

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 542**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

A61K 38/45 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2018** **PCT/GB2018/053384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2019** **WO19102201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2018** **E 18811628 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 3697808**

54 Título: **Péptido neuroprotector**

30 Prioridad:

24.11.2017 GB 201719520

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.05.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS
LTD (100.0%)
30-36 Newport Road, Cardiff
South Glamorgan CF24 0DE, GB**

72 Inventor/es:

**BRAMBILLA, RICCARDO;
FASANO, STEFANIA;
INDRIGO, MARZIA y
PAPALE, ALESSANDRO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 969 542 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

Péptido neuroprotector

5 Campo de la invención

La invención se refiere a inhibidores de MAPK3 (ERK1 MAP quinasa), en particular a polipéptidos que tienen la capacidad de estimular la vía de señalización global de ERK en el cerebro y su uso como agentes neuroprotectores y/o potenciadores cognitivos. La invención también se refiere a polinucleótidos, vectores, células huésped y composiciones farmacéuticas relacionadas capaces de inhibir MAPK3, provocando la estimulación de la vía de señalización global ERK. Además, también se divulga el uso de los inhibidores o estimuladores anteriores en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos o neuropsiquiátricos y deterioro cognitivo.

15 Antecedentes de la invención

La cascada de quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) es una vía de señalización involucrada en una variedad de procesos celulares, desde la proliferación y supervivencia celular hasta la diferenciación y la plasticidad del comportamiento. En el cerebro, esta cascada proporciona un vínculo entre los receptores ionotrópicos, metabotrópicos y de neurotrofina con los eventos citosólicos (regulación de los canales iónicos y de la traducción de proteínas) y nucleares, lo que conduce a la transcripción de genes, síntesis de proteínas de novo y cambios ya sea en la remodelación y plasticidad sináptica, la formación de memoria o la supervivencia neuronal, de acuerdo con el contexto. Una vez activadas por los receptores de neurotransmisores a través de factores de intercambio GTP/GDP, las pequeñas GTPasas pertenecientes a la clase Ras (productos de los genes p21 H-, K- y N-Ras) estimulan secuencialmente la cascada de proteínas quinasas formadas por quinasas serina/treonina de la subfamilia Raf. (principalmente c-Raf y B-Raf, el nivel quinasa quinasa MAPK), las quinasas de especificidad dual treonina/tirosina MEK1/2 (quinasa MAPK) y finalmente las proteínas ERK1/2 (el componente MAPK). Más específicamente, la activación de MEK1/2 conduce a una interacción selectiva con proteínas ERK a través de dominios de acoplamiento específicos que resultan en la fosforilación del motivo de reconocimiento conservado de treonina y tirosina (dominio TEY), dentro del bucle de activación de ERK1/2.

ERK1 y ERK2, también conocidos como MAPK3 y MAPK1, respectivamente, son isoformas homólogas producidas por dos genes, MAPK3 y MAPK1. ERK1 y ERK 2 comparten casi el 85 % de identidad de aminoácidos, pero exhiben una mayor identidad en las regiones centrales. Ambas isoformas se expresan esencialmente en todas las células, aunque ERK2 es la isoforma predominante en el cerebro y las células hematopoyéticas. Una vez activadas, ERK1 y ERK2, las dos MAPK principales del cerebro, pueden trasladarse al núcleo. Allí, pueden activar directa o indirectamente (a través de las quinasas de la familia RSK), factores de transcripción como la clase de reguladores transcripcionales similares a CREB, o regular la remodelación de la cromatina (a través de las quinasas de la familia MSK). Se considera que la capacidad de ERK para regular la expresión genética y la organización de la cromatina es un paso crucial no sólo en los procesos de adaptación neuronal que subyacen a los procesos cognitivos normales, sino también en la aparición de varios trastornos neuropsiquiátricos.

Aparentemente está bien establecido un papel permisivo crucial para la señalización dependiente de ERK en la formación y consolidación de la memoria. Sin embargo, los primeros hallazgos se han basado esencialmente en el uso de inhibidores químicos de las quinasas MEK, que afectan indirectamente a ERK1 y ERK2 en el cerebro, lo que provoca déficits de memoria en una variedad de tareas de aprendizaje. Desafortunadamente, la posibilidad de que una activación general de la expresión génica mediada por ERK y la remodelación de la cromatina en el cerebro adulto pueda resultar efectivamente en una mejora cognitiva aún no se ha demostrado, lo que impide el desarrollo de tratamientos efectivos para la memoria y los trastornos neurodegenerativos. Al mismo tiempo, se dispone de pruebas contradictorias que respaldan una actividad prosupervivencia de la señalización de ERK en el cerebro o un papel proapoptótico.

El deterioro cognitivo es una característica importante de la mayoría de los trastornos neurodegenerativos. Desafortunadamente, si bien los tratamientos destinados a mejorar las funciones de la memoria en los pacientes no necesariamente retrasan el proceso degenerativo, un enfoque neuroprotector puede no ser suficiente para preservar o restaurar la plasticidad conductual observada en individuos sanos.

Todavía existe una gran necesidad médica insatisfecha con un potencial comercial sustancial de un producto eficaz para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y su deterioro cognitivo irreversible asociado. Ejemplos de tales trastornos son la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington, en las que una pérdida progresiva de la población de células neuronales conduce a funciones cerebrales deterioradas, déficits de aprendizaje y memoria y, en última instancia, a la muerte.

En la presente invención se descubrió sorprendentemente que los péptidos derivados del dominio terminal N de ERK1 pueden lograr la activación selectiva de la señalización nuclear de ERK, mediante la inhibición de la proteína quinasa MAPK3 en el citoplasma. Los péptidos de la invención pueden estimular específicamente la translocación nuclear de ERK y así estimular la transcripción de genes mediada por ERK y la remodelación de la cromatina en el cerebro. La

administración de estos péptidos promueve la señalización nuclear dependiente de ERK en respuesta al glutamato; disminuye la muerte neuronal, mejora la consolidación de la memoria y mejora la adquisición y formación de la memoria. Así, mediante la administración de estos péptidos hemos demostrado que se puede i) mejorar la memoria en individuos sanos (mejora cognitiva), ii) prevenir la neurodegeneración, como la observada en las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington y iii) retrasar el deterioro de la memoria, por ejemplo, como se observa en formas de demencia y enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, se propone que los péptidos de la invención muestren efectos positivos tanto en la supervivencia de las células neuronales como en la cognición y representen una terapia para una serie de trastornos cerebrales importantes, actualmente sin tratamiento eficaz, mejorando los déficits cognitivos y bloqueando la neurodegeneración. Además, dado que los péptidos de la invención mejoran la cognición en ausencia de neurodegeneración, son adecuados para la mejora cognitiva en individuos sanos.

Declaraciones de invención

La presente invención, en sus diversos aspectos, es tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRTTEGVGPVGPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominado RB5; o

ii) una secuencia que tiene al menos un 96 % de identidad con el péptido i).

MAPK3 se refiere a la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3), una enzima que en los humanos está codificada por el gen MAPK3. La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de las MAP quinasas. Las MAP quinasas, también conocidas como quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), actúan en una cascada de señalización que regula diversos procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la progresión del ciclo celular en respuesta a una variedad de señales extracelulares. Esta quinasa es activada por quinasas anteriores, lo que resulta en su translocación al núcleo donde fosforila objetivos nucleares. Se han descrito variantes de transcritos empalmados que codifican diferentes isoformas de proteínas. MAPK3 tiene varios sinónimos, a saber, ERK-1; ERK1; ERT2; HS44KDAP; HUMKER1A; P44ERK1; P44MAPK; PRKM3; p44-ERK1; p44-MAPK.

El péptido de la presente invención provoca la estimulación de la señalización ERK global en el núcleo. Por "señalización global de ERK" se entiende la actividad mejorada de MAPK1/ERK2, las principales isoformas de ERK que gobiernan los mecanismos de señalización asociados con esta vía.

El experto apreciará que los homólogos, ortólogos o derivados funcionales del péptido también encontrarán uso en el contexto de la presente invención. Así, por ejemplo, la presente invención abarca péptidos que incluyen una o más adiciones, eliminaciones, sustituciones o similares. Además, puede ser posible sustituir un aminoácido por otro de "tipo" similar. Por ejemplo, se puede reemplazar un aminoácido hidrófobo por otro utilizando un programa como el programa CLUSTAL para comparar secuencias de aminoácidos. Este programa compara secuencias de aminoácidos y encuentra la alineación óptima insertando espacios en cualquiera de las secuencias según corresponda. Es posible calcular la identidad o similitud de los aminoácidos (identidad significa conservación del tipo de aminoácido) para una alineación óptima. Un programa como BLASTx alineará el tramo más largo de secuencias similares y asignará un valor al ajuste. De esta manera es posible obtener una comparación donde se encuentran varias regiones de similitud, cada una con una puntuación diferente. Ambos tipos de análisis están contemplados en la presente invención.

Las variantes alélicas se refieren a variantes de péptidos en la misma especie, los péptidos ortólogos de la invención se refieren a variantes en diferentes especies. Ejemplos de ortólogos son MAPK3 de ratón (NP_036082.1), *Rattus norvegicus* MAPK3 (NP_059043.1), *Canis lupus familiaris* MAPK3 (NP_001238964.1) *Danio rerio* MAPK3 (NP_958915.1) *Salmo salar* MAPK3 (NP_001167267.1), *Pongo abelii* MAPK3 isoforma 1 (XP_002826343.1), *Papio anubis* MAPK3 isoforma 1 (XP_003916792.1), *Tursiops truncatus* MAPK3 isoforma 1 (XP_004316634.1), *Callithrix jacchus* MAPK3 (XP_002807461.1), *Bos taurus* MAPK3 isoforma X1 (XP_005224976.1), *Otolemur garnettii* MAPK3 (XP_003795827.1), *Odobenus rosmarus divergens* MAPK3 isoforma 1 (XP_004397229.1), *Vicugna pacos* MAPK3 isoforma X1 (XP_006201318.1), *Cavia porcellus* MAPK3 (XP_003478275.1), *Heterocephalus glaber* MAPK3 (XP_004856331.1), *Dasypus novemcinctus* tipo MAPK3 (XP_004461533.1), *Leptonychotes weddellii* MAPK3 (XP_006750264.1), *Equus caballus* MAPK3 (XP_001915560.1), *Trichechus manatus latirostris* MAPK3 isoforma 1 (XP_004386681.1), *Ceratotherium simum* MAPK3 (XP_004439579.1), *Microtus ochrogaster* MAPK3 (XP_005351990.1), *Mustela putorius furo* MAPK3, XP_004774094.1, XP_004816989.1), *Chinchilla lanigera* MAPK3 (XP_005405403.1), *Pan troglodytes* MAPK3 (XP_510921.3), *Octodon degus* MAPK3 isoforma X1 (XP_004622998.1), *Monodelphis domestica* MAPK3 (XP_001364363.1) *Pantholops hodgsonii* MAPK3 (XP_005963252.1), *Pongo abelii* MAPK3 isoforma 2 (XP_003778644.1), *Papio anubis* MAPK3 isoforma 2 (XP_003916793.1), *Tursiops truncatus* MAPK3 isoforma 2 (XP_004316635.1), *Vicugna pacos* MAPK3 isoforma X2 (XP_006201319.1), *Xiphophorus maculatus* tipo MAPK1 (XP_005813410.1), *Takifugu rubripes* tipo MAPK1 (XP_003975118.1), *Trichechus manatus latirostris* MAPK3 isoforma 2 (XP_004386682.1), *Odobenus rosmarus divergens* MAPK3 isoforma 2 (XP_004397230.1), *Latimeria chalumnae* tipo MAPK3 (XP_006005975.1).

