

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 080**

51 Int. Cl.:

C07K 14/72 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2017 PCT/FR2017/052788**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2018 WO18069641**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2017 E 17794365 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3526244**

54 Título: **Péptidos derivados del propéptido NTSR3 y su uso en el tratamiento de la depresión**

30 Prioridad:

11.10.2016 FR 1659781

16.03.2017 FR 1752162

11.05.2017 FR 1754127

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

11.04.2024

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

3, rue Michel-Ange

75016 Paris, FR y

UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR (50.0%)

72 Inventor/es:

MAZELLA, JEAN;

BORSOTTO, MARC;

HEURTEAUX, CATHERINE;

DJILLANI, ALAEDDINE;

MORENO, SÉBASTIEN y

PIETRI, MARIEL

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 965 080 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados del propéptido NTSR3 y su uso en el tratamiento de la depresión

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos cortos derivados del receptor 3 de la neurotensina (NTSR3) y a su uso en distintas patologías (diabetes, cáncer, epilepsia, accidente cerebrovascular, patologías neurodegenerativas, etc.), concretamente en el tratamiento de patologías psiquiátricas, en particular de pacientes que padezcan o hayan padecido depresión, por ejemplo, después de un accidente cerebrovascular. La presente invención se refiere en particular al uso de estos péptidos para la fabricación de un medicamento, por ejemplo, un antidepresivo.

La presente invención encuentra una aplicación en los sectores de la industria farmacéutica y, concretamente, en los campos del desarrollo de medicamentos utilizados en el tratamiento de distintas patologías (diabetes, cáncer, accidente cerebrovascular, epilepsia, enfermedades psiquiátricas, patologías neurodegenerativas, etc.).

En la siguiente descripción, las referencias entre corchetes ([]) remiten a la lista de referencias presentadas al final del texto.

20 **Estado de la técnica**

La depresión supone un problema importante de salud pública. Los trabajos más recientes han confirmado la fuerte prevalencia de la depresión: durante toda la vida, un 20 % de las mujeres y un 10 % de los hombres han tenido, tienen o tendrán un episodio de depresión [1]. Estas cifras son una prueba palpable, y lo son aún más cuando se considera la complicación más importante de la depresión; el suicidio, que asciende a 12.000 muertes anuales en países como Francia [2].

La depresión es una enfermedad muy frecuente, y a menudo discapacitante. Puede afectar hasta al 20 % de la población en los países industrializados. Sus orígenes son diversos y múltiples. Esta patología afecta tanto a la psique como al comportamiento y a la fisiología de los pacientes. Los tratamientos de la depresión son también múltiples, y los mecanismos de acción de los medicamentos utilizados no se han establecido con claridad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que la depresión unipolar será en 2020 la segunda causa de incapacitación. Al sufrimiento personal y familiar que supone la depresión, se añade el importante peso social de esta patología. La depresión supone ya una de las primeras causas de baja laboral, con una carga económica que asciende a más de 30.000 millones de euros anuales. A pesar del arsenal terapéutico puesto a disposición de los médicos, en particular los SSRI (“*selective serotonin reuptake inhibitors*”) y los SNRI (“*serotonin norepinephrine reuptake inhibitors*”), un 30 % de la población con depresión no tiene tratamiento. Por otra parte, el periodo de inicio de acción de los antidepresivos es del orden de 3 a 6 semanas, y los efectos secundarios son con frecuencia importantes.

De forma general, se estima que un 15 % de los pacientes con depresión fallecen por suicidio. En la mayor parte de los enfermos, la depresión se debe a la interacción entre una predisposición genética y factores ambientales como el estrés o los traumas emocionales [3]. La enfermedad es frecuente, y el mercado de los antidepresivos (AD) es enorme (al menos 10.000 millones de euros anuales).

De todas formas, aun cuando estos antidepresivos mejoran el estado de los pacientes en aproximadamente un 70 % de los casos, únicamente se consigue una remisión completa de la enfermedad en un 30 a un 40 % de estos. Además, casi un tercio de los pacientes tratados presenta resistencia a los tratamientos existentes. Esto obliga, por tanto, a prever nuevos tratamientos, capaces de tener en cuenta los mecanismos de la depresión [3].

En el arsenal terapéutico puesto a disposición de la medicina, los antidepresivos tricíclicos (TCA), como la amitriptilina y la imipramina, fueron los primeros en descubrirse, seguidos de los inhibidores de la monoamina oxidasa (IMAO), irreversibles y no selectivos, como la fenelzina y la pargilina. Los efectos no deseados, en particular la cardiotoxicidad de los TCA (sobre todo en caso de sobredosificación) y las crisis hipertensivas de los IMAO (interacciones con la tiramina de los alimentos, el famoso “*cheese effect*”), han impulsado a la investigación en la búsqueda de moléculas de eficacia terapéutica idéntica, pero con mejor aceptabilidad.

La noción de selectividad aparece con los inhibidores específicos de la recaptación de la noradrenalina (NA) o de la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5HT). Los ensayos clínicos de fase III han demostrado, para estas nuevas moléculas, una eficacia equivalente a la de los antidepresivos de primera generación, y una mejor seguridad, sobre todo en caso de una sobredosificación.

Los inhibidores específicos de la recaptación de serotonina (ISRS) y los inhibidores específicos de la recaptación de noradrenalina (ISRN), son actualmente las moléculas más utilizadas [4-5]. Los AD son, por lo tanto, los que se asocian con mayor frecuencia a la facilitación de la transmisión de los sistemas monoaminérgicos.

65

Aunque la serotonina, la noradrenalina y la dopamina sin duda están implicadas, actualmente se admite que las modificaciones de las concentraciones de monoaminas producidas por los AD y los procesos adaptativos resultantes, en particular la alteración de la sensibilidad de algunos de sus receptores, no pueden explicar por sí mismas el mecanismo de acción de los antidepresivos.

5 Además, es difícil correlacionar el periodo de 3 a 6 semanas necesario para la obtención del efecto de los AD, con el aumento de las concentraciones sinápticas de monoaminas que aparecen desde la primera administración del producto. Durante casi medio siglo, el número de hipótesis sobre la patogénesis de la depresión y su tratamiento no ha dejado de evolucionar.

10 Por ejemplo, unas concentraciones elevadas de glucocorticoides se asocian, de forma general, a un efecto sobre el estado de ánimo, así como a alteraciones estructurales del hipocampo, por una disminución de la síntesis de BDNF ("brain-derived neurotrophic factor"), por una secreción excesiva de ácido glutámico y/o por una disminución de la captación de glucosa [6].

15 Conforme a estas observaciones, los inhibidores de la síntesis de glucocorticoides y los antagonistas de receptores de glucocorticoides, ejercen efectos de tipo AD [7].

Se han desarrollado, con cierta eficacia, antagonistas que actúan sobre los receptores de la sustancia P, en particular el NK1, o el receptor CRF ("corticotropin-releasing factor"), así como antagonistas de los receptores del NMDA [8-10].

20 Diversos estudios recientes realizados en situaciones de estrés y modelos de depresión, han implicado a la neurogénesis en la etiología de los principales trastornos depresivos [11-13]. Se demostró que todos los tratamientos crónicos AD, incluido el *electroshock*, estimulan la proliferación de las células progenitoras, originariamente neuronas de la capa granular del hipocampo.

25 Se sabe también que los AD modulan la expresión de distintos factores implicados en la supervivencia y el crecimiento de las células, como CREB, Bcl2 o las MAP-quinasas. No obstante, la importancia funcional de estas neuronas neoformadas en la fisiopatología sobre los trastornos del estado de ánimo, sigue siendo controvertida [14].

30 El conjunto de estas indicaciones demuestra que la depresión es una enfermedad compleja, cuya fisiopatología es multifactorial y, por lo tanto, el tratamiento de tal patología sigue suponiendo un desafío.

35 Desde hace más de cuarenta años, la investigación sobre la depresión y el desarrollo de medicamentos eficaces ha estado dominada por la hipótesis monoaminérgica. Si bien los neurotransmisores monoaminérgicos (serotonina, noradrenalina y dopamina) están indiscutiblemente implicados, el número de hipótesis sobre la fisiopatología de la depresión y los mecanismos de acción de los AD, no ha dejado de evolucionar.

