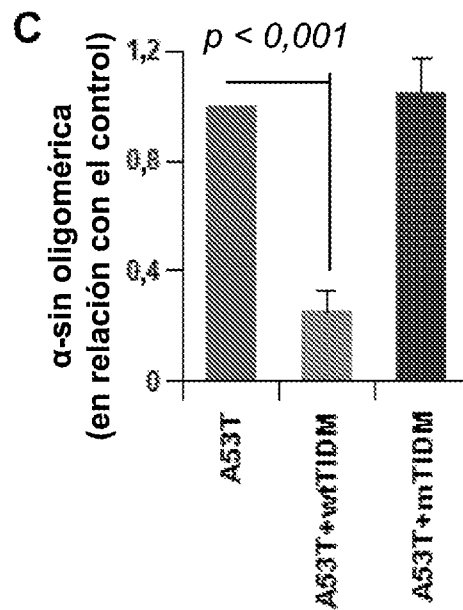
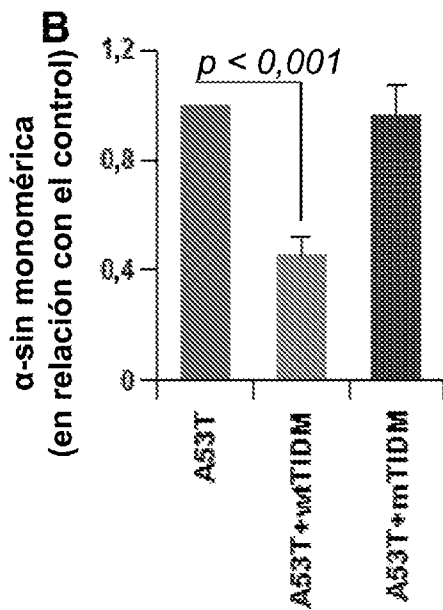
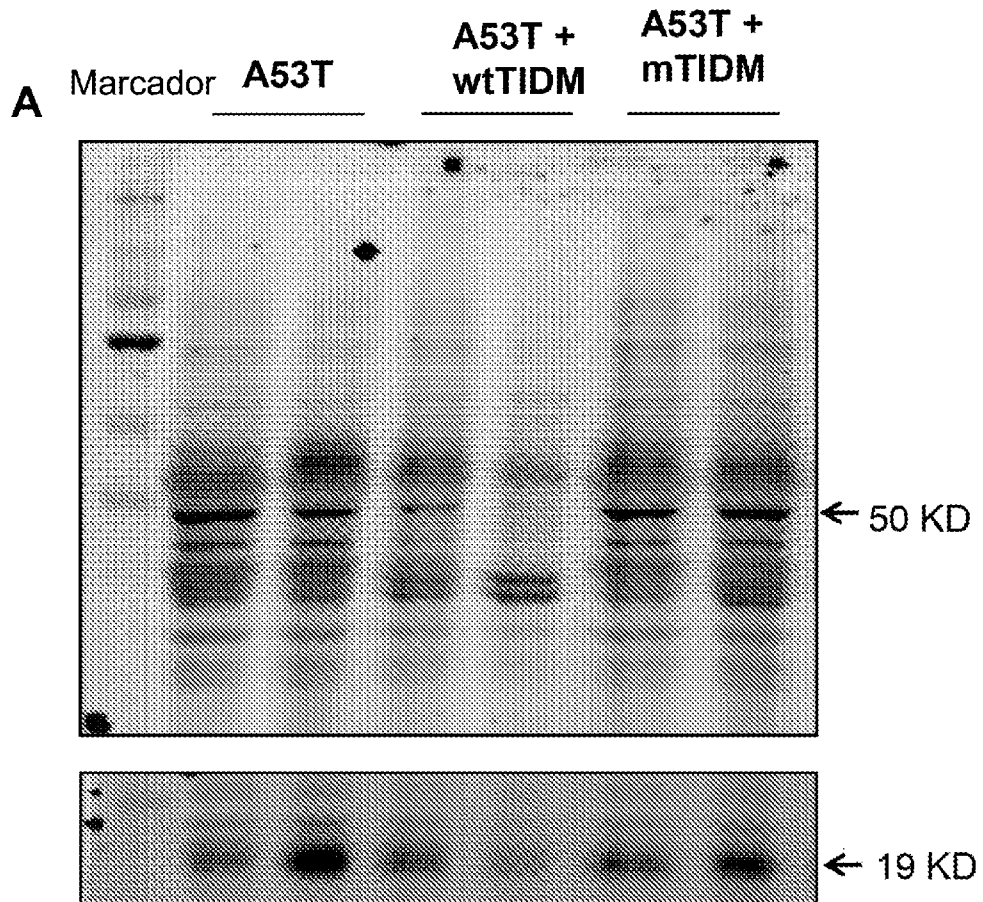