El término "homólogo/homólogo" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de aminoácidos que tienen una secuencia con al menos un 96 % de homología o similitud o identidad con/con la secuencia de aminoácidos de QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) y que conservan la actividad biológica o función inhibidora de MAPK3 de QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1). Se prefiere que los péptidos tengan al menos un 96 % de identidad con la secuencia peptídica de i), y en orden creciente de preferencia, al menos un 97 %, 98 % o 99 % de identidad con QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1).

En otra realización preferida más del primer aspecto de la invención, dicho péptido consiste en la secuencia QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1).

En una realización preferida adicional de la invención, dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico con el fin de transportar dicho péptido seleccionado a través de una membrana, típicamente, pero no exclusivamente, una membrana biológica. Ventajosamente, en esta disposición el soporte peptídico permite el paso a través de la barrera sanguínea cerebral y/o a través de las membranas plasmáticas de las células neuronales. Por tanto, el péptido puede administrarse a las células, en particular a las células del cerebro.

Como apreciarán los expertos en la técnica, dicha membrana biológica puede ser la membrana que rodea una célula. Esto puede incluir, entre otras, membranas tales como la membrana plasmática simple o estructuras de membrana más especializadas que incluyen membranas apicales, basolaterales, presinápticas y postsinápticas, membranas de flagelos, cilios, microvellosidades, filopodios y lamellipodios, el sarcolema de las células musculares, así como mielina especializada y membranas dendríticas de las neuronas. Además, o alternativamente, dicha membrana puede ser la de un orgánulo ubicado dentro de la célula, permitiendo la entrega del péptido a un compartimento celular interno específico. Esto puede incluir orgánulos tales como, entre otros, endosoma; retículo endoplasmático liso y rugoso; retículo sarcoplásmico; aparato de Golgi; lisosoma; mitocondria (membranas internas y externas); núcleo (membranas interna y externa); peroxisoma; vacuola; gránulos citoplasmáticos; vesículas celulares (fagosoma, autofagosoma, vesículas recubiertas de clatrina, vesículas recubiertas de COPI y vesículas recubiertas de COPII) y vesículas secretoras.

Adicionalmente, dicha membrana biológica incluye referencia a cualquier membrana de origen Eucariota o Procariota.

Idealmente, dicho péptido neuroprotector está unido a dicho portador peptídico en su terminal amino o carboxi.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, dicho péptido neuroprotector seleccionado se une inmediatamente al lado o a los residuos de aminoácidos de dicho portador peptídico. Alternativamente, dicho péptido neuroprotector seleccionado se localiza distalmente desde los residuos de aminoácidos de dicho portador peptídico debido a la presencia de al menos un residuo de aminoácido adicional o un espaciador preferiblemente representado por un número de residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que comprende o consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 residuos de aminoácidos. Como apreciarán los expertos en la técnica, esto puede mejorar la permeabilidad del péptido neuroprotector seleccionado; sin embargo, en el funcionamiento de la invención se pueden usar otros espaciadores que puedan realizar esta función, idealmente pero no exclusivamente con el mismo efecto.

Más preferiblemente, dicho portador peptídico es un péptido penetrante en las células (CPP). La referencia en el presente documento a un CPP se refiere a una secuencia peptídica corta, típicamente de menos de 30 aminoácidos, que posee la capacidad de translocar la membrana plasmática cuando se une con al menos una molécula seleccionada. Por tanto, el uso de un CPP con un péptido de la invención facilita la administración de dicho péptido al interior de una célula o un orgánulo. Los CPP, normalmente, se utilizan para superar la impermeabilidad de las membranas. Actualmente se han descrito en la técnica cientos de secuencias de CPP diferentes y todas tienen una capacidad universal para cruzar o romper membranas biológicas y entrar en las células, ya sea solas o asociadas con una carga. Se conocen en la técnica CPP adecuados tales como, entre otros, VIH-TAT, Penetratina™, secuencias cortas de aminoácidos con una alta densidad de carga básica (+) (comúnmente una cadena de residuos de lisina o arginina, por ejemplo, octarginina), o el péptido Antennapedia. Lo más ideal es que dicho vehículo peptídico sea un CPP seleccionado del grupo que comprende:

GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2);

RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 3);

RRRRRRR (SEQ ID NO: 4);

XRRRRRRRX (SEQ ID NO: 5);

XRRRXRRR (SEQ ID NO: 6);

RRRXRRRX (SEQ ID NO: 7);

RRRRRRRX (SEQ ID NO: 8);

XXRRRRRRR (SEQ ID NO: 9);

RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 10);

XRRRRRXRRRRR (SEQ ID NO: 11);

RRRXRRRRRRRX (SEQ ID NO: 12);

GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 13);

SRRARRSPRHLGSG (SEQ ID NO: 14);

LRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 15);

VKRGLKLRHVRPRVTRMDV (SEQ ID NO: 16) y

RKKRRRESRKKRRRES (SEQ ID NO: 17).

Más preferiblemente, dicho péptido neuroprotector consiste en la secuencia GRKKRRQRRRPPQGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFDV (SEQ ID NO: 18) denominada en adelante CPP-RB5.

De acuerdo con todavía un segundo aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dicho ácido nucleico se refiere a ARN o ADN, lo más preferiblemente a ADN. Dicho ADN puede ser bicatenario o monocatenario.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención se proporciona un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a un vector de expresión y puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, un vehículo basado en lípidos y vehículos basados en células. Ejemplos de tales vehículos de administración incluyen: microesferas poliméricas biodegradables, formulaciones basadas en lípidos tales como portadores de liposomas, revestimiento de la construcción sobre partículas de oro coloidal, lipopolisacáridos, polipéptidos, polisacáridos, pegilación de vehículos virales, etc. Además, dichos vectores también pueden incluir: adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus vaccinia, virus espumosos, citomegalovirus, virus del bosque de Semliki, poxvirus, pseudorrabia, vector de virus de ARN y vector de virus de ADN. Dichos vectores virales son bien conocidos en la técnica. Además, la invención incluye plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos. Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores adecuados y están disponibles comercialmente. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacteriano: pQE70, pQE60, pQE-9 (QIAGEN), pbs, pDIO, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH1[beta]a, pNH18A, pNH46A (STRATAGENE), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (PHARMACIA). Eucariotas: pWLNCO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG (STRATAGENE), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (PHARMACIA). Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en el huésped. La secuencia de polinucleótidos, preferiblemente la secuencia de ADN en el vector, está unida operativamente a una secuencia o secuencias de control de expresión apropiadas (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar promotores procarióticos o eucariotas tales como CMV inmediato temprano, timidina quinasa de HSV, SV40 temprano y tardío, LTR de retrovirus y metalotioneína-I de ratón. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción y un vector de transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

Además, los vectores contienen preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tales como dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas, o como resistencia a tetraciclina o ampicilina en E. coli.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una célula huésped transformada o transfectada con dicho vector.

Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a células huésped que han sido transducidas, transformadas o transfectadas con el polinucleótido o con el vector descrito anteriormente. Como ejemplos representativos de células huésped apropiadas, se pueden mencionar células bacterianas, tales como E.

coli, Streptomyces, Salmonella typhimurium, células fúngicas tales como levaduras, células de insectos tales como Sf9, células animales tales como CHO o COS, células vegetales, etc. Se considera que la selección de un huésped apropiado está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas del presente documento. Preferiblemente, dicha célula huésped es una célula animal y más preferiblemente una célula humana.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominado RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 %, y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 %, de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica

para uso como medicamento

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominado RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 %, y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 %, de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica.

para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno neurodegenerativo.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 % y preferiblemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 % de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica; o un ácido nucleico que codifica el péptido; o un vector que comprende el ácido nucleico; y

y un vehículo, emoliente, diluyente o adyuvante adecuado.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona una combinación terapéutica para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno neurodegenerativo que comprende un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 % y preferiblemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 % de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica;

y/o composición farmacéutica como se describe en el presente documento y al menos otro agente terapéutico para tratar o prevenir una afección del cerebro.

Dicha terapéutica adicional puede incluir:

- a) potenciadores cognitivos (nootrópicos): metilfenidato, racetámicos, isoflavonas, vitaminas (B, C, D, E), colina, anfetaminas, xantinas, adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, eugeroicos (adrafenilo, armodafinilo, modafinilo), bloqueadores de GABA, AMPA kinas, inhibidores de PDE4 y otros;
- b) agentes neuroprotectores: antagonistas del glutamato, 17 β -estradiol, ginsenosido Rd, progesterona, estatinas, antioxidantes, nicotina, cafeína, inhibidores de caspasa, factores neurotróficos, otros agentes antiapoptóticos; o
- c) analgésicos.

La referencia en el presente documento a un trastorno neurodegenerativo incluye, entre otras, la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias; Enfermedad de Huntington (EH); Enfermedad de Parkinson (EP); enfermedades nerviosas degenerativas; encefalitis; epilepsia; trastornos genéticos del cerebro; malformaciones de la cabeza y el cerebro; hidrocefalia; ataque; esclerosis múltiple; esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig); Demencia frontotemporal (FTP); Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP); Temblor Esencial (TE); Atrofia Sistémica Múltiple (MSA); Degeneración Corticobasal (CBD); Isquemia Cerebral; Enfermedades por almacenamiento lisosomal (LSD). Preferiblemente, el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que comprende: Enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias; y la enfermedad de Huntington (EH); Enfermedad de Parkinson (EP).

La referencia aquí a una "cantidad eficaz" del péptido o una composición que lo comprende es aquella que es suficiente para lograr un efecto biológico deseado, en este caso neuroprotección y/o mejora cognitiva. Se entiende que la dosis efectiva dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento simultáneo, si lo hubiera, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Normalmente, la cantidad eficaz la determinan quienes administran el tratamiento.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 %, y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 %, de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica.

para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno neuropsiquiátrico.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona una combinación terapéutica para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno neuropsiquiátrico que comprende un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominado RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 % y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 % de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido covalentemente o no covalentemente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica y/o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento y al menos otro agente terapéutico para tratar una condición del cerebro.

La referencia en el presente documento a un trastorno neuropsiquiátrico incluye, entre otros, trastorno del espectro autista (TEA), discapacidad intelectual (DI), esquizofrenia, psicosis, manía (también conocida como hipomanía y trastorno bipolar cuando se alterna con depresión), depresión mayor, ansiedad, trastorno de estrés postraumático, trastorno obsesivo-compulsivo.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 % y preferiblemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 % de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un transportador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica para su uso como agente potenciador cognitivo en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o un trastorno neuropsiquiátrico.

Los expertos en la técnica apreciarán que en este aspecto de la invención dicho péptido neuroprotector se usa, no para prevenir o tratar una enfermedad, sino para mejorar, idealmente de forma intermitente pero posiblemente crónica, la capacidad cognitiva. Por tanto, en este contexto la capacidad cognitiva o la mejora cognitiva no se consideran una enfermedad. Por tanto, el péptido neuroprotector puede formularse como un suplemento dietético o como parte de un producto alimenticio, tal como, aunque no exclusivamente, un producto alimenticio saludable.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona una combinación terapéutica para usar en la mejora de la capacidad cognitiva que comprende un péptido para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 % y preferiblemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 % de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica y/o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento y al menos otro agente potenciador cognitivo y/o analgésico.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para mejorar la capacidad cognitiva que comprende administrar una cantidad eficaz del péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominado RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 % y preferiblemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 % de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica y/o una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido y/o vector que comprende el molécula de ácido nucleico y/o composición farmacéutica como se define en el presente documento a un individuo que no sufre neurodegeneración y desea dicha capacidad cognitiva mejorada.

La referencia aquí a la capacidad cognitiva incluye, entre otras, las habilidades cerebrales que uno necesita para llevar a cabo cualquier tarea, desde la más simple hasta la más compleja, como recordar, prestar atención, escuchar, ver, concentrarse, razonar, deliberar, analizar, sentir, comprender. Tienen más que ver con los mecanismos de cómo aprendemos, recordamos, solucionamos problemas y prestamos atención, que con cualquier conocimiento real.