40 Los medicamentos AD utilizados actualmente producen una gama de efectos no deseados, entre ellos sequedad de la boca, visión borrosa y alteración de la función intestinal (diarrea o estreñimiento). Aunque muchos efectos secundarios son pasajeros (como las náuseas), algunos parecen ser constantes a lo largo del tiempo (como los efectos sexuales), y pueden afectar a largo plazo a la fidelidad al tratamiento. Por este motivo es crucial la investigación de nuevas moléculas que actúen sobre los receptores o canales nuevamente identificados en la depresión.

45 Determinadas proteínas, receptores y canales se han visto implicados en los mecanismos moleculares de la depresión. Este es concretamente el caso del receptor 3 de la neurotensina (NTSR3), también denominado sortilina, cuya inactivación en ratones produce un fenotipo de resistencia a la depresión, análogo al observado en ratones con inactivación del canal de potasio de fondo TREK-1.

50 El estudio reciente STAR*D (Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression) [15], identificó de forma farmacogenética al TREK-1 como el gen implicado en la respuesta antidepresiva en el ser humano. Este estudio sugiere también la utilidad de un modelo animal para la investigación de tratamientos antidepresivos, en la identificación de genes candidatos para un estudio en el ser humano. Los bloqueantes de los canales TREK-1 representan, por tanto, un nuevo concepto en el ámbito del diseño de medicamentos antidepresivos.

55 Actualmente, se ha identificado una molécula que interactúa eficazmente con los canales TREK-1. Es un péptido de 44 restos aminoácidos, denominado propéptido (PE): QDRLDAPPPAAPLPRWSGPIGVSWGLRAAAAGGAFPRGGRWRR (SEQ ID NO: 1) liberado en la maduración por la furina del receptor 3 de la neurotensina (NTSR3), que se convierte en un ligando de este mismo receptor. Un aspecto interesante es que se demostró que este propéptido es también capaz de bloquear la actividad del canal TREK-1. Se demostró que una parte de 17 aminoácidos derivada de dicho propéptido, denominada espadina (YAPLPRWSGPIGVSWGLR, SEQ ID NO: 2), posee toda la actividad de unión al receptor [16]. Se demostró recientemente que la espadina bloquea específicamente los canales TREK-1. Se comporta como un antidepresivo en modelos de la depresión en roedores, sin provocar efectos secundarios sobre las otras funciones de este canal y sobre los otros canales de potasio, ni tampoco a nivel cardíaco, ni sobre el índice de glicemia [17]. También se demostró recientemente un papel de la espadina en la regulación de la sinaptogénesis [18]. WO2015110915 describe una lista de análogos de la espadina y su aplicación terapéutica.

Existe, por tanto, una necesidad real de nuevas moléculas utilizables para el tratamiento de la depresión, moléculas más eficaces, mejor toleradas, y que tengan una acción más rápida.

Descripción de la invención

5 La presente invención tiene precisamente el objetivo de responder a esta necesidad y de resolver los inconvenientes de la técnica anterior.

10 Para ello, los inventores han investigado si los péptidos más pequeños resultantes de la degradación de la espadina podrían tener también un rol de antidepressivo, y han identificado, de forma completamente inesperada, nuevos péptidos activos derivados del propéptido (PE) modificado o no.

15 El péptido PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 3 (GVSWGLR), derivado también de dicho propéptido, se utilizó como péptido de base para el diseño de otros péptidos: el péptido PE(22-28) biotinilado, el péptido PI-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 6 (PIGVSWGLR), el péptido PI-PE(22-28) biotinilado, el péptido G/A-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 7 (AVSWGLR), correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde la glicina en la posición 22 se sustituyó por una alanina, el péptido G/A-PE(22-28) biotinilado, el péptido dansil-PE(22-28), correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde se añadió un grupo químico dansilo en el extremo N-terminal, y los péptidos O-metil-PE(22-28) y O-etil-PE(22-28), correspondientes a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde se añadió un grupo químico O-metil u O-etil en el extremo C-terminal, respectivamente.

25 Estos análogos PE(22-28), en adelante denominados análogos de la espadina, presentan una importante acción antidepressiva (AD) en los ratones, como se ha medido mediante pruebas comportamiento (prueba de nado forzado, prueba de indefensión aprendida), e inducen rápidamente, y de forma más eficaz, una neurogénesis y una sinaptogénesis. Dado que las dianas fisiológicas de estos análogos de la espadina son las mismas que las de la espadina, sus mecanismos de acción son muy similares a los de la espadina. Estos análogos de la espadina actúan por la inhibición del canal TREK-1, con una mejor afinidad (x333) que la espadina misma (0,12 nM para los análogos de espadina frente a 40 nM para la espadina). Teniendo en cuenta la mejor afinidad y el menor tamaño de los análogos de la espadina, las principales ventajas de estos péptidos son, en primer lugar, una reducción de la cantidad de producto a administrar y, por tanto, una disminución de los efectos secundarios potencialmente asociados (toxicidad, tumorigenicidad, etc.) y, en segundo lugar, una reducción del coste de producción, así como su disponibilidad para cualquier ruta de administración conocida (icv, iv, ip y oral). Anteriormente se demostró que la espadina tiene un efecto rápido, 4 días frente a 21 días, para los antidepressivos tradicionales. Por lo tanto, el uso de péptidos cortos, que a la vez están rápidamente disponibles y que se eliminan rápidamente del organismo, supone una garantía de un producto terapéutico eficaz sin efectos secundarios; algo de importancia crucial en la salud pública.

40 La presente descripción describe, por lo tanto, un péptido derivado del propéptido (PE) del receptor 3 de la neurotensina (NTSR3) elegido de entre el péptido PE(22-28) biotinilado correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3 biotinilada, el péptido PI-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 6 (PIGVSWGLR), el péptido PI-PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 6 biotinilada, el péptido G/A-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 7 (AVSWGLR), correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde la glicina en la posición 22 se sustituyó por una alanina, el péptido G/A-PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 7 biotinilada, el péptido dansil-PE(22-28), correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde se añadió un grupo químico dansilo en el extremo N-terminal, y los péptidos O-metil-PE(22-28) y O-etil-PE(22-28), correspondientes a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde se añadió un grupo químico O-metil u O-etil en el extremo C-terminal, respectivamente.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

50 La presente invención tiene también por objeto un péptido derivado del propéptido (PE) del receptor 3 de la neurotensina (NTSR3), elegido de entre el péptido PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3 biotinilada, el péptido PI-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 6 (PIGVSWGLR), el péptido PI-PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 6 biotinilada, el péptido G/A-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 7 (AVSWGLR), correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde la glicina en la posición 22 se sustituyó por una alanina, el péptido G/A-PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 7 biotinilada, el péptido dansil-PE(22-28), correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde se añadió un grupo químico dansilo en el extremo N-terminal, y los péptidos O-metil-PE(22-28) y O-etil-PE(22-28), correspondientes a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde se añadió un grupo químico O-metil u O-etil en el extremo C-terminal, respectivamente.

60 La presente invención tiene también por objeto una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de la invención. Esta secuencia es preferiblemente utilizable para fabricar el péptido de la presente invención, o un fragmento o derivado del mismo por transfección. Es, por ejemplo, la secuencia con los números de acceso a GenBank para los ARN mensajeros de la sortilina SORT 1, en ratones: NM_019972, en el ser humano: NM_002959.

65 La presente invención tiene también por objeto un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la invención. Puede ser cualquier vector adecuado para la transformación de una célula huésped para la producción por dicha célula, mediante una técnica de recombinación genética, de un péptido de la presente invención. El vector

puede obtenerse a partir de un vector elegido, por ejemplo, en el grupo que comprende pIRES y pIRES2 y sus derivados, pcDNA3 y sus derivados, pGEX y sus derivados.

5 La presente invención tiene también por objeto una célula huésped que comprenda un péptido según la presente invención, y/o una secuencia de ácido nucleico según la presente invención, y/o un vector según la presente invención. La célula huésped puede ser cualquier célula adecuada para transformarse y para fabricar dicho péptido de la invención, o fragmento o derivado de este. Pueden ser, por ejemplo, las células COS-7, HEK 293 y derivadas, N1 E115 y similares.