Figura 29 (A-B)



**Figura 30 (A-C)**

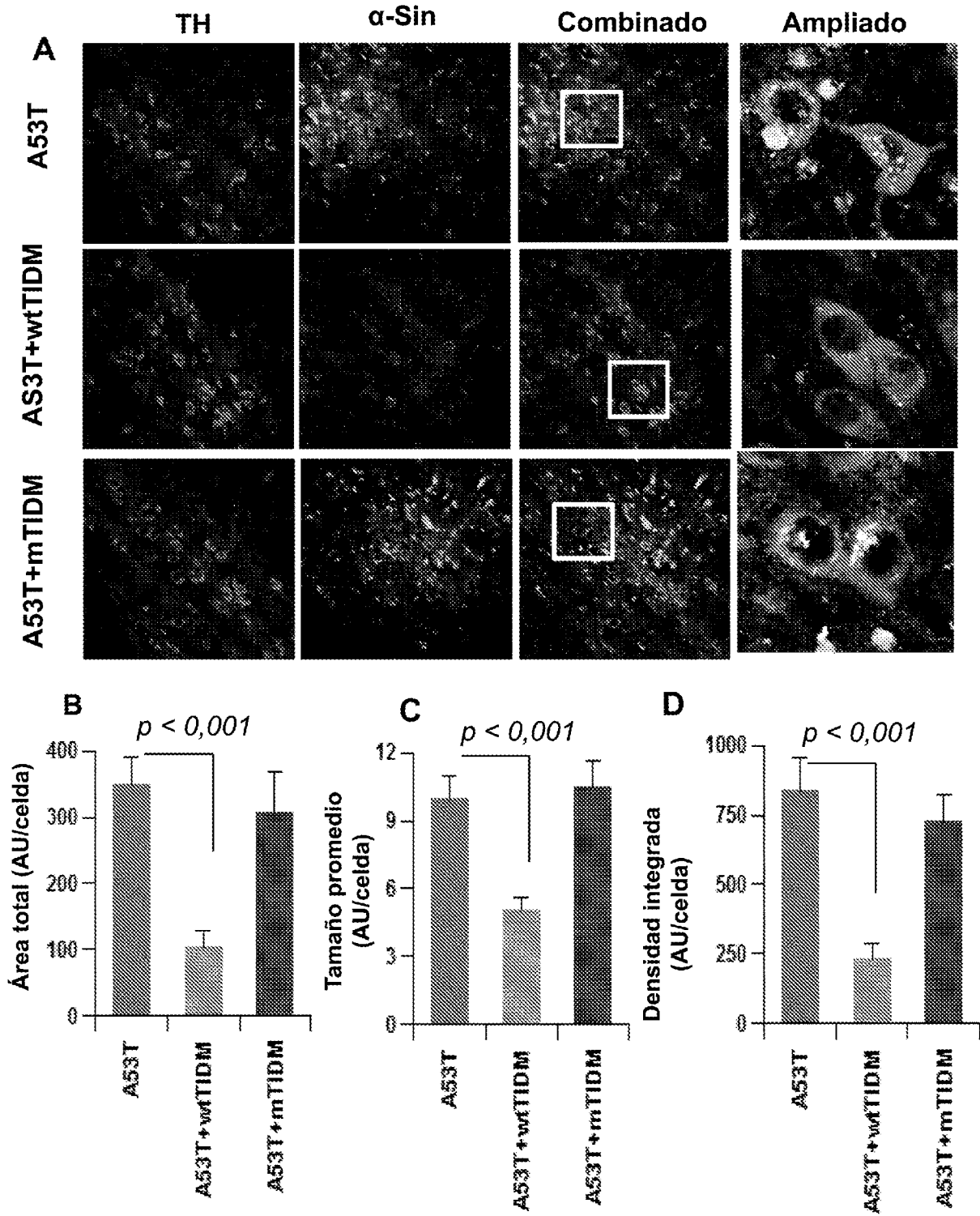