Los compuestos para uso en medicina generalmente se proporcionarán en una composición farmacéutica o veterinaria y, por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido como se define en el presente documento y un vehículo, adyuvante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los excipientes farmacéuticos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo oral, bucal, nasal o bronquial (inhalada), transdérmica o parenteral y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica.

La composición se puede preparar asociando el péptido definido anteriormente con el vehículo. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el péptido con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto. La invención se extiende a métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende llevar un péptido como se define anteriormente junto o asociación con un portador o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

Las formulaciones para administración oral en la presente invención pueden presentarse como: unidades discretas tales como cápsulas, sobres o tabletas, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del agente activo; en forma de polvo o gránulos; como una solución o suspensión del agente activo en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite; o como bolo, etc.

Para composiciones para administración oral (por ejemplo, comprimidos y cápsulas), el término "vehículo aceptable" incluye vehículos tales como excipientes comunes, por ejemplo agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; cargas y vehículos, por ejemplo almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro sódico y ácido algínico; y lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, estearato de glicerol, ácido esteárico, fluido de silicona, ceras de talco, aceites y sílice coloidal. También se pueden utilizar agentes aromatizantes tales como menta, aceite de gaulteria, aromatizantes de cereza y similares. Puede ser deseable añadir un agente colorante para que la forma de dosificación sea fácilmente identificable. Los comprimidos también pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Se puede preparar una tableta mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el péptido en una forma fluida tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden estar recubiertos o ranurados y pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del agente activo.

Otras formulaciones adecuadas para administración oral incluyen pastillas que comprenden el péptido en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el péptido en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el agente activo en un vehículo líquido adecuado.

Para la aplicación tópica a la piel, el péptido se puede convertir en una crema, ungüento, gelatina, solución o suspensión, etc. Las formulaciones de crema o ungüento que se pueden usar para el fármaco son formulaciones convencionales bien conocidas en la técnica, por ejemplo, como descrito en libros de texto estándar de farmacia como la Farmacopea Británica.

Las formulaciones parenterales generalmente serán estériles.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, la palabra "comprende" y variaciones de la misma, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significa "que incluye pero no se limita a" y no excluye otras fracciones, aditivos, componentes, números enteros o etapas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se utiliza el artículo indefinido, se debe entender que la especificación contempla tanto la pluralidad como la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención pueden ser las descritas en relación con cualquiera de los otros aspectos.

Otras características de la presente invención resultarán evidentes a partir de los siguientes ejemplos.

La invención se describirá ahora a modo de ejemplo únicamente con referencia a los ejemplos siguientes y a las siguientes figuras en las que:

Figura 1. RB5 estimula selectivamente la señalización nuclear ERK

a) El péptido RB5 promovió selectivamente la activación de ERK2. Se analizaron cortes estriatales agudos, ya sea pretratados con Scramble (SCR) o péptido RB5 (50 μ m) y luego estimulados durante 10 minutos con glutamato (GLU) (100 μ m) o vehículo, en transferencia Western (panel izquierdo) y sondeados con anticuerpos anti fosfo ERK (p44^{ERK1} y p42^{ERK2}) y anticuerpo anti ERK1/2. Se utilizó GAPDH como control de carga. (Panel derecho) Las cuantificaciones demuestran que pERK1 aumentó igualmente en los cortes tratados con SCR y RB5. En particular, la activación de ERK2 es significativamente mayor en la muestra tratada con RB5 en comparación con los cortes de SCR. No se detectaron cambios en los niveles totales de ERK1 y ERK2. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM (n = 4). b-c) RB5 mejoró selectivamente la señalización nuclear en respuesta al glutamato, asemejándose al mismo fenotipo encontrado en las células ERK1 KO. b) La inmunofluorescencia anti-fosfo (Ser10)-acetil(Lys14)-histona-H3 (verde) y anti-NeuN (rojo) en cortes agudos pretratados con péptido CPP-SCR o CPP-RB5 (50 μ m) y estimulados con El glutamato (100 μ m) mostró una activación masiva del sustrato de MAPK intranuclear debido al péptido CPP-RB5 (media $\pm$ EEM, n = 15). La inmunofluorescencia de la proteína ribosómica

anti-fosfo-S6 (Thr235/236) (verde) y anti-NeuN (rojo) mostraron que el péptido CPP-RB5 no tuvo efecto sobre el sustrato de MAPK citosólico (media $\pm$ EEM, $n = 15$). c) Se encontraron los mismos efectos usando cortes de ratones ERK1 KO y sus controles WT tratados con glutamato (media $\pm$ EEM, $n = 13$). d-l) CPP-RB5 promueve activamente la señalización nuclear después de una sola inyección en vivo. Los ratones a los que se les inyectó una dosis única de péptidos CPP-SCR o CPP-RB5 (20 mg/kg, i.p.) se perfundieron rápidamente 1 hora después y los cerebros se diseccionaron y analizaron adicionalmente para IHC e inmunofluorescencia. Fotomicrografías representativas de la expresión de pERK1/2, pMSK, pACh3, pELK1 y c-Fos en el cuerpo estriado. El péptido RB5 mejoró la fosforilación de ERK estriatal (d) y promovió una activación selectiva de la señalización y la transcripción de genes dependientes de ERK nuclear (pMSK, pACh3, pELK, c-Fos (eh)). Por el contrario, RB5 no influyó en la fosforilación de los marcadores citoplasmáticos (pMEK-1, pVGK+, pS6). m-o) una sola administración de RB5 indujo una activación significativa de pERK y pACh3 en ratones ERK1 WT, mientras que este efecto no alcanzó la significación estadística en ratones ERK1 KO, lo que sugiere que RB5 actúa como un inhibidor de ERK1. Como control adicional demostramos que la fosforilación de S6 era comparable en ambos genotipos, lo que confirma que RB5 activa preferentemente la señalización nuclear. Comparación post hoc ANOVA de Bonferroni de dos vías: una estrella negra, $p < 0.05$, dos estrellas negras, $p < 0.01$, una estrella blanca, $p < 0.001$. p) Curva de respuesta de dosis del péptido RB5 para la activación de ERK. Se prepararon cortes del cuerpo estriado de 200 μm de espesor a partir de ratones de 2 meses de edad y se transfirieron a una cámara de perfusión durante 1 hora a 32 °C. Los cortes se trataron previamente con diferentes dosis de RB5 o control revuelto. Después de 1 h, los cortes de cada dosis se fijaron en PFA al 4 % durante 15 min. Se procesaron criosecciones de 18 μm para inmunohistoquímica con MAP quinasa anti-fosfo p44/p42. La cuantificación neuronal se realizó con el software ImageJ contando el número de células positivas para fosfo-ERK en cada corte. El nivel de activación se expresa en el eje Y como unidades arbitrarias (AU). Las dosis se informan en una escala logarítmica (Log10) en el eje X. La CE50 se calculó utilizando el software GraphPad Prism. RB5 fue eficaz para mejorar pERK con una CE50 de 3.4 μm .

Figura 2. Estudios de evolución temporal y respuesta de dosis de RB5 sobre la activación de ERK.

a) A ratones de tipo silvestre ($n = 5$ cada grupo) se les inyectó RB5 (20 mg/kg, ip) o péptido inactivo codificado (SCR, 20 mg/kg, ip). Los ratones inyectados con RB5 fueron perfundidos en diferentes momentos, mientras que los ratones inyectados con mezcla fueron perfundidos después de 1 hora. El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo contra la fosfo-p44/p42 MAP quinasa (Thr202/Tyr204). La cuantificación de células fosfo-ERK positivas en el cuerpo estriado dorsal muestra que los niveles de fosfo-ERK aumentaron significativamente hasta 6 horas después de la inyección de RB5 y regresaron a los niveles basales después de 12 horas. ANOVA unidireccional $F_{5,29} = 9.137$, $p < 0.0001$. Prueba post-hoc de Bonferroni, SCR vs RB5 1h: $p < 0.001$, SCR vs RB5 6h: $p < 0.001$. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. b) A ratones de tipo silvestre ($n = 5$ cada grupo) se les inyectaron sistémicamente diferentes dosis de RB5 o 20 mg/kg de péptido inactivo codificado (SCR) y se les perfundió 1 hora después. El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo contra la fosfo-p44/p42 MAP quinasa (Thr202/Tyr204). La cuantificación de células positivas para fosfo-ERK en el cuerpo estriado dorsal muestra que RB5 activa ERK de manera dependiente de la dosis. ANOVA unidireccional: $F_{5,29} = 7.097$, $p < 0.001$. Prueba post-hoc de Bonferroni, SCR vs RB5 20 mg/kg: $p < 0.05$, SCR vs RB5 10 mg/kg: $p < 0.01$. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. c) Niveles cerebrales de RB5 medidos con espectrometría de masas a diferentes horas después de una única administración ip de 20 mg/kg. Se detectaron niveles altos de RB5 hasta 6 horas (ANOVA unidireccional, $F_{4,18} = 17.469$, $P < 0.0001$, post-hoc de Bonferroni, SCR vs RB5 1 h $P < 0.01$, SCR vs RB5 3 h $P < 0.0001$, SCR vs RB5 6 h $P < 0.05$). Los resultados muestran media $\pm$ eem. Estrella blanca $P < 0.0001$, $\square\square\square P < 0.001$, $\square\square P < 0.01$, $\square P < 0.05$.

Figura 3. RB5 atenuó la muerte de células neuronales en cultivos embrionarios del cuerpo estriado

Se expusieron cultivos de embriones neuronales estriados (E17) durante 7 días a medio que contenía péptido Scramble o RB5 (dos concentraciones finales de 20 μm o 50 μm). a) Micrografías representativas que muestran el etiquetado TUNEL de neuronas estriales. b) La cuantificación de núcleos apoptóticos teñidos en oscuridad mostró una reducción significativa de los niveles de apoptosis en cultivos tratados con dosis más altas de RB5 ($p < 0.01$). Los datos se expresan como Media $\pm$ EEM, $n = 5$. Comparación post-hoc ANOVA de Bonferroni bidireccional $**p < 0.01$.

Figura 4. RB5 atenuó la muerte de células neuronales en un modelo farmacológico de ratón (ácido 3-nitropropiónico; 3-NP) de la enfermedad de Huntington

a) Tinción TUNEL del cuerpo estriado de ratones C57BL/6 inyectados dos veces al día con péptidos Scramble o RB5 (20 mg/kg, ip) y una vez con solución salina o 3-NP (50 mg/kg, ip) durante 7 días consecutivos. b) Los ratones cotratados con péptido RB5 y 3-NP mostraron una reducción significativa de los niveles de apoptosis en comparación con los ratones cotratados con péptido Scramble y 3-NP. Es importante destacar que esta reducción se asemejó a la condición fisiológica (RB5 3-NP frente a RB5 Saline $p = 0.85$). Media $\pm$ EEM, $n = 10$ cada grupo experimental). Comparación post-hoc ANOVA de Bonferroni bidireccional $***p < 0.001$ $****p < 0.0001$. c) Inmunofluorescencia de caspasa-3 en el cuerpo estriado de ratones cotratados con Scramble o péptido RB5 (20 mg/kg, ip, dos veces al día) y con solución salina o 3-NP (50 mg/kg, ip, una vez al día) durante 7 días consecutivos. d) Los ratones cotratados con péptido RB5 y 3-NP mostraron niveles disminuidos de Caspasa-3 (ANOVA bidireccional, post-hoc de Bonferroni, estrella blanca $P < 0.0001$).