10 Por tanto, la presente invención se refiere también a un método de producción de un péptido según la invención, que comprende las etapas siguientes:

– transfectar una célula huésped con un ácido nucleico según la invención o transformar una célula huésped con un vector de la invención;

15 – cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la expresión de un péptido según la invención; y

– recuperar dicho péptido.

20 Las técnicas de transfección y de transformación utilizables para fabricar un péptido de la presente invención, son las conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, las descritas en Alloui A y col., EMBO J. 2006 [19].

25 Según la invención, teniendo en cuenta el pequeño tamaño de los péptidos de la invención, el método de fabricación preferido del péptido es la síntesis química, por ejemplo, en fase sólida. Puede utilizarse cualquier técnica conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo, el péptido puede sintetizarse según la técnica en fase sólida de Krieger DE y col., Proc Nat Acad Sci U.S.A. 1976 [20].

Los péptidos de la invención abren una nueva vía en el establecimiento de una nueva clase de antidepresivos y de nuevas estrategias terapéuticas de la depresión.

30 La presente invención tiene también por objeto un péptido según la invención, para un uso como medicamento, en particular como antidepresivo.

35 La presente invención tiene también por objeto un péptido según la invención, para un uso en el tratamiento de distintas patologías, tales como la diabetes, el cáncer, el accidente cerebrovascular, las patologías neurodegenerativas, las patologías psiquiátricas, concretamente la depresión, por ejemplo, la depresión post-accidente cerebrovascular. Estas hipótesis vienen apoyadas por varios hechos experimentales. Los canales TREK-1 están presentes en la superficie de las células beta pancreáticas, tales como las células beta-TC3. Además, se demostró que la espadina (YAPLPRWSGPIGVSWGLR, SEQ ID NO:2) aumenta la secreción de insulina posterior a una hiperglicemia (Hivelin C y col., J Diabetes Res. 2016) [27]. Además, en las células β TC3, los inventores demostraron que el péptido PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 3: GVSWGLR bloquea las corrientes de potasio sensibles al ácido araquidónico (aa). Dado que la espadina, el péptido PE(22-28), y los péptidos de la presente invención tienen las mismas dianas fisiológicas, de hecho estos péptidos también pueden considerarse moléculas hipoglucemiantes. Por otra parte, los canales TREK-1 están también presentes en la superficie de células cancerosas, tales como las células LNCaP (cáncer de próstata). En las células LNCaP, los inventores han demostrado que el péptido PE(22-28) bloquea las corrientes de potasio sensibles al ácido araquidónico (aa), e inhibe su crecimiento. El péptido PE(22-28) y los péptidos de la presente invención tienen las mismas dianas fisiológicas, de hecho puede considerarse también que presentan una actividad anticancerosa. También puede preverse el uso de un péptido según la invención, en la neuroprotección frente a un accidente cerebrovascular, o la epilepsia.

50 Los péptidos de la presente invención como se definieron anteriormente, con excepción del G/A-PE(22-28), son productos naturales que constituyen un nuevo tipo de antidepresivo. Permiten evitar todos los efectos secundarios no deseados de los medicamentos actualmente utilizados para el tratamiento de la depresión. Los efectos secundarios de los medicamentos utilizados en la técnica anterior son producto de su naturaleza química. Estos medicamentos de la técnica anterior son moléculas que con frecuencia son capaces de pasar de forma pasiva las membranas plasmáticas celulares, lo que implica interacciones no específicas con efectores intracelulares. El carácter peptídico de la presente invención permite evitar este problema.

Por otra parte, la acción directa de un péptido de la presente invención sobre el canal de potasio TREK-1, podría reducir el periodo de inicio de acción, a menudo prolongado, de un antidepresivo tradicional.

60 Para el experto en la técnica serán evidentes otras ventajas con la lectura de los ejemplos que siguen, proporcionados obviamente a título ilustrativo y no limitativo, con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 muestra la acción de los análogos de la espadina de la invención, sobre la actividad del canal TREK-1, en comparación con la de la espadina y la del péptido PE(22-28), medida *in vitro* mediante experimentos electrofisiológicos.
- 5 – La Figura 2 muestra la acción de los análogos de la espadina G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28) biotinilado, sobre la actividad del canal TREK-1, en comparación con la de la espadina y el péptido pE(22-28), medida *in vitro* mediante experimentos electrofisiológicos.
- La Figura 3 muestra la actividad antidepresiva de los análogos de la espadina según la presente invención, en comparación con la de la espadina y el péptido PE(22-28), medida *in vivo* en ratones sometidos a la prueba de nado forzado (FST).
- 10 – La Figura 4 muestra la actividad antidepresiva de los análogos de la espadina G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28) biotinilado, en comparación con la de la espadina y el péptido PE(22-28), medida *in vivo* en ratones sometidos a la prueba de indefensión aprendida (LHT).
- 15 – La Figura 5 muestra el estudio por inmunohistoquímica de la acción de los análogos de la espadina G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28) biotinilado, en comparación con la del péptido PE(22-28), sobre la neurogénesis.
- 20 – La Figura 6 muestra el estudio de la acción de los análogos de la espadina G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28) biotinilado (B y C, respectivamente), en comparación con la del péptido PE(22-28) (A), sobre la sinaptogénesis. (D) histograma de PSD-95 para cada péptido.
- La Figura 7 muestra la acción del péptido PE(22-28) sobre la actividad del canal TREK-1, expresado en células pancreáticas β TC3 (A) y cancerosas LNCaP (B), medida *in vitro* mediante experimentos electrofisiológicos, y sobre el crecimiento de las células cancerosas LNCaP (C).
- 25

Ejemplos

30 Ejemplo 1: Acción de los análogos de la espadina sobre la actividad del canal TREK-1

Todos los experimentos de medición del efecto de la espadina y de los análogos de la espadina, se llevaron a cabo en células beta-TC3 o LNCaP o HEK293 transfectadas de forma estable con el canal TREK-1, hTREK-1/HEK293. La línea celular hTREK-1/HEK293 se preparó en el laboratorio [21]. Estas células expresan también un gen indicador: E-Green Fluorescent protein (EGFP) que permite su visualización.

35

Estas células se sembraron a una densidad de 20.000 células/placa de 35 mm de diámetro, 24 a 72 horas antes de su uso.

40 Las células HEK293 se cultivaron en un medio DMEM (Gibco)/suero de feto de ternera (SVF, ICN) al 10 % / una mezcla estreptomycin + penicilina (Gibco) al 1 % / glutamax (Gibco) al 1 % / 0,5 mg/ml de G418 (Sigma) a 37 °C, en presencia de un 5 % de CO₂.

45 Las células beta-TC3 se cultivaron en un medio RPMI 1640 suplementado por SVF al 2,5 %, 50 μ M de betamercaptoetanol, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sodio, 50 μ g/ml de gentamicina, y una mezcla de estreptomycin + penicilina al 1 % a 37 °C, en presencia de un 5 % de CO₂.

50 Las células LNCaP se cultivaron en un medio DMEM (Gibco) / suero de feto de ternera (SVF, ICN) al 10 % / mezcla de estreptomycin + penicilina (Gibco) al 1 % / glutamax (Gibco) al 1 % / a 37 °C, en presencia de un 5 % de CO₂. En el día 1, las células hTREK-1/HEK293 o beta-TC3 o LNCaP, se sembraron a 20.000 células por placa de 35 mm de diámetro que contenía 2 ml de medio de cultivo. Del día 2 al día 4, las células se midieron mediante métodos electrofisiológicos.

Todas las mediciones se hicieron a temperatura ambiente, es decir, a 21-22 °C. Las células hTREK-1/HEK293 se detectaron gracias a la fluorescencia emitida por la EGFP, tras su excitación a 480 nm.

55 Se utilizó la técnica del *patch clamp* sobre células enteras para medir la actividad de los canales TREK-1. El aparato utilizado es el RK 400 patch-clamp amplifier (Axon Instruments, EE. UU.). Las pipetas de *patch* con resistencias de 1,3 a 8 M Ω se prepararon a partir de capilares de vidrio de borosilicato, y se rellenaron con una solución de 155 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 5 mM de EGTA, 10 de HEPES/KOH, pH 7,2.