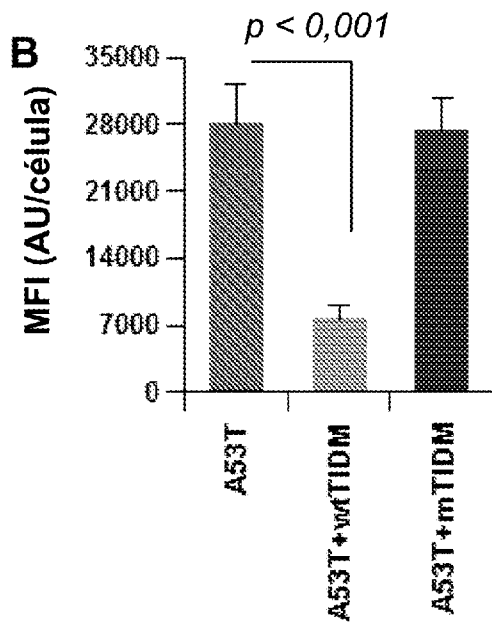
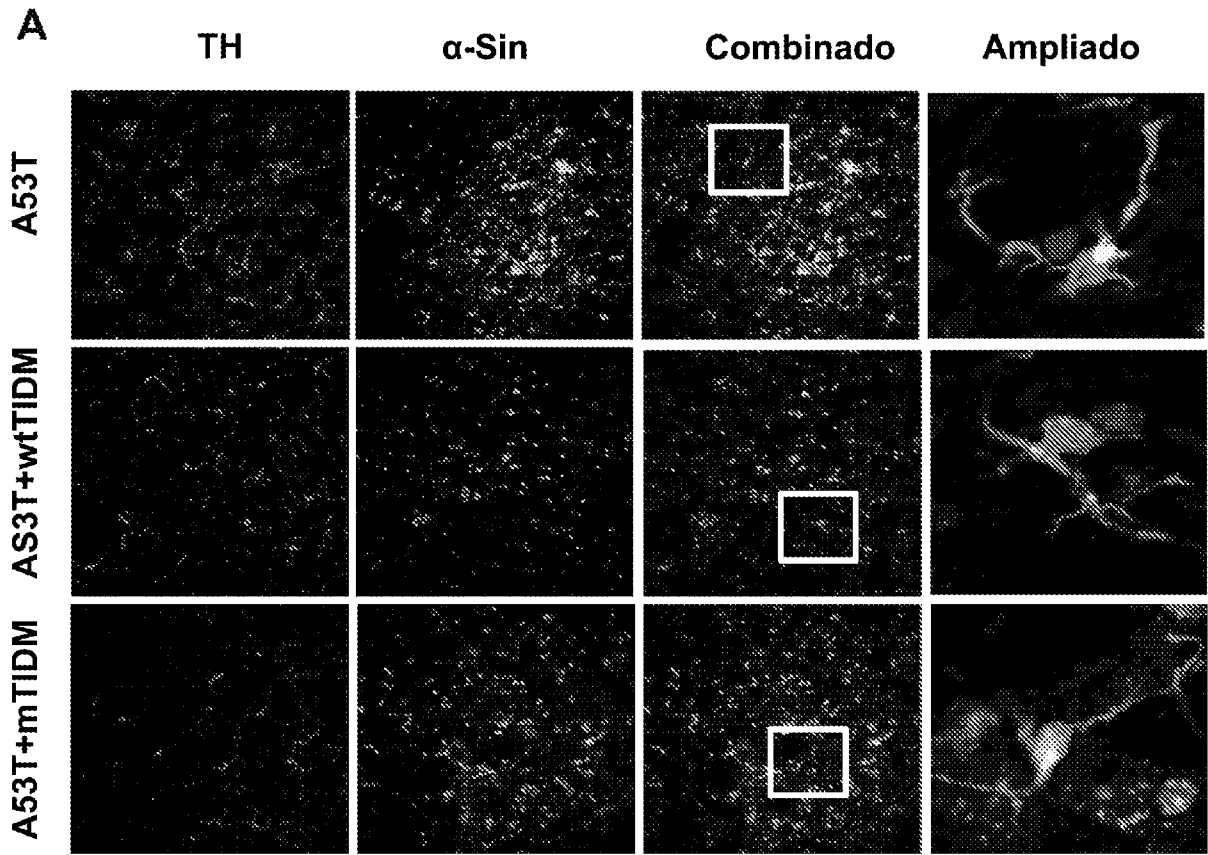