Figura 5. RB5 muestra efecto neuroprotector en un modelo genético de ratón (HdhQ111) de la enfermedad de Huntington

Se trataron ratones WT y HdhQ111 con péptidos CPP-RB5 o Scramble (CPP-SCR) (20 mg/kg ip) durante 8 días.

a) Imágenes representativas de la fosforilación de ERK1/2 en el cuerpo estriado dorsolateral de ratones WT y HdhQ111. b) Los ratones HdhQ111 tratados con el péptido RB5 mostraron una mejora significativa de la activación de ERK en comparación con sus compañeros de camada. Comparación post-hoc ANOVA de Bonferroni bidireccional $^{**}p<0.01$ $^{***}p<0.001$ $^{****}p<0.0001$. c) Imágenes representativas de la tinción con TUNEL en el cuerpo estriado dorsal de ratones WT y HdhQ111. d) Los ratones HdhQ111 tratados con el péptido RB5 mostraron una reducción significativa de las células apoptóticas en comparación con los ratones tratados con Scramble. Comparación post-hoc ANOVA de Bonferroni bidireccional $^{**}p<0.01$. e) Imágenes representativas de la tinción de inmunofluorescencia Cleaved Caspase-3. f) Se observó una reducción significativa del estado preapoptótico en ratones HdhQ111 tratados con RB5. Comparación post-hoc ANOVA de Bonferroni bidireccional $^{***}p<0.001$.

Figura 6: RB5 muestra un efecto neuroprotector en el modelo de ratón MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) subagudo de la enfermedad de Parkinson

Los ratones adultos fueron tratados con MPTP o vehículo (20 mg/kg ip) durante 4 días. Se inyectaron péptidos CPP-RB5 o Scramble (CPP-SCR) (20 mg/kg ip) 1 h antes de MPTP/Vehículo. a) Imágenes representativas de TH en Substantia Nigra. b) Los ratones cotratados con péptido RB5 y MPTP mostraron una reducción significativa de la pérdida de TH en comparación con el grupo tratado con péptido Scramble. Comparación post-hoc ANOVA de Bonferroni bidireccional $^{*}p<0.05$ $^{**}p<0.01$.

c) Imágenes representativas de la tinción TUNEL en neuronas nigrales. d) Los ratones cotratados con péptido RB5 y MPTP mostraron una reducción significativa de células apoptóticas en comparación con los ratones tratados con Scramble. Comparación post-hoc ANOVA de Bonferroni bidireccional $^{*}p<0.05$. e) Imágenes representativas de la tinción de inmunofluorescencia Cleaved Caspase-3. f) Se observó una reducción significativa del estado preapoptótico en ratones MPTP pretratados con péptido RB5. Comparación post-hoc de Bonferroni ANOVA bidireccional $^{*}p<0.05$ $^{**}p<0.01$

Figura 7. El péptido RB5 muestra un efecto neuroprotector en el modelo de ratón Tg2576 de la enfermedad de Alzheimer

Se trataron ratones WT y Tg2576 con RB5 o péptidos Scramble (20 mg/kg ip) durante 7 días. a) Imágenes representativas de la fosforilación de ERK1/2 en CA1 y b) Giro dentado (DG) de la región del hipocampo de ratones WT y Tg2576. c-d) Se observó una mejora significativa de la activación de ERK en ratones Tg2576 tratados con péptido RB5 en comparación con ratones tratados con Scramble. ANOVA bidireccional, comparación post-hoc de Bonferroni $^{**}p<0.01$ $^{***}p<0.001$ estrella blanca $p<0.0001$ e) Imágenes representativas de la tinción de inmunofluorescencia Cleaved Caspase-3. f) Se observó una reducción significativa del estado preapoptótico en ratones Tg2576 tratados con RB5. Comparación post-hoc ANOVA de Bonferroni bidireccional $^{**}p<0.01$ $^{***}p<0.001$.

Figura 8. RB5 mejora la formación y consolidación de la memoria en ratones WT que realizan la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR)

a) Después de una sesión de habituación de 5 minutos en la arena vacía el día 1, a los ratones se les inyectó RB5 (20 mg/kg) o vehículo una hora antes de la sesión de entrenamiento con dos objetos idénticos el día 2 y luego se evaluó su memoria a largo plazo en días posteriores. El índice de discriminación (DI) se probó en diferentes momentos: 24, 48, 72 y 120 horas. (a) y también hasta 168h (b). A las 24 horas, D.I. del grupo RB5 fue significativamente mayor que el del grupo Scramble. En los días siguientes, mientras el grupo RB5 se mantuvo alto, el grupo Scramble volvió a los niveles basales. $^{*}p<0.01$ $^{**}p<0.0001$. RB5 mejoró significativamente la formación y consolidación de la memoria en NOR hasta por 5 días. A las 24 h, la DI del grupo RB5 fue altamente significativa (prueba de muestra independiente $t_{26}=4.428$ $P<0.01$, SCR (n=14) RB5 (=14)), así como a las 48 h (prueba de muestra independiente $t_{38}=4.210$ $P<0.0001$, SCR (n=18) RB5 (=22)). A las 48 h, la DI del grupo Scramble cae por debajo del nivel de probabilidad (una muestra de prueba t SCR $t_{17}=0.566$ $P=0.579$) mientras que el DI del grupo RB5 estaba muy por encima (una muestra de prueba de RB5 $t_{21}=8.077$ $p<0.0001$). A las 72 h, la DI del grupo RB5 se mantuvo altamente significativa (prueba de muestra independiente $t_{14}=7.899$ $P<0.0001$, SCR (n=7) RB5 (=9)) y por encima del nivel de probabilidad (prueba t de una muestra RB5 $t_6=12.341$ $P<0.0001$; SCR $t_6=9.073$ $p<0.0001$). A las 120 h, la DI del grupo RB5 todavía era altamente significativa (prueba de muestra independiente $t_{23}=4.290$ $P<0.0001$, SCR (n=10) RB5 (=15)) y por encima del nivel de probabilidad (Una muestra t-prueba RB5 $t_{14}=9.143$ $P<0.0001$; SCR $t_9=2.230$ $p=0.053$). A las 168 h, la DI del grupo RB5 bajó a niveles basales indistinguibles del grupo SCR (prueba t de muestra independiente $t_{18}=0.777$ $P=0.447$, SCR (n=10) RB5 (=10)). Los resultados muestran media $\pm$ eem. $\square\square\square P<0.001$, $\square\square P<0.01$.

Figura 9. RB5 mejora la adquisición de la memoria del miedo contextual en animales sanos.

A las ratas despiertas se les infundió bilateralmente a través de una cánula de acero permanente dirigida al CA1 dorsal con 2 mg/ml de péptido Scramble (n = 6) o RB5 (n = 5) 20 minutos antes del acondicionamiento. a) STM y LTM se evaluaron midiendo el comportamiento de miedo condicionado (congelación) durante una prueba de recuerdo de 2 minutos 3 horas y 2 días después del entrenamiento, respectivamente. b) La administración de RB5 tuvo un efecto profundo en el comportamiento de congelación de las ratas (prueba x grupo, $F(2.262.20.361) = 9.439$, $e = 0.754$, $P = 0.000$, ANOVA de medidas repetidas). Esto se manifestó como un aumento en el comportamiento de congelación posterior al shock en los pies (postUS) durante el condicionamiento del miedo ($F_{(1.9)} = 21.532$, $P = 0.001$, comportamiento de congelación preUS versus postUS X interacción de infusión, ANOVA de medidas repetidas), y un aumento tanto en STM como en LTM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, prueba FLSD).

Figura 10. RB5 mejora la adquisición de la memoria de miedo contextual en el modelo de ratón Tg2576 con enfermedad de Alzheimer.

Se trataron ratones Tg2576 de 7 meses y ratones WT con CPP-SCR o CPP-RB5 (20 mg/kg, ip) antes del entrenamiento de condicionamiento de miedo contextual (CFC) y se analizó la retención de memoria 24 h después. El deterioro de la memoria del miedo contextual (FQ) en ratones Tg2576 se rescata por completo mediante el tratamiento con RB5. Los valores se informan como % del tiempo dedicado a la congelación. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Figura 11. RB5 mejora el rendimiento cognitivo en el modelo de ratón zQ175 con enfermedad de Huntington.

Los ratones WT y zQ175 se sometieron a un entrenamiento diario de 20 minutos de contacto con la nariz durante 10 días consecutivos (días 1-10) en un programa de refuerzo de proporción fija simple (FR1). A partir del día 11, los ratones recibieron una administración de RB5 (20 mg/kg. i.p.) 1 hora antes del entrenamiento de meter la nariz. RB5 mejoró significativamente la respuesta a los pinchazos en la nariz de ratones hembra zQ175 (interacciones bidireccionales entre genotipo x género $F_{1.57} = 4.383$ $p = 0.041$ y tratamiento x sexo $F_{1.57} = 28.120$ $P < 0.0001$ fueron significativos). La puntuación media de pinchazos en la nariz fue mayor en zQ175 femenino que en zQ175 masculino, con una diferencia media de 21.893 $P = 0.001$. a) El tratamiento con RB5 mejoró el rendimiento de los ratones hembra WT y zQ175 (ANOVA bidireccional, interacción tiempo x tratamiento $F_{18.648} = 23.314$, $P < 0.001$) con puntuaciones más altas en WT femenino que en zQ175 femenino (diferencia de medias de 46.175 $P = 0.001$). b) Análisis del área bajo la curva (AUC) de los golpes de nariz medidos durante el entrenamiento (ANOVA de Welch, post hoc de Games-Howell, zQ175 vs WT $P < 0.05$) y durante el tratamiento con RB5 (ANOVA de Welch, post hoc de Games-Howell, $P < 0.0001$). Los resultados muestran media $\pm$ eem. Estrella blanca $P < 0.0001$.

Métodos y materiales

Preparación de péptidos

GENECUST EUROPE (Luxemburgo) sintetiza a medida los péptidos que penetran las células contra la vía ERK, así como el control codificado (ineficaz). Las secuencias del péptido probado (CPP-RB5) y su versión codificada (CPP-SCR) son:

CPP-RB5:

GRKKRRQRRPPQGGGGEGPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFDV (SEQ ID NO: 18)

CPP-SCR:

GRKKRRQRRPPRVGPGVPEGVGVAVFGVKEPGQTGDVGPVGE (SEQ ID NO: 19)

Para todos los experimentos in vitro y in vivo se utilizaron lotes de 200 mg, altamente purificados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ($\geq 95\%$) con aminoácido C-terminal (último) en forma D y aminoácido terminal N acetilado (primero). Para experimentos in vivo, los péptidos se disolvieron en PBS 1X y se inyectaron en las dosis indicadas.

Tratamientos farmacológicos

Se disolvió ácido L-glutámico (G-6904, Sigma Aldrich) en agua esterilizada y se usó en una concentración final de 100 μ M durante 10 minutos de estimulación.

Se disolvió ácido 3-nitropropiónico (3-NP, N5636, Sigma, St. Louis, MO) en agua destilada hasta una concentración de 50 mg/ml y se ajustó el pH a 7.4 y se pasó a través de un filtro de 0.2 μ m y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 adquiridos en Charles River Laboratories como fuente de cultivos primarios del cuerpo estriado y ex vivo cortes agudos para realizar tanto inmunotransferencias como inmunofluorescencia. Los ratones también fueron sometidos a investigaciones inmunohistoquímicas y de comportamiento tras el tratamiento conjunto con 3-NP y péptidos.

Se utilizaron ratones CD1 adquiridos en Charles River Laboratories para probar el efecto agudo de CPP-RB5 y CPP-SCR y la prueba de reconocimiento de objetos, seguido de inmunofluorescencia y análisis IHC.

Ratones heterocigotos HdhQ111 (Jax®, Bar Harbour, Maine, EE. UU.), zQ175 knock-in heterocigoto (mezcla de sexos) que porta entre 180 y 195 repeticiones CAG (CHDI-81003003, Psychogenics, Inc. Tarrytown, NY) y ratones macho transgénicos Tg2576 (C57BL6 y SLJ de fondo mixto, Taconic Biosciences) se utilizaron para IHC, IF y pruebas de comportamiento.