60 El medio de cultivo celular se sustituyó por una solución de 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, 10 mM de HEPES/NaOH, pH 7,4, que contenía 10 mM de cloruro de tetraetilamonio, 3 mM de 4-aminopiridina. Las células se perfundieron de forma continua con esta solución. El potencial de reposo de la membrana de la célula medida se fijó en -80 mV.

Las variaciones de tensión se obtuvieron bien por rampa continua (de -100 a + 60 mV) o bien por salto de potencial de 10 mV (de -100 a +60 mV, 1,5 segundos por salto). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Pclamp.

5 Las corrientes descritas en las Figuras 1 y 2 se obtuvieron a 0 mV. Los resultados expresados de las Figuras 1 y 2 son promedios \pm desviación estándar. El valor de IC₅₀ de la Figura 2 se obtuvo trazando los datos experimentales con ayuda de una función sigmoïdal.

10 La actividad del canal se midió a continuación mediante la técnica de “*patch-clamp*” en una configuración de célula entera, como se describió anteriormente.

15 En la Figura 1 se muestran las inhibiciones de la actividad de los canales TREK-1, medidas a 0 mV del conjunto de los análogos de la espadina de la invención y de la espadina. Indica que todos los análogos de la espadina, salvo los péptidos PE(14-25), PE(22-25) y PE(22-27), son capaces de bloquear la actividad de los canales TREK-1, en la misma medida que la espadina [PE(12-28)].

20 Se generó una curva de dosis-respuesta de la inhibición de la actividad de los canales TREK-1, medida a 0 mV en presencia de los análogos G/A-PE(22-28) o G/A-PE(22-28) biotinilado, o de espadina. Estas curvas se muestran en la Figura 2. Esta indica una concentración de efecto medio (IC₅₀) de 0,12 nM y 0,13 nM para los péptidos G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28) biotinilado, respectivamente, y de 40 nM para la espadina.

25 El conjunto de los resultados muestra que la mayor parte de los análogos de espadina son capaces de bloquear los canales TREK-1, con una mejor afinidad (x333) que la espadina y, para algunos análogos, con una afinidad equivalente a la del péptido PE(22-28).

30 Las intensidades de corriente medidas en función de la tensión [$I = f(V)$] aplicada a las células β TC3 descritas en la Figura 7A, indican que la espadina es capaz de bloquear los canales TREK-1 expresados en células β TC3, y previamente activados con ácido araquidónico (aa). La espadina y los péptidos de la presente invención tienen las mismas dianas fisiológicas, de hecho estos péptidos pueden considerarse moléculas hipoglucemiantes.

35 Las intensidades de corriente medidas en función de la tensión [$I = f(V)$] aplicada a las células LNCaP descritas en la Figura 7B, indican que el péptido PE(22-28) es capaz de bloquear los canales TREK-1 expresados en células LNCaP, y previamente activados con ácido araquidónico (aa). Además, el crecimiento de las células LNCaP obtenido tras el recuento de las células en cultivo después de 24 o 48 h, en presencia o ausencia del péptido PE(22-28), indica que el péptido PE(22-28) es capaz de inhibir el crecimiento celular. El péptido PE(22-28) y los péptidos de la presente invención tienen las mismas dianas fisiológicas, de hecho estos péptidos pueden considerarse también moléculas que presentan una actividad anticancerosa.

Ejemplo 2: Pruebas de comportamiento

40 Prueba de nado forzado (o *Forced Swimming Test*, FST)

45 Se desarrolló una prueba de comportamiento considerada clásica, para determinar la actividad antidepressiva de una sustancia (Nestler EJ y col., 2002; Cryan J y Holmes A, 2005) [22, 23]. Los efectos de los análogos de la espadina de la presente invención, se compararon con los de solución salina, en donde se disolvieron los análogos de espadina de la invención, y con los efectos de la espadina. La cepa de ratones utilizada fue la cepa C57Bl/6J.

La solución salina, los análogos de la espadina y la espadina, se administraron a ratones por vía intraperitoneal (IP) con una dosis de 100 μ g/kg en un bolo de 100 μ l.

50 El experimento consistió en, 30 min después de la administración de la sustancia a ensayar, sumergir los ratones durante 6 minutos en un recipiente de 15 cm de diámetro y 30 cm de altura, que contenía 11 cm de agua a 22 °C, y medir el tiempo de inmovilidad en los 4 últimos minutos.

55 Los resultados de estas pruebas se muestran en la Figura 3: Pruebas FST, los valores \pm SEM se compararon estadísticamente con la condición control (suero fisiológico) *** $p < 0,001$, (Prueba “ANOVA” = prueba de análisis de varianza)

60 Los resultados muestran que los análogos de la espadina capaces de inhibir la acción de los canales TREK-1, son eficaces en la prueba de nado forzado, tras su inyección IP en los ratones. Sin embargo, el péptido PE(22-27) que no es eficaz para inhibir los canales TREK-1, tampoco es eficaz en la reducción el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado.

Prueba de indefensión aprendida (o *Learned Helplessness Test*, LHT)

65 La indefensión aprendida, o *learned helplessness*, es un modelo basado en una administración repetida de sacudidas eléctricas que permiten inducir un estado de indefensión en el animal. Se demostró que los animales

que reciben sacudidas eléctricas inevitables, se resignan a recibirlas, y no intentan escapar (Seligman y Beagley, Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88, 534-541, 1975) [24].

5 El aparato se compone de dos compartimentos separados por una puerta deslizante, y con una placa que consta de una rejilla metálica por la que se administran los impulsos eléctricos. El protocolo de la indefensión aprendida se divide en dos etapas, una etapa de condicionamiento del animal, y una etapa de prueba.

10 El condicionamiento se hace en cuatro días, durante los cuales los ratones recibieron 360 sacudidas eléctricas no evitables, de 0,3 mA, durante una hora (la puerta que separa ambos compartimentos está cerrada). Las sacudidas fueron de una duración de 2 segundos, y se respetó un intervalo de 8 segundos entre cada sacudida. Esta etapa de condicionamiento ha permitido inducir un fenómeno de indefensión en los animales.

15 El día de la prueba, se situaron a los ratones en los mismos compartimentos, pero con posibilidad de escapar de la sacudida. La prueba incluyó 30 ensayos. En el momento de la administración de la sacudida, se abre la puerta que separa ambos compartimentos, permitiendo que los animales escapen. Cuando el animal cambia de compartimento, el ensayo finaliza, y la sacudida se detiene. Si el ratón no cambia de compartimento, la sacudida se detiene transcurridos 24 segundos, y el ensayo finaliza. Esta prueba permitió registrar las latencias de escape de los animales. A continuación, los treinta ensayos se agruparon en grupos de 5, y se calculó el promedio del tiempo de escape.

20 Las moléculas G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28)-biotinilado, o la solución salina, se inyecta 30 minutos antes del condicionamiento, en forma de un bolo de 100 µl de una solución de 10⁻⁶ M, preparadas en la solución salina.

25 Los resultados presentados en la Figura 4 demuestran que los péptidos G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28) biotinilado administrados a ratones en las mismas condiciones anteriormente descritas, son capaces de reducir las latencias de escape en la prueba de indefensión aprendida, de forma equivalente al péptido PE(22-28).

Ejemplo 3: Acción de los análogos de la espadina sobre la neurogénesis y la sinaptogénesis

30 Estudio de la neurogénesis mediante inmunohistoquímica

La BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) es un nucleósido sintético análogo de la timidina. Se incorpora en la replicación del ADN, durante la fase S (duplicación de cromosomas en la interfase) de las células en división. La inyección de BrdU permite visualizar las células en división del tejido a analizar, gracias a un etiquetado inmunológico. En el presente estudio, se evaluó la neurogénesis del hipocampo de los ratones tras el tratamiento con espadina o con los distintos análogos.