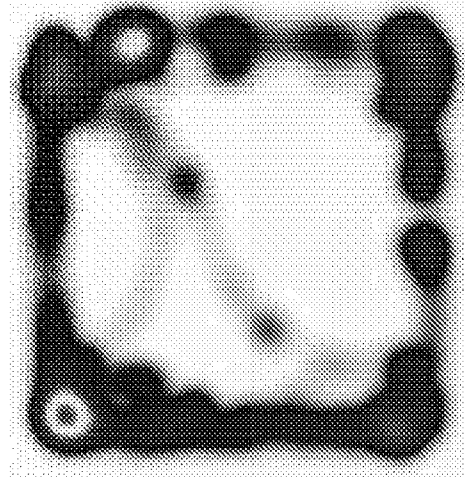
Figura 31 (A-D)



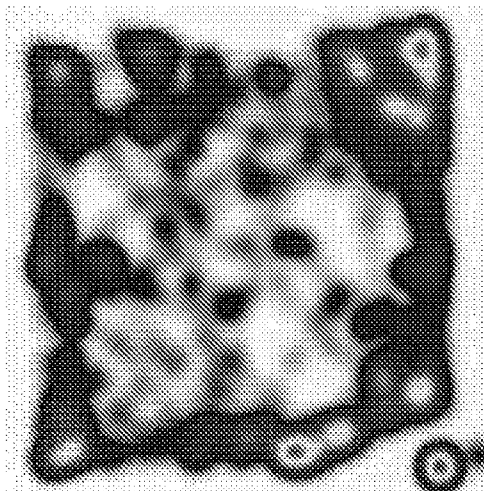
**Figura 32 (A-B)**

**A**

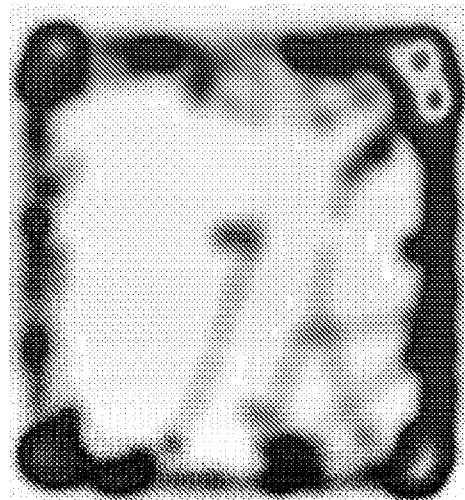