Los controles de compañeros de camada y KO macho ERK1 se generaron como se describió anteriormente y se utilizaron para el análisis ex vivo.

Se compraron ratas Lister Hooded de Harlan Laboratories y se utilizaron para la prueba de condicionamiento de miedo contextual.

Sistema ex vivo en cortes cerebrales agudos

Los ratones adultos fueron anestesiados y decapitados. Los cerebros se extrajeron rápidamente del cráneo y se colocaron en una placa de vidrio fría llena de solución de disección a base de sacarosa helada (NaCl 87 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 7 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, sacarosa 75 mM, NaHCO₃ 25 mM, D-glucosa 10 mM, CaCl₂ 0.5 mM, ácido quinurénico 2 mM) y oxigenado con O₂ al 95 % y CO₂ al 5 % y posteriormente se montó en la platina del vibratomo (Vibratomo, VT1000S-Leica Microsystems). Se hicieron cortes de 200 µm de espesor y se transfirieron a la cámara de cortes de cerebro (Brain slice chamber-BSC1 - Scientific System design Inc, Mississauga, ON, Canadá) y se dejaron recuperar durante 1 h a 32 °C, con una perfusión constante de líquido cefalorraquídeo artificial carboxigenado (ACSF) en presencia del péptido Scramble o RB5 (50 µM). La estimulación del corte cerebral se realizó con glutamato 100 µM en la cámara durante 10 minutos. Después de una rápida fijación en PFA al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, los cortes se enjuagaron y se crioprotegieron durante la noche a 4 °C en solución de sacarosa. Al día siguiente, los cortes se cortaron en cortes más finos de 18 µm utilizando un criostato (Leica CM1850) y se recogieron en portaobjetos SuperFrost Plus (Thermo Scientific).

Administración in vivo de fármacos

En los momentos indicados después de los tratamientos farmacológicos, los animales fueron anestesiados y perfundidos transcárdialmente con PFA al 4 % tamponada enfriada con hielo. Los cerebros se extrajeron, se fijaron posteriormente durante la noche y se transfirieron a sacarosa tamponada al 30 % durante 24 h. Las secciones coronales se cortaron a un espesor de 35 µm en un micrótopo de congelación y se almacenaron en una solución crioprotectora a -20 °C hasta su procesamiento para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

Cromatografía líquida y espectrometría de masas en tandem (HPLC-MS/EM)

La biodisponibilidad de RB5 en el cerebro de ratón se determinó en diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 6, 12 h) después de una única administración ip de 20 mg/kg. Luego se cuantificó RB5 en cerebro de ratón usando HPLC-MS/MS. Las muestras de cerebro se homogeneizaron con 1:4 p/v de 50 % de acetonitrilo, 5 % de TFA en agua con un homogeneizador ultra-turrax y luego se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos a 4 °C. Luego se recogió el sobrenadante en hielo, se extrajo usando cartuchos Sep-Pak C18, se liofilizó y se mantuvo a 4 °C antes del análisis por HPLC-MS/MS. Inmediatamente antes del análisis, las muestras se suspendieron en 100 µl de HCOOH al 0.1 % en agua/acetonitrilo al 8 % en viales de muestreador automático.

El análisis HPLC-MS/MS se realizó utilizando un sistema que consta de un sistema HPLC Agilent serie 1200 acoplado con un espectrómetro de masas Triple Quádruple Agilent 6410. Se utilizó el software Mass Hunter Workstation v. B.01.03 para la recopilación y el procesamiento de datos (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.). La cuantificación de los niveles de RB5 y péptidos codificados en cerebro de ratón se llevó a cabo utilizando una curva estándar interna con concentraciones de péptidos que oscilaban entre 0.1 y 4 ng por µl. RB5 y los péptidos codificados y el estándar interno se separaron a temperatura ambiente inyectando 10 µl de muestra extraída en una columna analítica Jupiter C4 300 A, 2 x 150 mm, tamaño de partícula de 5 µm (Phenomenex, CA). Se usó elución en gradiente para la separación cromatográfica, usando ácido fórmico al 0.1 % en agua como disolvente A y acetonitrilo como disolvente B a un caudal de 200 µl/min. Se utilizó la elución por gradiente para la separación cromatográfica, utilizando ácido fórmico al 0.1 % en agua como solvente A, y acetonitrilo como solvente B a una velocidad de flujo de 200 µl/min. La elución comenzó con un 92 % de solvente A y un 8 % de solvente B mantenido durante 1 minuto, seguido de un gradiente lineal de 4 minutos al 75 % de solvente B, un gradiente lineal de 1 minuto al 99 % de solvente B, una

elución isocrática de 2 minutos y un gradiente lineal de 0.5 minutos al 8 % de solvente B, que se mantuvo durante 9.5 minutos para equilibrar la columna. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en el automuestreador.

Luego se detectaron los péptidos en un espectrómetro de masas Agilent 6410 QQQ utilizando los siguientes parámetros: modo de ión positivo, voltaje capilar de 5 kV, voltaje de cono de 500 V, caudal de gas de 8 L/min a 350 °C, presión del gas del nebulizador de 40 PSI a 350 °C, tiempo de pozo de 75 ms y Q1 y Q3 configurados en resolución unitaria.

Inmunofluorescencia

Los portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda y 1 h después del bloqueo en suero normal de cabra al 5 % y solución Triton X-100 al 0.1 %, se incubaron durante la noche a 4 °C con uno de los siguientes anticuerpos primarios: proteína ribosómica anti-fosfo-S6. (Ser235/236) (Cell Signaling Technology, 1:200, Danvers, MA), proteína ribosómica anti-fosfo-S6 (Ser240/244) (Cell Signaling Technology, 1:200, Danvers, MA), histona H3 (Lys14) (Ser10) acetilada anti-fosfo (1:1000 (Millipore, Billerica, MA) o caspasa 3 escindida (1:200 Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y anti-NeuN (1:1000 Millipore, Billerica, MA) seguida de los anticuerpos secundarios apropiados. Las imágenes con etiquetado simple y doble se obtuvieron utilizando una microscopía confocal de barrido láser (Leica SP2) equipada con los láseres correspondientes y los juegos de filtros adecuados para evitar la interferencia entre los fluorocromos. Se tomaron muestras de células en todas las regiones dorsales del cuerpo estriado con un objetivo de 40X. La cuantificación neuronal se realiza con el software ImageJ contando neuronas inmunorreactivas con fosfo-S6 o pH3 entre las neuronas positivas para NeuN en cada portaobjetos (n = 10 para cada grupo experimental). La proporción de células positivas para fosfo-S6 o fosfo-H3 entre el total de neuronas positivas para NeuN dio el porcentaje de neuronas positivas para fosfo-S6 o fosfo-H3 para cada campo adquirido (n = 4) a través del portaobjetos. Las comparaciones entre grupos de diferentes tratamientos se realizaron mediante ANOVA de dos vías y análisis post-hoc con Bonferroni Test, en el software GraphPad Prism 5.

Transferencia Western

Los ratones se sacrificaron por decapitación y se prepararon cortes de cerebro recién preparadas de acuerdo con el protocolo del sistema ex vivo anterior y se incubaron en una cámara de perfusión con los péptidos. Después de la estimulación con glutamato o solución salina, los cortes se homogeneizaron y se utilizaron para la determinación de proteínas utilizando un kit de ensayo de proteínas DC (Bio-rad). Se cargaron cantidades iguales de proteína (5 o 10 µg, dependiendo de la proteína objetivo) para cada muestra en geles de poliacrilamida al 12 %. Las proteínas se separaron en SDS/PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Después de la incubación durante 1 hora en solución de bloqueo (TBS1X, Tween al 0.1 %), las membranas se incubaron durante la noche con anti-ERK2 (K-23): sc-153 (1:1000 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), fosfo- p42-44 Map Kinase (Thr202/Tyr204) (1:1000 Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y anti-GAPDH (FL-335): sc-25778 (1:1000 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas). Las inmunotransferencias se analizaron con el software ImageJ para medir la densidad óptica de las bandas. Los niveles de cada proteína se normalizaron en el control de carga de GAPDH.

Cultivos embrionarios neuronales

Se prepararon cultivos embrionarios (E16) a partir de estriados de ratones WT, se sembraron en vidrio recubierto de poli-L-lisina y se mantuvieron durante 10 días en medio de cultivo como se describió anteriormente (Fasano et al, Biol Psy 2009). Se añadieron al medio de cultivo dos concentraciones diferentes (20 µm y 50 µm) de péptidos CPP-RB5 y CPP-SCR al tercer día y se reemplazaron cada día. El día 11, las células se fijaron con PFA al 4 %, pH 7.4 en PBS durante 10 minutos.

Inmunohistoquímica

1 hora después de que los ratones CPP-RB5/PPP-SCR (20 mg/kg, ip) fueran anestesiados y perfundidos mediante infusión intracardíaca de PFA al 4 % enfriado con hielo. Los cerebros se extrajeron rápidamente, se fijaron posteriormente durante la noche y se transfirieron a sacarosa tamponada al 25 % durante 24 h. Se cortaron secciones coronales de 30 µm de espesor en un micrótopo de congelación y se almacenaron en una solución crioprotectora a -20 °C hasta que se procesaron para inmunohistoquímica. Se incubaron secciones de flotación libre con anticuerpos primarios contra MAP quinasa anti-fosfo-p44/42 (Thr202/Tyr204), anti-fosfo-Elk-1 (Ser383), anti-fosfo-Kv4.2 (Thr607)-R, anti -fosfo-MSK-1, anti-fosfo-MEK-1, c-Fos y tirosina hidroxilasa durante la noche a 4 °C. Luego, las secciones se incubaron con IgG anti-conejo de cabra biotinilada (1:200, Vector Labs) durante 2 h. La detección de los anticuerpos unidos se llevó a cabo utilizando un método estándar basado en peroxidasa (kit ABC, Vectastain, Vector Labs), seguido de un DAB y solución H₂O₂. La cuantificación de neuronas positivas se contó desde el cuerpo estriado en 2-3 secciones por ratón, de forma bilateral. Las áreas de muestra se visualizaron con un objetivo de 20x en un microscopio Leica DM IRB por un investigador ciego a las condiciones, y los recuentos por región se promediaron en las secciones utilizando el software ImageJ.

Tinción TUNEL

Se utilizó el sistema TUNEL colorimétrico DeadEnd (Promega) para detectar células apoptóticas en células cultivadas que marcan el ADN fragmentado de células apoptóticas utilizando un ensayo TUNEL modificado. La tinción TUNEL se realizó con diaminobencidío (DAB) siguiendo el protocolo del fabricante. Las áreas de muestra se digitalizaron a través de una cámara de video (Nikon) conectada a un microscopio Zeiss usando un objetivo de 20X. Se contaron y promediaron 4 áreas para cada placa.

Administraciones de ácido 3-nitropropiónico in vivo

Antes de su uso, CCP-SCR y CPP-RB5 se diluyeron en PBS 1X y se inyectaron dos veces al día a intervalos de 12 horas (20 mg/kg). Se inyectó 3-NP 1 h después de los péptidos una vez al día durante 7 días consecutivos (50 mg/kg) en ratones macho C57Bl/6. Todos los fármacos se administraron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 10 ml/kg. Los ratones fueron sacrificados 1 hora después de la última inyección de péptido y se les perfundió transcárdialmente con PFA tamponado al 4 % y se procesaron para inmunohistoquímica. Se utilizó el sistema DeadEnd Colorimetric TUNEL (Promega) para detectar células apoptóticas en secciones de tejido de 35 mm de espesor. Para cada animal se tomaron tres secciones coronales consecutivas, se montaron en portaobjetos de vidrio y se procesaron para análisis inmunohistoquímico de acuerdo con los procedimientos recomendados. Para la cuantificación, se contó el número de neuronas positivas en cada sección en la región dorsolateral del cuerpo estriado de ambos hemisferios y se calcularon los valores medios.