35 Después de las pruebas de comportamiento, se inyectó a los ratones BrdU en una concentración final de 120 mg/kg, por vía intraperitoneal, siguiendo el protocolo modificado de Beauquis, J. y col. (*Eur J Neurosci* 23, 1539-1546, 2006) [25]. Se efectuaron cuatro inyecciones de 300 µl a 10 mg/ml, espaciadas en dos horas. 24 h después de las inyecciones, los ratones se anestesiaron con pentobarbital (100 mg/kg) y, a continuación, se sometieron a perfusión por vía intracardiaca. 40 Eh el momento de la perfusión intracardiaca, el suero fisiológico se administró para eliminar toda la sangre del cuerpo de los ratones, perfundiéndose a continuación paraformaldehído al 4 % (PFA), para fijar los órganos. También se llevó a cabo la postfijación, en PFA al 4 %, durante la noche. Los cerebros de los ratones se cortaron con ayuda de un vibrátomo (Leica), que permitió obtener cortes frontales flotantes de 40 µm. Los cortes seleccionados para la reacción inmunológica fueron los comprendidos entre bregma 3,3 y 5,3. Se seleccionaron ocho cortes con un espaciado regular, lo que permitía 45 cubrir la totalidad del hipocampo, manteniendo la homogeneidad de un cerebro a otro.

La reacción inmunológica se llevó a cabo incubando un anticuerpo primario antiBrdU (BD Pharmingen, 1/8000), con los cortes de cerebro, toda la noche a 4 °C. A continuación, los cortes de cerebro se lavaron en PBS (*Phosphate Buffered Saline*), y se incubaron dos horas con anticuerpos secundarios (anticuerpos de cabra antirratón biotinilados, Vecto laboratories, 1/400). Se llevó a cabo una incubación de una hora, en un complejo 50 avidina/biotina/peroxidasa (Kit ABC Vectastain, Vecto laboratories), para amplificar la reacción inmunológica. Por último, el revelado se hizo con ayuda de un kit de sustrato de peroxidasa (Vector Laboratories) que contenía una solución de níquel, una solución de 3-3'diaminobenzidina y de H₂O₂.

55 A continuación, se montaron los cortes sobre portaobjetos, y se fijaron con Entellan. Se contaron las células positivas para BrdU en el giro dentado del hipocampo en ambos hemisferios de cada cerebro. A continuación, el número de células obtenido en los 8 cortes se multiplicó por 40, para tener en cuenta el número total de células en proliferación en todo el hipocampo.

60 Los resultados presentados en la Figura 5 muestran que los péptidos G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28) biotinilado, son capaces de inducir un aumento de la neurogénesis después de tan solo cuatro días de tratamiento. Estos aumentos son superiores al aumento obtenido en las mismas condiciones para el péptido PE (22-28) no modificado.

Sinaptogénesis

Se anestesiaron ratones C57B1/6J hembra gestantes (20-25 g, Janvier Labs, St Berthevin, Francia) por inhalación de isoflurano al 2 %, mezclado con oxígeno al 30 % y óxido nitroso al 70 % y, a continuación, se sacrificaron. Se extrajeron los embriones (E14), y los cortex cerebrales se disecaron en PBS que contenía glucosa al 1 %. Las neuronas se prepararon a partir de cortex cerebrales por disociación mecánica, como se describe en Brewer y Torricelli, 2007 [26]. Las neuronas disociadas se distribuyeron en placas tratadas con poli-L-lisina, y cultivadas hasta 10 días en un medio neurobasal que contenía un 2 % de B27 (Invitrogen, Fisher Scientific, Illkirch, Francia) y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma France), a 37 °C, en un 5 % de CO₂.

Los análogos de la espadina G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28) biotinilado, se sintetizaron por Covalab, Villeurbanne, Francia.

Los cultivos de neuronas corticales, aisladas a partir del neocortex de embriones de ratones C57B16/J (Janvier) que tenían 14 días (E14), se incubaron con 1 µM de cada análogo de la espadina. Las incubaciones se realizaron en un tampón Earle's-Tris-HEPES, a pH 7,4, que contenía 140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl₂, 3,6 mM de MgCl₂ y BSA al 0,1 %.

Las neuronas corticales tratadas con los péptidos G/A-PE(22-28) y G/A-PE(22-28) biotinilado durante distintos periodos (0, 5, 8, 24 y 36 horas) se homogeneizaron en un tampón de Laemmli, y se analizaron utilizando geles de SDS PAGE al 10 %. Las proteínas separadas se transfirieron a continuación de los geles a membranas de nitrocelulosa (VWR, Fontenay-sous-bois, Francia) que se bloquearon con leche desnatada al 5 % o con BSA al 5 %, en PBS, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con anticuerpos dirigidos contra la proteína PSD-95 (Cell Signaling, Ozyme, Montigny-el-Bretonneux, Francia), toda la noche, a 4 °C. Los contenidos en β-actina se determinaron tras la extracción, utilizando una dilución 1/5000 de anticuerpos anti-β-actina (anticuerpo monoclonal de ratones Santa Cruz, dilución 1/5000). Después de 4 lavados en PBS-Tween al 0,1 %, se incubaron anticuerpos secundarios antirratón y anticonejo, conjugados a HRP (Amersham Biosciences, Orsay, Francia; 1/10000) durante 1 hora, a temperatura ambiente. Las proteínas se detectaron con los reactivos de detección ECL Plus (Amersham Biosciences), utilizando el sistema de obtención de imágenes LAS-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Alemania). Las intensidades relativas de cada banda marcada se analizaron mediante barrido densitométrico, utilizando el software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, EE. UU.). La activación de las proteínas se normalizó utilizando la β-actina total, como se indica.

Los resultados presentados en la Figura 6 muestran que los análogos de la espadina aumentaron rápidamente la sinaptogénesis. Las neuronas corticales tratadas con los análogos de espadina G/A-PE(22-28) o G/A-PE(22-28) biotinilado (1 µM), muestran un aumento de la expresión de la proteína sináptica PSD-95 observable después de 24 horas y, de forma más intensa, después de 36 horas. Cabe señalar que a excepción de una ligera bajada durante las 5 primeras horas, los tratamientos con los análogos de la espadina aumentan continuamente la expresión de PSD-95 hasta transcurridas 36 h (Figura 6D). Estos aumentos son superiores al aumento obtenido en las mismas condiciones para el péptido PE (22-28) no modificado. Estos resultados muestran que los análogos de espadina G/A-PE(22-28) o G/A-PE(22-28) biotinilado, aumentan la neurogénesis de manera más fuerte que el péptido PE(22-28), pero también de manera más fuerte la sinaptogénesis, indicando que el destino de la mayoría de las células neoformadas es generar neuronas maduras.

Lista de referencias

[1] Wong, M. & Licinio, J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.* 2, 343-351 (2001).

[2] Moller HJ. Suicide, suicidality and suicide prevention in affective disorders. *Acta Psychiatr Scand*; 418 (suppl): 73-80 (2003).

[3] Nestler, E., y col. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25 (2002).

[4] Baghai TC, Volz HP, Moller HJ. Drug treatment of depression in the 2000s: An overview of achievements in the last 10 years and future possibilities. *World J Biol Psychiatry*; 7(4):198-222 (2006).

[5] Weilburg JB. An overview of SSRI and SNRI therapies for depression. *Manag Care.* Jun; 13 (6 Suppl Depression): 25-337 (2004).

[6] Manji HK, Gottesman II, Gould TD. Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases. *Sci STKE*; 207: p. 49 (2003).

[7] Reus VI, Wolkowitz OM. Antigluocorticoid drugs in the treatment of depression. *Expert Opin Investig Drugs*; 10: 1789-96 (2001).

[8] Griebel G, Simiand J, Steinberg R, y col. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3- fluoro-4- methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3- thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *J Pharmacol Exp Ther*; 301: 333-45 (2002).

[9] Kramer MS, Cutler N, Feighner J, y col. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*; 281: 1640-1645 (1998).

[10] Skolnick P. Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol*; 375: 31-40 (1999).

[11] Kempermann G, Kronenberg G. Depressed new neurons. Adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry*; 54: 499-503 (2003).