**A53T**



**A53T+  
wtTIDM**



**A53T+  
mTIDM**



**Figura 33A**

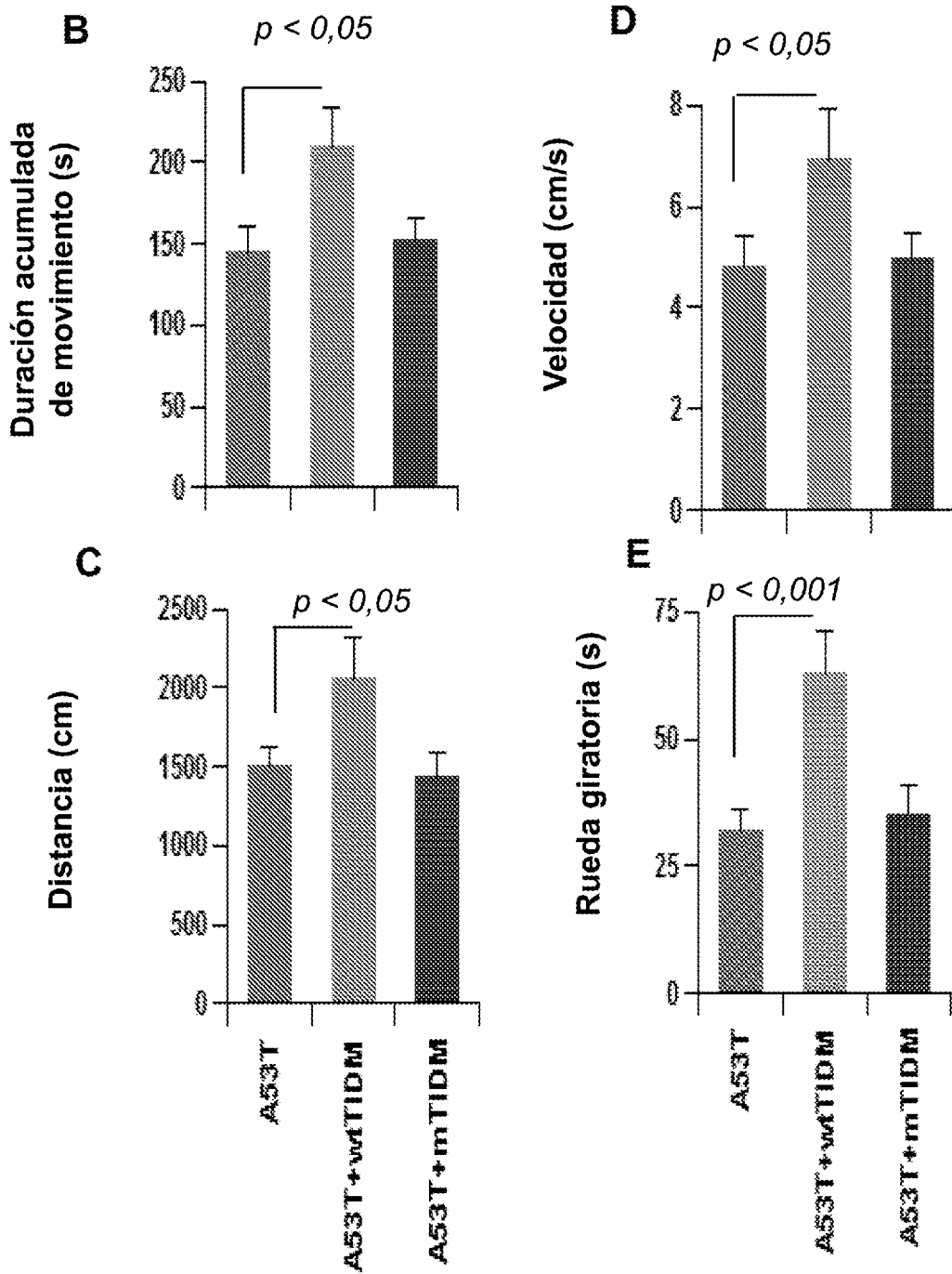


Figura 33 (B-D)