Tarea de reconocimiento de objetos (NOR)

La prueba se realizó en una caja cuadrada abierta (45 x 45 x 45 cm), colocada en una habitación tranquila y con poca luz. Los objetos utilizados fueron: paralelepípedos de metal y viales de vidrio llenos de agua. No tenían ningún significado natural para los ratones y nunca antes se habían asociado con el refuerzo. El protocolo requirió tres días y se realizó de la siguiente manera:

Primer día: los ratones se colocaron individualmente en la arena vacía durante 5 minutos para familiarizarse con ella y medir su ansiedad (ensayo de tigmotaxis). El porcentaje de tigmotaxis se calcula como el tiempo de permanencia en la zona periférica sobre el tiempo total de permanencia en la pista (300 s). Los animales que muestran una tigmotaxis > 90 % se descartan de la muestra porque se consideran sesgados por la ansiedad.

Segundo día: A los ratones se les inyectó 20 mg/ml de CPP-SCR o CPP-RB5 1 h antes del entrenamiento y luego se los colocó en la arena durante 10 minutos, donde se les permitió explorar dos objetos idénticos (ensayo de entrenamiento). Por lo tanto, se obtuvieron dos medidas diferentes (en segundos) para el objeto izquierdo y el objeto derecho. Se consideraron entrenamientos exitosos aquellos con una exploración total de objetos de al menos 8 segundos en 10 min; si un animal no alcanzaba este umbral, era excluido del experimento. Luego, se calcularon los porcentajes de exploración para cada objeto como: el tiempo dedicado a explorar LO o RO, sobre el tiempo total de exploración (RO+LO). De acuerdo con estos porcentajes, el experimentador decidió dónde colocar el nuevo objeto para la prueba.

Tercer día: uno de los dos objetos idénticos (Paralelepípedo) se cambió por un nuevo objeto (Vial) y se permitió a los ratones explorarlos durante 10 minutos (ensayo de prueba).

Los tiempos de exploración del objeto familiar (FO) y del objeto nuevo (NO) se registraron por separado, con el mismo procedimiento que para la prueba de entrenamiento. También se consideró un corte de 6 segundos. Para dar fe de la memoria de reconocimiento, se calculó un índice de discriminación (D.I.) como (tiempo total de exploración de NO - tiempo total de exploración de FO) / tiempo total de exploración de (FO+NO). El índice DI está comprendido entre -1 y +1. Un D.I. de 1 significaría una perfecta retención de la memoria para el FO. Por el contrario, cuanto más tiempo pase el animal explorando FO, menor será el valor D.I., lo que significa mala retención de memoria para FO. Se utilizó el software SMART (Panlab, Barcelona, España) para ejecutar el experimento.

Cirugía y Microinfusiones en el Hipocampo Dorsal

Los sujetos eran ratas encapuchadas Lister macho adultas que pesaban entre 280 y 350 g. Fueron alojados en parejas, en salas de espera mantenidas a 21 °C en un ciclo de luz invertido (12 h de luz/oscuridad; luces encendidas a las 22:00 h). Todos los experimentos se realizaron en el período de oscuridad de las ratas. La comida y el agua estuvieron disponibles gratuitamente durante todo el experimento. Se implantaron quirúrgicamente cánulas de doble guía de acero dirigidas al hipocampo dorsal (AP-3.50, en relación con bregma) bajo anestesia al menos una semana antes del entrenamiento conductual y las microinfusiones. Se llevaron a cabo infusiones bilaterales con 2 mg/ml de CPP-SCR o CPP-RB5, 20 minutos antes del acondicionamiento (pH 7.0, 1.0 ml/lado, velocidad = 0.5 ml/min) a través de la cánula permanente crónica en ratas despiertas usando una bomba de jeringa, conectada a inyector (calibre 28, que sobresale 1 mm más allá de las cánulas guía) mediante un tubo de polietileno.

Condicionamiento contextual del miedo

El acondicionamiento se realizó en uno de dos contextos distintos. Estos contextos fueron diseñados para diferir en una serie de características distintivas que incluyen tamaño, ubicación espacial, olor e iluminación.

Protocolo en ratas: durante la prueba de entrenamiento de acondicionamiento de 3 minutos, las ratas recibieron una única descarga en las patas (0.5 mA durante 2 s) 2 minutos después de ser colocadas en uno de los contextos de acondicionamiento (CtxA). Todas las ratas fueron devueltas a sus jaulas después del acondicionamiento. Las pruebas de recuperación 3 horas (memoria a corto plazo posterior a la recuperación, STM) o 2 días (memoria a largo plazo, LTM) después del recuerdo nuevamente consistieron en exponer a la rata al contexto de condicionamiento durante 2 minutos.

Protocolo para ratones: después de 120 segundos de exploración, los ratones recibieron descargas de 5 pies (0.7 mA, 2 s de duración, separadas por intervalos de 60 s) administradas a través del piso de rejilla. La memoria del miedo contextual se evaluó 24 h después devolviendo a los ratones durante 5 minutos a la cámara de acondicionamiento y sin aplicar una descarga en el pie.

Para todos los protocolos, la conducta de congelación sirvió como una medida del miedo condicionado al contexto durante las pruebas de condicionamiento y recuperación de los procedimientos conductuales. Esto fue grabado en vídeo y cuantificado por un observador ciego al grupo experimental. Una unidad de congelación se definió como una ausencia continua de movimiento distinto del requerido para la respiración en 1 s muestreado cada 10 s.

Cajas operantes de 9 hoyos.

Las pruebas operantes se realizaron en 16 cajas operantes de 9 hoyos. Cada caja operante contiene una serie horizontal de nueve orificios con rayos infrarrojos localizados en el frente de cada orificio para detectar pinchazos en la nariz. Una bomba peristáltica suministra refuerzo líquido (leche de fresa) a un cargador situado en la parte delantera de la caja.

Una semana antes de comenzar el entrenamiento, los ratones se someten a una restricción de agua durante 18 horas al día y se mantienen bajo este régimen durante todos los procedimientos experimentales. A los ratones se les enseña a pincharse la nariz de acuerdo con un programa de refuerzo de proporción fija simple (FR1): para obtener la recompensa, se requiere que los ratones respondan a una luz de estímulo en el orificio central mediante un solo golpe de la nariz. Los ratones se entrenan diariamente en este programa durante sesiones de 20 minutos durante 10 días (fase de entrenamiento). Una vez entrenados, los animales se subdividieron en 4 grupos y se les inyectaron RB5 o péptidos codificados (10 mg/kg, ip) 1 hora antes de ser probados en el programa FR1 durante otros 9 días.

Resultados

Se diseñó un pequeño polipéptido sobre la porción terminal N única de la MAP quinasa ERK1. Este polipéptido, cuando se une a la quinasa ERK1, confiere un efecto inhibitorio sobre la señalización global dependiente de ERK al reducir significativamente la capacidad de ERK1 y ERK2 para viajar desde/hacia el núcleo, muy probablemente uniéndose a componentes de la envoltura nuclear. Es importante destacar que la secuencia peptídica parece ser un dominio funcional ya que cuando se elimina de ERK1, esta quinasa se comporta como ERK2 y, por el contrario, cuando se une a ERK2, esta quinasa comienza a comportarse como ERK1.

Sin embargo, dicho péptido aislado muestra la propiedad farmacológica inesperada de actuar como inhibidor de MAPK3/ERK1, como se detalla a continuación, cuando se expresa sin estar unido a ERK1 y en particular cuando se fusiona a una secuencia peptídica que penetra en las células. En la presente invención, se descubrió que este inhibidor de MAPK3/ERK1 se diseñó alrededor de la porción terminal N de ERK1, en particular la secuencia peptídica de SEQ ID No. 1, más particularmente la secuencia peptídica RB5, cuando se administra en células o in vivo en animales vivos, provoca una mejora de la señalización global de ERK en el núcleo, al facilitar la translocación nuclear de ERK2, la principal isoforma de ERK.

Mejora de la actividad de ERK a través del péptido RB5.

Para estudiar bioquímicamente la función del péptido RB5 en la actividad de ERK, utilizamos un sistema ex-vivo recientemente establecido, en el que se pueden preparar cortes de cerebro recién hechos de ratones adultos, incubarlos en una cámara de perfusión con los péptidos y estimularlos con agonistas y antagonistas apropiados. Como se muestra en la Figura 1a, los cortes de cerebro previamente incubados durante 1 h con péptidos CPP-RB5 o CPP-SCR 50 µm se expusieron a glutamato 100 µm y se analizaron en transferencia Western. Fosfo-ERK1 aumentó igualmente en cortes pretratados con CPP-SCR y CPP-RB5, mientras que la fosforilación de ERK2 se mejora selectivamente solo en cortes pretratados con CPP-RB5, lo que indica que este péptido que penetra en las células es muy eficaz para promover la señalización mediada por ERK2. Curiosamente, no se detectaron cambios en el nivel basal de las proteínas ERK1 y ERK2.

Es más, con este sistema ex-vivo, la inducción de la señalización de ERK se monitorizó a nivel de células individuales utilizando anticuerpos fosfoespecíficos contra la fosforilación de la histona H3 (pH3) o la proteína ribosómica S6 (pS6).

RB5 promueve la señalización nuclear dependiente de ERK (translocación de ERK1/2 e inducción de fosforilación de histona H3) en respuesta a la aplicación de glutamato (Figura 1b, panel izquierdo). Al mismo tiempo, la señalización citoplasmática no se activa (medida por fosforilación ribosómica de S6) (Figura 1b, panel derecho). Este fenotipo es igual al encontrado en las células ERK1 KO, lo que sugiere que RB5 es un modelo farmacológico en el que la actividad de ERK1 está atenuada y, por lo tanto, ERK2 puede potenciarse (Figura 1c).

Con base en estos resultados, examinamos la principal participación de RB5 en la señalización nuclear con experimentos in vivo. Los ratones pretratados con una dosis única de CPP-RB5 o CPP-SCR (20 mg/kg) se perfundieron 1 hora después y se procesaron cortes de cerebro para detectar marcadores nucleares y citoplasmáticos. Como se muestra en la Figura 1, se encontró que la inducción de ERK mejoró significativamente (panel d), así como la señalización nuclear dependiente de ERK. De hecho, se encontró que moléculas nucleares como p-MSK-1, p-Ach3, p-ELK-1 y c-Fos aumentaron significativamente tras la administración de CPP-RB5 (paneles eh). Por el contrario, la señalización citoplasmática medida por la fosforilación ribosómica de S6 se encontró reducida en menor medida en ratones tratados con CPP-RB5, mientras que la fosforilación del canal de potasio dependiente de voltaje (pKv4.2) y MEK-1 fue comparable entre los dos tratamientos (paneles i-l). Finalmente, como se observó en cortes, la administración de RB5 in vivo no alteró ni pERK (panel m), pAch3 (panel n) ni pS6 (panel o) en ratones ERK1 KO, lo que confirma que el objetivo de RB5 es ERK1/MAPK3.

Propiedades farmacocinéticas del péptido RB5 en el cerebro.

En la Figura 2, se evaluó la capacidad de RB5 para mejorar la señalización ERK in vivo. En primer lugar, la actividad de RB5 permaneció alta hasta 6 h después de la inyección (panel a), pero bajó al nivel basal a las 12 h, lo que llevó a una vida media estimada de 9 h. En segundo lugar, se determinó la curva de respuesta de dosis 1 hora después de la inyección y se confirmó que las dosis de 20 y 10 mg/kg (i.p.) pueden elevar pERK (panel b). En tercer lugar, medimos los niveles cerebrales de RB5 con espectrometría de masas a diferentes horas después de una única administración i.p. de 20 mg/kg. Se detectaron niveles altos de RB5 hasta las 6 h (panel c).