[12] Malberg JE, Schechter LE. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs. *Curr Pharm Des*; 11: 145-155 (2005)

[13] Duman, R. & Monteggia, L. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* (9, 1116-1127 (2006).

- [14] Henn FA, Vollmayr B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biol Psychiatry*; 56: 146-50. (2004).
- [15] Perlis, R. H., Moorjani, P., Fagerness, J., Purcell, S., Trivedi, M. H., Fava, M., Rush, A. J., Smoller, J. W. Pharmacogenetic Analysis of Genes Implicated in Rodent Models of Antidepressant Response: Association of TREK1 and Treatment Resistance in the STAR(*)D Study. *Neuropsychopharmacology*. Nov; 33(12):2810-9 (2008)
- 5 [16] Jean Mazella, Olivier Petrault, Marc Borsotto, Catherine Heurteaux, Catherine Widmann Peptide dérivé du récepteur 3 de la neurotensine et utilisation dans le traitement de maladies psychiatriques. WO2009103898 A1; PCT/FR2008/001784, fecha de publicación 27 de agosto de 2009
- [17] H. Moha ou Maati, J. Veyssiere, F. Labbal, T. Coppola, C. Gandin, C. Widmann, J. Mazella, C. Heurteaux, M. Borsotto. Spadin as a new antidepressant: absence of side effects on TREK-1 controlled functions. *Neuropharmacology*. Enero de 2012; 62(1):278-88. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.019. Epub 22 de julio de 2011.
- 10 [18] C. Devader, A. Khayachi, J. Veyssi re, H. Moha o Maati, M. Roulot, S. Moreno, M. Borsotto, S Martin, C. Heurteaux and J. Mazella. In vitro and in vivo regulation of synaptogenesis by novel antidepressant spadin. *British Journal of Pharmacology*. Mayo de 2015; 172(10):2604-17. doi: 10.1111/bph.13083. Epub 24 de marzo de 2015.
- 15 [19] Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, No l J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J*. 7 de junio de 2006; 25(11):2368-76.
- [20] Krieger DE, Erickson BW, Merrifield RB. Affinity purification of synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. Septiembre de 1976; 73(9):3160-4.
- 20 [21] Moha o Maati, H., Peyronnet, R., Devader, C., Veyssiere, J., Labbal, F., Gandin, C., Mazella, J., Heurteaux, C., Borsotto, M.A. human TREK-1/HEK cell line: a highly efficient screening tool for drug development in neurological diseases. *PLoS One*. 2011; 6(10):e25602. doi: 10.1371/journal.pone.0025602. Epub 14 de octubre de 2011. (2011).
- [22] Nestler, E.J. y col. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry*. 15, 503-528 (2002).
- 25 [23] Cryan, J. & Holmes, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. 4, 775-790 (2005).
- [24] Seligman y Beagley, Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88, 534-541. (1975).
- [25] Beauquis, J. y col. Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur J Neurosci* 23, 1539-1546. (2006)
- 30 [26] Brewer y Torricelli JR. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat Protoc.*; 2(6):1490-8. (2007).
- [27] Hivelin C, B raud-Dufour S, Devader C, Abderrahmani A, Moreno S, Moha Ou Maati H, Djillani A, Heurteaux C, Borsotto M, Mazella J, Coppola T.(2016) Potentiation of Calcium Influx and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cell by the Specific TREK-1 Blocker Spadin. *J Diabetes Res*. 2016; 2016:3142175. doi: 10.1155/2016/3142175).
- 35

REIVINDICACIONES

1. Péptido derivado del propéptido (PE) del receptor 3 de la neurotensina (NTSR3) seleccionado de entre el péptido PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3 biotinilada, el péptido PI-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 6 (PIGVSWGLR), el péptido PI-PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 6 biotinilada, el péptido G/A-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 7 (AVSWGLR), correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde la glicina en la posición 22 se sustituyó por una alanina, el péptido G/A-PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 7 biotinilada, el péptido dansil-PE(22-28), correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde se añadió un grupo químico dansilo en el extremo N-terminal, y los péptidos O-metil-PE(22-28) y O-etil-PE(22-28), correspondientes a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde se añadió un grupo químico O-metil y O-etil en el extremo C-terminal, respectivamente.
2. Secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido que consiste en: el péptido PI-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 6 (PIGVSWGLR), el péptido PI-PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 6 biotinilada, el péptido G/A-PE(22-28) de secuencia SEQ ID NO: 7 (AVSWGLR), correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 3, en donde la glicina en la posición 22 se sustituyó por una alanina, el péptido G/A-PE(22-28) biotinilado, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 7 biotinilada.
3. Vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 2.
4. Célula huésped que comprende un péptido según la reivindicación 1, y/o una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 2, y/o un vector según la reivindicación 3.
5. Método de producción de un péptido como se define en la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas:
 - transfectar una célula huésped con un ácido nucleico según la reivindicación 2, o transformar una célula huésped con un vector según la reivindicación 3;
 - cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la expresión de dicho péptido; y
 - recuperar dicho péptido.
6. Péptido según la reivindicación 1, para su uso como medicamento.
7. Péptido para su uso según la reivindicación 6, donde dicho medicamento es un antidepresivo.
8. Péptido según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la depresión.
9. Péptido según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la diabetes o del cáncer.
10. Péptido según la reivindicación 1, para su uso en la neuroprotección frente a la epilepsia o al accidente cerebrovascular.