Disminución de la muerte neuronal en cultivo estriado primario mediado por el péptido RB5

Para analizar el efecto de RB5 sobre la supervivencia neuronal, preparamos cultivos neuronales primarios a partir de estriados embrionarios. Las células se expusieron a medio que contenía péptidos CPP-SCR o CPP-RB5 en dos concentraciones finales de 20 μ m o 50 μ m durante 7 días consecutivos.

El sistema TUNEL colorimétrico DeadEnd se aplicó 24 h después para analizar la muerte celular apoptótica midiendo la fragmentación del ADN nuclear. Como se muestra en la Figura 3, CPP-RB5 en una concentración más alta (50 μ m) redujo la apoptosis en un 32 % en comparación con los valores de CPP-SCR.

Prevención de la muerte celular en un modelo farmacológico de ratón de la enfermedad de Huntington

Después de haber comprobado la capacidad efectiva del péptido RB5 para potenciar la actividad ERK in vitro y en el ex vivo sistema de corte agudo, probamos la eficacia neuroprotectora in vivo, en un modelo farmacológico de ratón de la enfermedad de Huntington. Es bien sabido que el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) forma selectivamente lesiones estriales similares a las que se encuentran en la enfermedad de Huntington.

Establecimos un protocolo en el que a ratones macho C57BL/6 se les inyectaron péptidos CPP-SCR o CPP-RB5 (20 mg/kg, ip) dos veces al día (cada 12 h) durante 7 días y 1 h después de la inyección de péptidos recibieron una inyección de 3-NP (50 mg/kg). Al final del tratamiento, se perfundieron los animales y se prepararon los cerebros de acuerdo con la inmunohistoquímica. Como se muestra en la Figura 4, CPP-RB5 pudo prevenir la muerte celular inducida por 3-NP in vivo, reducir la apoptosis a niveles de control (paneles ab) y reducir los niveles preapoptóticos del marcador Caspasa 3 a niveles de control (paneles c-d).

Prevención de la muerte celular en un modelo genético de ratón de la enfermedad de Huntington

También evaluamos el posible efecto neuroprotector de RB5 en ratones transgénicos hdhQ111, un modelo genético de aparición tardía de la enfermedad de Huntington. Se trataron ratones hdhQ111 (20 mg/kg, ip, dos veces al día) durante 7 días (Figura 5). Se descubrió que RB5 no solo elevaba pERK en WT y mutantes striata (panel a, b), sino que también previene la degeneración en los mutantes hdhQ111 (panel c-f).

Prevención de la muerte celular en un modelo farmacológico de ratón de la enfermedad de Parkinson

Hemos evaluado el efecto neuroprotector de RB5 en el modelo de neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) de la enfermedad de Parkinson (Figura 6). Los ratones fueron tratados con MPTP o vehículo (20 mg/kg, i.p) durante 4 días. Se inyectó RB5 o péptido codificado (20 mg/kg, ip) 1 hora antes del MPTP/vehículo. Se evitó la neurodegeneración, de acuerdo con lo evaluado mediante tinción con tirosina hidroxilasa (TH) (panel a, b), TUNEL (panel c, d) y caspasa 3 escindida (panel e, f), lo que confirma un fuerte efecto neuroprotector.

Prevenición de la muerte celular en un modelo genético de ratón (Tg2576) de la enfermedad de Alzheimer

El modelo genético de la enfermedad de Alzheimer Tg2576 y sus controles WT se trataron durante 7 días con RB5/péptido codificado (20 mg/kg, ip). Como se muestra en la Figura 7, RB5 aumentó pERK en los mutantes Tg2576 (panel a-d) y al mismo tiempo redujo los niveles de tinción con caspasa-3 escindida (panel e-f), lo que confirma un fuerte efecto neuroprotector.

Mejora de la consolidación de la memoria en la prueba de reconocimiento de objetos

Se cree que el péptido RB5 regula positivamente la señalización de ERK en las neuronas. Esto conduciría a una mayor activación de la vía y, por tanto, a una mayor síntesis de proteínas. Dado que la transcripción genética es el mecanismo biológico que subyace a la consolidación de la memoria, el resultado conductual esperado es una mejora de la memoria. Por lo tanto, realizamos la Tarea de Reconocimiento de Objetos (ORT), una prueba comúnmente utilizada para estudiar la memoria explícita en roedores.

Existen diferentes variantes de esta prueba y la elegida permite investigar la memoria en busca de eventos únicos, a saber, la prueba de reconocimiento de objetos de un ensayo en la que se solicita una discriminación retardada entre un objeto nuevo y uno familiar. 1 h antes del comienzo de la prueba, los ratones se sometieron a una inyección intraperitoneal de péptidos CPP-SCR o CPP-RB5 y luego fueron examinados después de diferentes puntos de tiempo (24, 48, 72 y 120 h). Como se muestra en la Figura 8, los ratones tratados con CPP-RB5 tuvieron un mayor rendimiento en recordar el objeto a las 24, 48, 72 y sorprendentemente 120 h después en comparación con sus animales CPP-SCR (panel a). Por último, a las 168 h, el rendimiento del grupo RB5 cayó a niveles basales indistinguibles del grupo SCR (panel b). Esto significa que RB5 mejoró la consolidación de la memoria de los ratones, permitiéndoles pasar más tiempo con el nuevo objeto el día de la prueba de memoria.

Mejora de la formación de la memoria emocional en CFC.

También probamos el efecto de RB5 en la adquisición y expresión del condicionamiento contextual del miedo (CFC), en el que los roedores aprenden a asociar un estímulo condicionado (CS) inocuo, como un contexto, con un estímulo incondicionado (US) nocivo, como un choque en los pies. CFC se ha utilizado ampliamente como paradigma conductual para evaluar el aprendizaje asociativo y las funciones de la memoria. A ratas despiertas se les infundió bilateralmente en el hipocampo 2 mg/ml de CPP-SCR o CPP-RB5 20 minutos antes del acondicionamiento en la caja de la cámara (contexto). La memoria a corto plazo (STM) y la memoria a largo plazo (LTM) se evaluaron midiendo el comportamiento de congelación durante una prueba realizada 3 horas y 2 días después del entrenamiento. Como se muestra en la Figura 9, la infusión de CPP-RB5 en el hipocampo dorsal antes de la CFC mejoró la adquisición de la memoria contextual del miedo y resultó en una memoria del miedo a largo plazo más fuerte.

Prevenición de la pérdida de memoria en un modelo de ratón (Tg2576) de la enfermedad de Alzheimer

Además, investigamos si la mejora de la actividad de ERK a través del péptido RB5 podía modular el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer. Se utilizó un modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer (ratones Tg2576-APPswe) durante la fase sintomática tardía para probar la posibilidad de detener el deterioro cognitivo. Se trataron ratones Tg2576 y WT envejecidos con CPP-SCR o CPP-RB5 (20 mg/kg, ip) antes del entrenamiento de condicionamiento de miedo contextual (CFC) y se probó la retención de memoria 24 h después. Como se muestra en la Figura 10, el péptido CPP-RB5 rescató deterioros de memoria ya presentes en ratones Tg2576 envejecidos hasta niveles WT.

Mejora del rendimiento cognitivo en el modelo de ratón zQ175 de la enfermedad de Huntington.

También evaluamos el efecto de RB5 en la adquisición de una tarea de aprendizaje procedimental como "hurgar en la nariz" en un modelo de EH con aparición temprana de déficits cognitivos, los ratones transgénicos zQ175. El entrenamiento de toque de nariz se llevó a cabo en cajas operantes de 9 hoyos. En esta tarea, se pidió a los ratones que respondieran a un estímulo luminoso en el orificio central mediante un solo toque en la nariz para obtener una recompensa líquida. Después de 10 días de entrenamiento, los ratones zQ175 mostraron un claro deterioro en el aprendizaje de esta tarea. Sin embargo, tras la administración de RB5, todos los animales cambiaron significativamente su desempeño con el tiempo con una clara diferencia de sexo (Figura 11a-b). En particular, tanto los ratones hembra de tipo silvestre (WT) como los zQ175 mostraron una mejora significativa de las respuestas durante 9 días de tratamiento con RB5.

En conjunto, esta evidencia respalda el uso de RB5 y derivados u homólogos como un tratamiento neuroprotector y de mejora cognitiva eficaz para pacientes afectados por trastornos neurodegenerativos y para mejorar la cognición en individuos normales.

Conclusión

Hemos demostrado que los péptidos cortos derivados del N-Terminal de la MAP quinasa ERK1 (tanto humana como de ratón) pueden prevenir la apoptosis neuronal in vitro e in vivo. Los péptidos de la invención tienen la capacidad de estimular específicamente la translocación nuclear de ERK y así estimular la transcripción de genes mediada por ERK y la remodelación de la cromatina en el cerebro. La administración de los péptidos al cerebro se logra ventajosamente mediante el etiquetado específico con secuencias peptídicas que penetran en las células. Luego, los péptidos pueden atravesar la barrera hematoencefálica y las membranas plasmáticas de las células neuronales. Dichos péptidos actúan como agentes neuroprotectores que podrían ser útiles para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos neurodegenerativos. Además, los péptidos de la invención muestran efectos positivos tanto en la supervivencia de las células neuronales como en la cognición y representan una terapia para una serie de trastornos cerebrales fatales importantes que actualmente carecen de un tratamiento eficaz, mejorando los déficits cognitivos y bloqueando la neurodegeneración. Además, los péptidos de la invención mejoran la cognición también en ausencia de neurodegeneración y, por tanto, son adecuados para la mejora cognitiva en individuos sanos.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEP RRT EGVGP GVPGEVEMVKGQPF DV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que tiene al menos un 96 % de identidad con el péptido i).

2. Un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEP RRT EGVGP GVPGEVEMVKGQPF DV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominado RB5; o

ii) una secuencia que tiene al menos un 96 % de identidad con el péptido i).

y en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica.

3. El péptido neuroprotector de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho péptido neuroprotector está unido a dicho portador peptídico en su terminal amino o carboxi.

4. El péptido neuroprotector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que dicho portador peptídico es un péptido de penetración celular (CPP), preferiblemente un CPP seleccionado del grupo que comprende o consiste en:

GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2)

RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 3)

RRRRRRR (SEQ ID NO: 4)

XRRRRRRRX (SEQ ID NO: 5)

XRRRXRRRR (SEQ ID NO: 6)

RRRXRRRRX (SEQ ID NO: 7)

RRRRRRRXX (SEQ ID NO: 8)

XXRRRRRRRR (SEQ ID NO: 9)

RRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 10)

XRRRRRXRRRRR (SEQ ID NO: 11)

RRRXRRRRRRRRX (SEQ ID NO: 12)

GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 13)

SRRARRSPRHLGSG (SEQ ID NO: 14)

LRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 15)

VKRGLKLRHVRPRVTRMDV (SEQ ID NO: 16)

RKKRRRESRKKRRRES (SEQ ID NO: 17)

5. El péptido neuroprotector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho péptido neuroprotector consiste en la secuencia GRKKRRQRRRPPQGGGGGEP RRT EGVGP GVPGEVEMVKGQPF DV (SEQ ID NO: 18).

6. Molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Una célula huésped transformada o transfectada con el vector de acuerdo con la reivindicación 7.

9. Una composición farmacéutica que comprende: un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 % y preferiblemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 % de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica;

o un ácido nucleico que codifica el péptido; o un vector que comprende el ácido nucleico; y

un vehículo, adyuvante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. Un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 %, y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 %, de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica

para su uso como medicamento.

11. Un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominado RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 %, y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 %, de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica

para uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o un trastorno neuropsiquiátrico.

12. Una combinación terapéutica para usar en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o trastorno neuropsiquiátrico que comprende un péptido para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que comprende una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 %, y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 %, de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica;

y/o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, y al menos otro agente terapéutico para tratar una afección del cerebro.