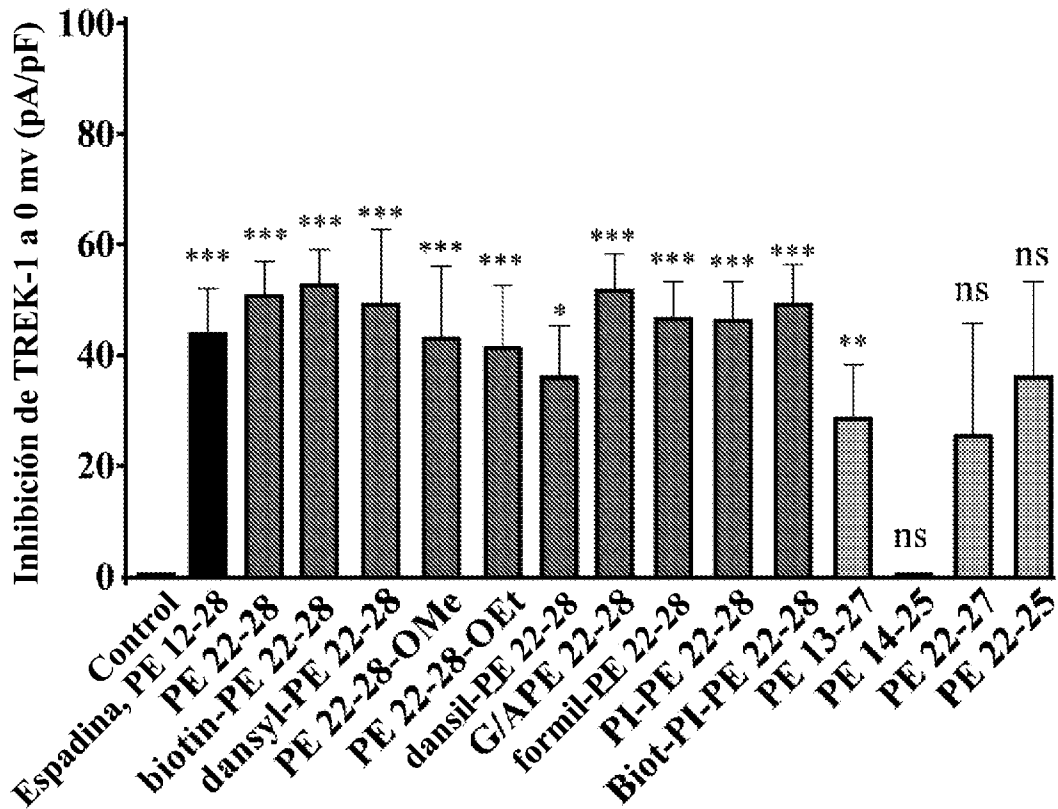


Figura 1

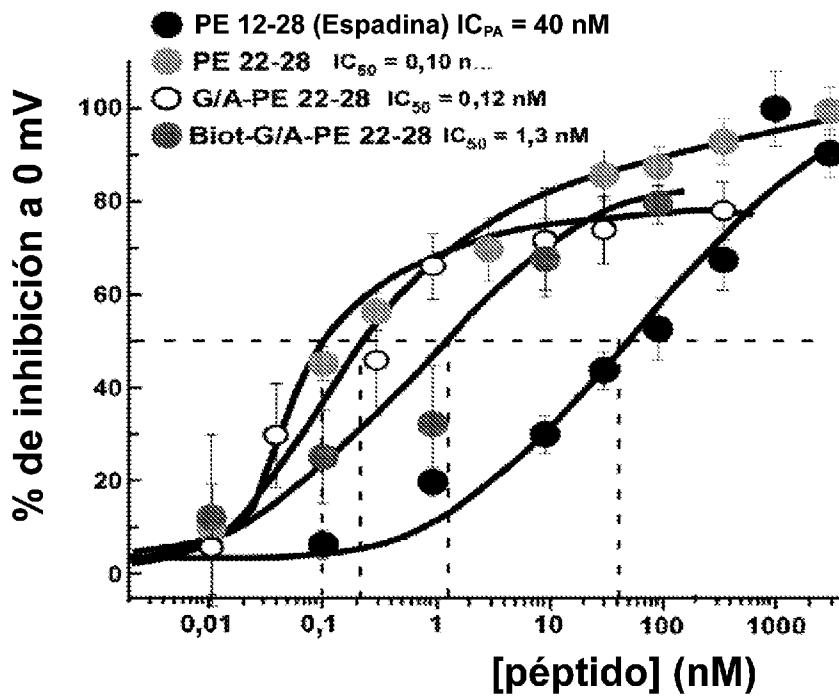


Figura 2

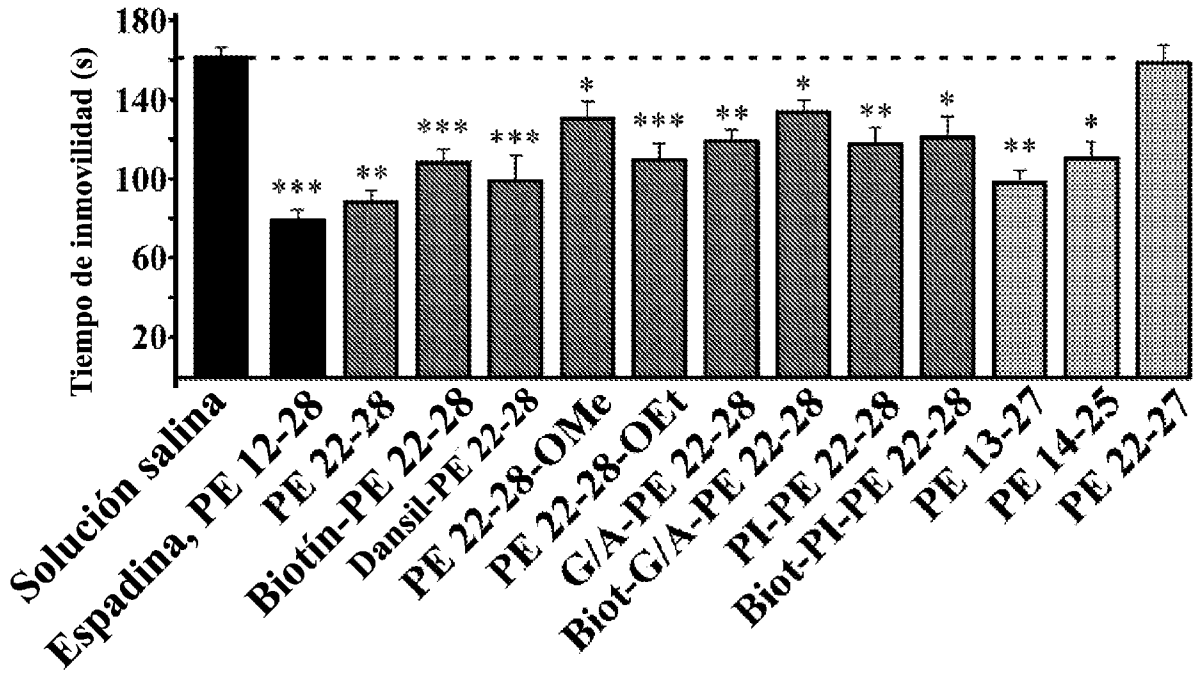


Figura 3

Prueba de indefensión aprendida

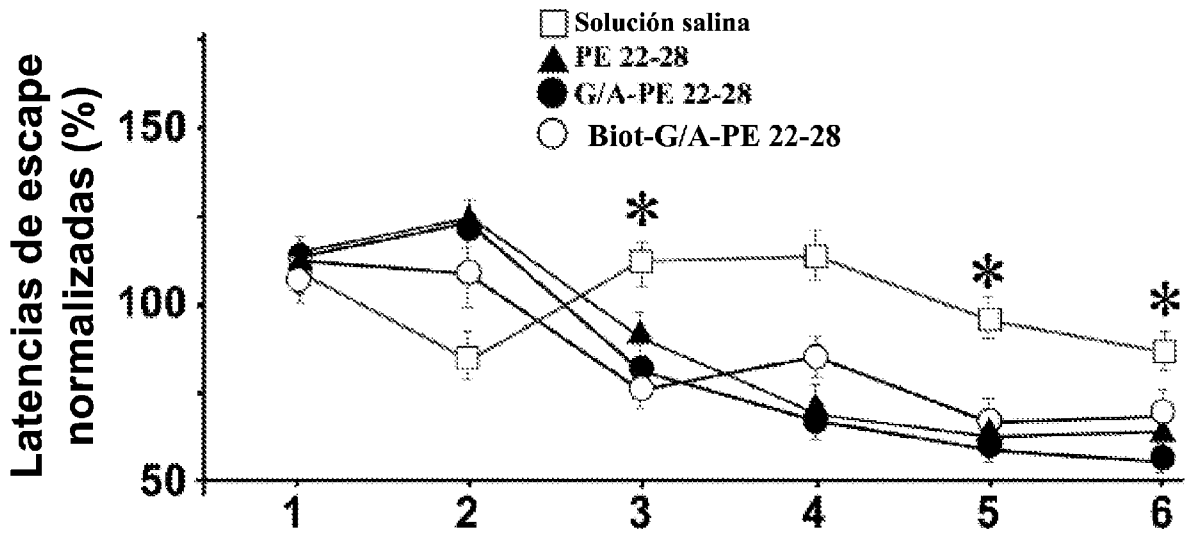


Figura 4

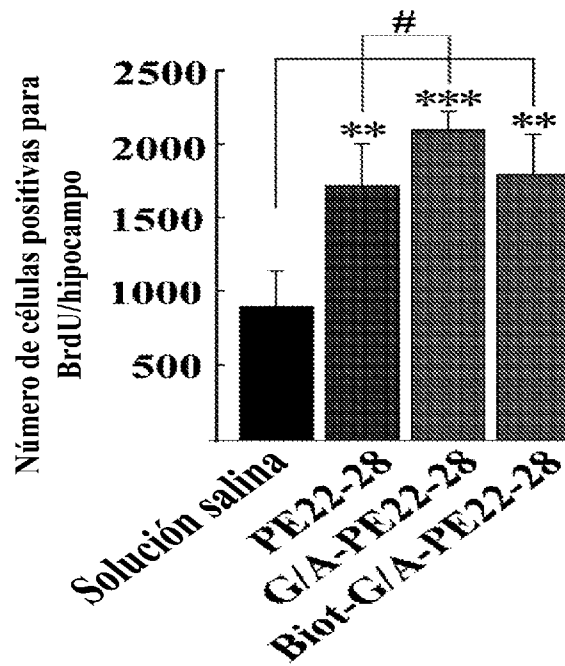


Figura 5

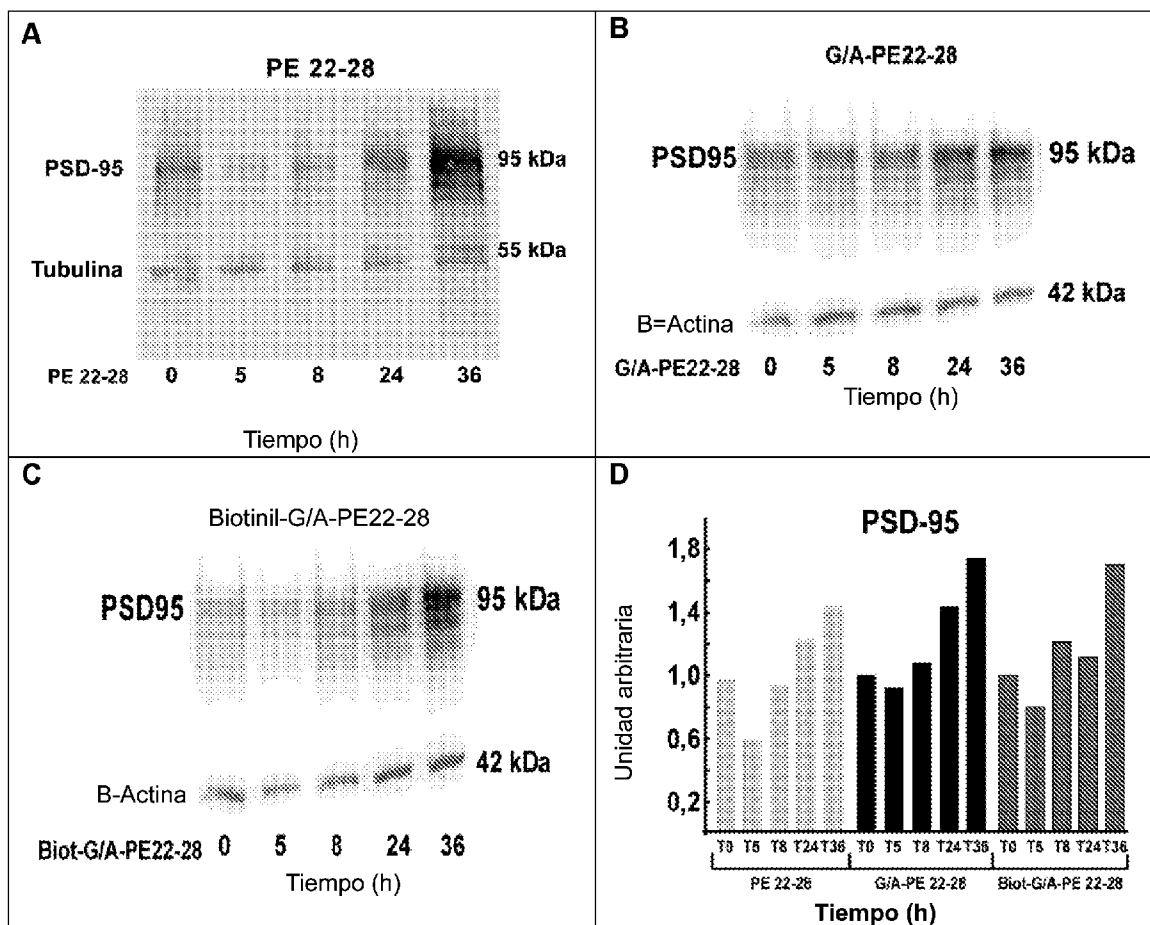
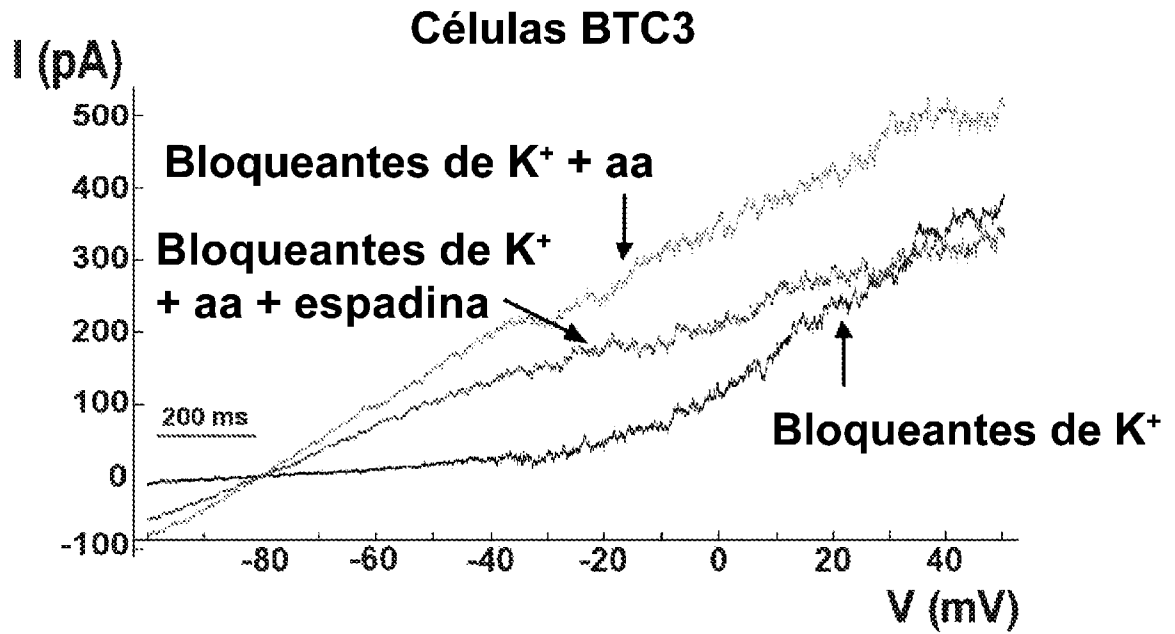
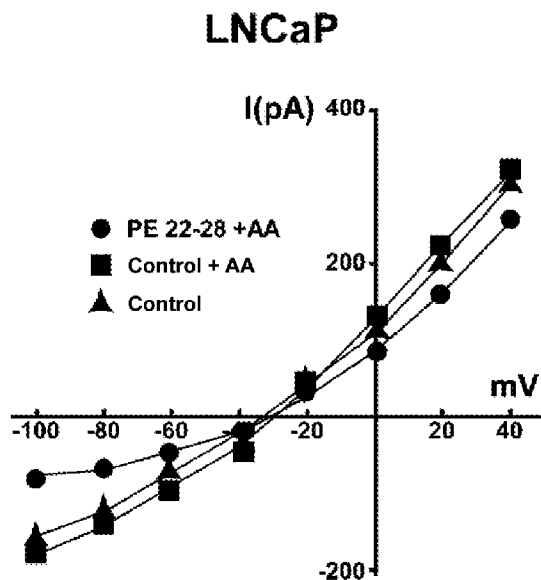


Figura 6

A



B



C

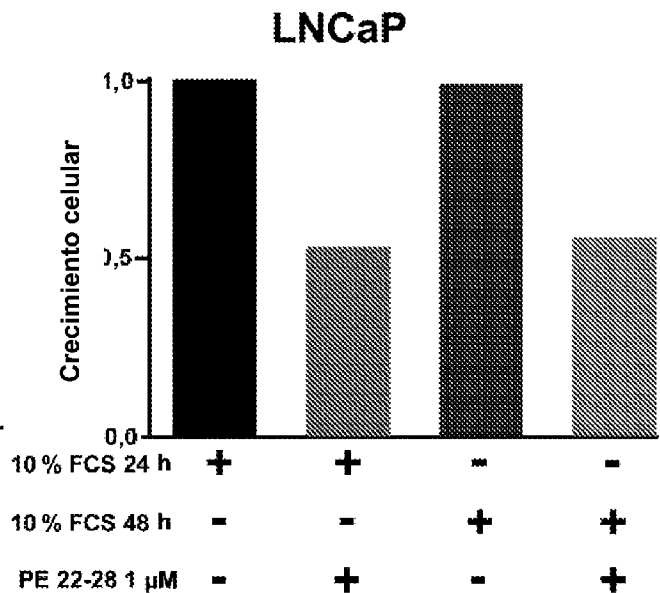


Figura 7