13. Un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominada RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 %, y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 %, de identidad con el péptido i);

y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica,

para su uso como agente potenciador cognitivo en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o un trastorno neuropsiquiátrico.

14. Una combinación terapéutica para usar en la mejora de la capacidad cognitiva que comprende un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que consta de una secuencia de aminoácidos:

i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFVDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominado RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 %, y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 %, de identidad con el péptido i); y/o

composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9;

y al menos otro agente potenciador cognitivo y/o analgésico.

15. El péptido neuroprotector para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 13 o terapéutico combinado para uso según la reivindicación 12 o 14, en el que:

el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que comprende: Enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias; Enfermedad de Huntington (EH); Enfermedad de Parkinson (EP); enfermedades nerviosas degenerativas; encefalitis; epilepsia; trastornos genéticos del cerebro; malformaciones de la cabeza y el cerebro; hidrocefalia; ataque; esclerosis múltiple; esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig); Demencia frontotemporal (FTP); Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP); Temblor Esencial (TE); Atrofia Sistémica Múltiple (MSA); Degeneración Corticobasal (CBD); Isquemia Cerebral; Enfermedades por almacenamiento lisosómico (LSD); o

el trastorno neuropsiquiátrico se selecciona del grupo que comprende: trastorno del espectro autista (TEA), discapacidad intelectual (DI), esquizofrenia (también conocida como psicosis), manía (también conocida como hipomanía y trastorno bipolar cuando alterna con depresión), depresión mayor, ansiedad, trastorno de estrés postraumático, trastorno obsesivo-compulsivo.

16. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o el péptido neuroprotector para uso de acuerdo con la reivindicación 10, 11, 13, o 15, o una combinación terapéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 12, 14 o 15, en la que dicho péptido neuroprotector está unido a dicho portador peptídico en ya sea su terminal amino o carboxi.

17. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o el péptido neuroprotector para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, 11, 13, o 15 o una combinación terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, 14 o 15, en la que dicho portador peptídico es un péptido penetrante celular (CPP), preferiblemente un CPP seleccionado del grupo que comprende o consiste en:

GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2)

RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 3)

RRRRRRRR (SEQ ID NO: 4)

XRRRRRRRX (SEQ ID NO: 5)

XRRRXRRRR (SEQ ID NO: 6)

RRRXRRRRX (SEQ ID NO: 7)

RRRRRRRX (SEQ ID NO: 8)

XXRRRRRRRR (SEQ ID NO: 9)

RRRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 10)

XRRRRRXRRRRR (SEQ ID NO: 11)

5 RRRRXRRRRRRRX (SEQ ID NO: 12)

GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 13)

SRRARRSPRHLGSG (SEQ ID NO: 14)

10 LRRERQSRLRRRERQSR (SEQ ID NO: 15)

VKRGLKLRHVRPRVTRMDV (SEQ ID NO: 16)

15 RKKRRRESRKKRRRES (SEQ ID NO: 17)

18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 o el péptido neuroprotector para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, 11, 13, o 15 o una combinación terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, 14 o 15, en la que dicho péptido neuroprotector consiste en la secuencia
20 GRKKRRQRRPPQGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFDV (SEQ ID NO: 18).

19. Un método para mejorar la capacidad cognitiva que comprende administrar una cantidad eficaz de un péptido neuroprotector para inhibir la señalización de la proteína quinasa de la proteína quinasa 3 activada por mitógenos (MAPK3) que comprende una secuencia de aminoácidos:

25 i) QGGGGGEPRRTEGVGPGVPGEVEMVKGQPFDV (SEQ ID NO: 1) en adelante denominado RB5; o

ii) una secuencia que comparte al menos el 75 %, y preferentemente al menos el 78 %, 81 %, 84 %, 87 %, 90 %, 93 %, 96 %, de identidad con el péptido i);

30 y, opcionalmente, en el que dicho péptido neuroprotector está unido de forma covalente o no covalente a o asociado con un portador peptídico para transportar dicho péptido neuroprotector a través de una membrana, preferiblemente una membrana biológica;

35 o una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido o un vector que comprende la molécula de ácido nucleico, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9

a un individuo que no sufre neurodegeneración y desea dicha capacidad cognitiva mejorada, en el que el método no es un método para el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.

40

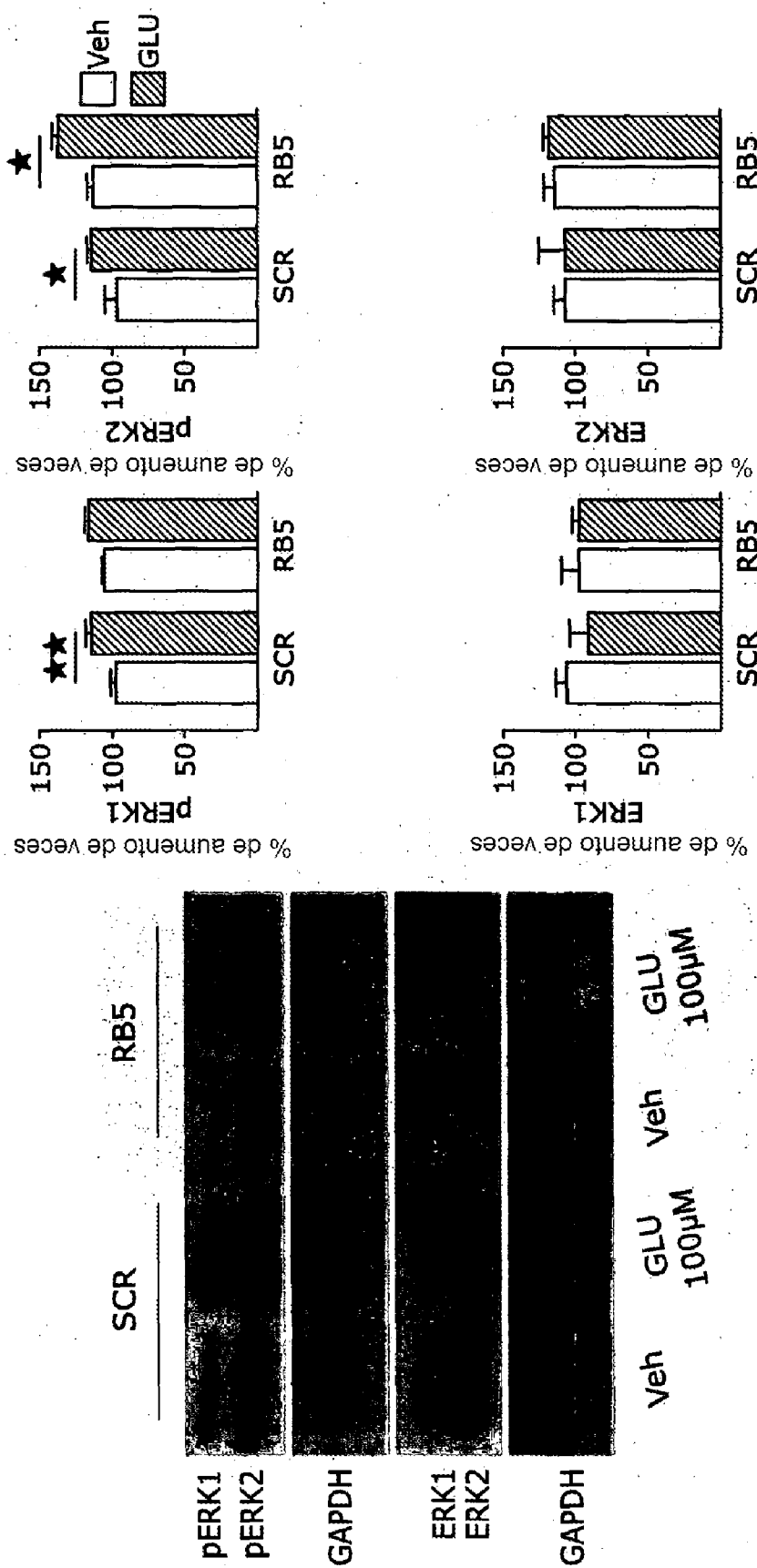


Figura 1a

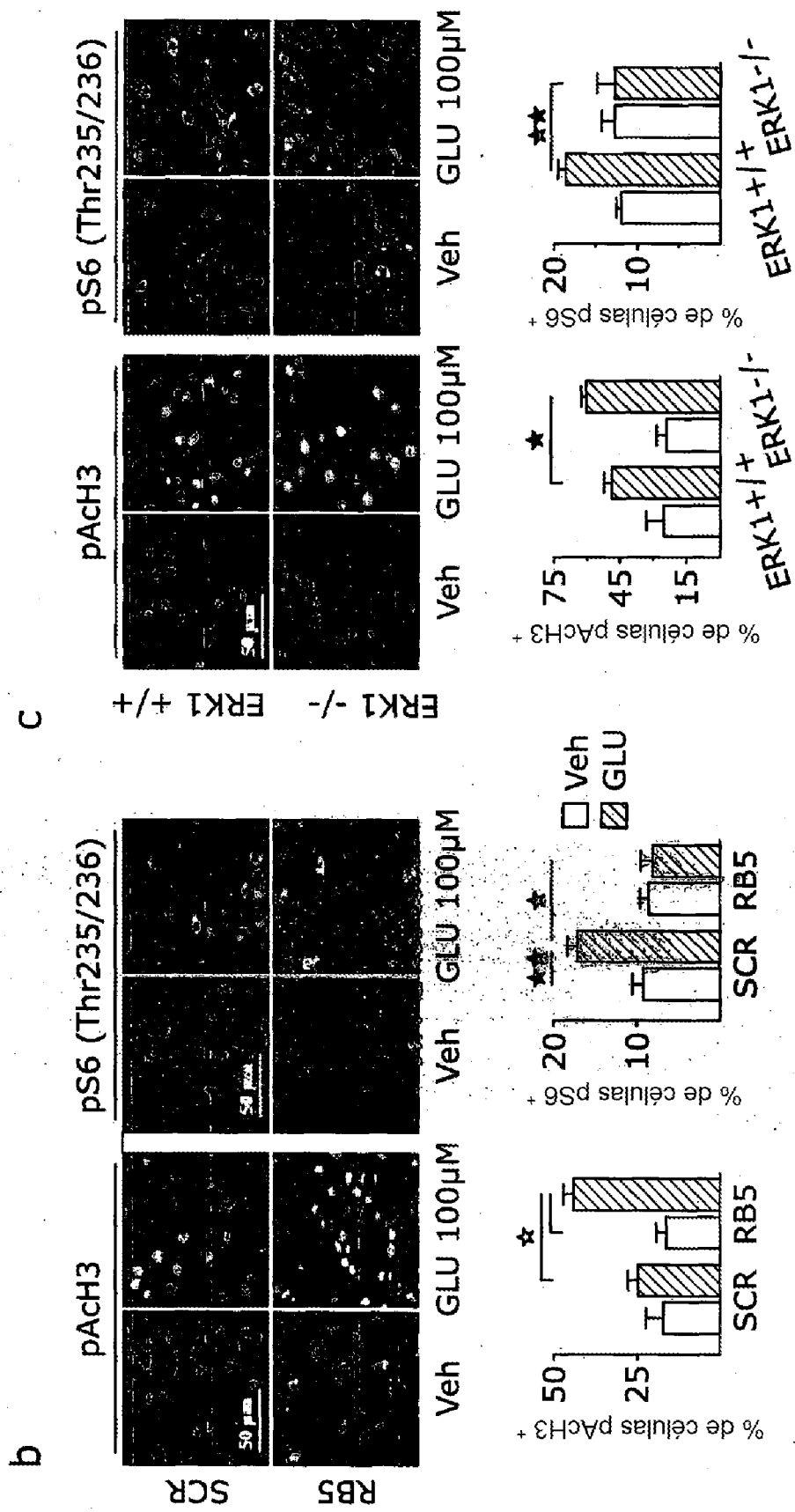
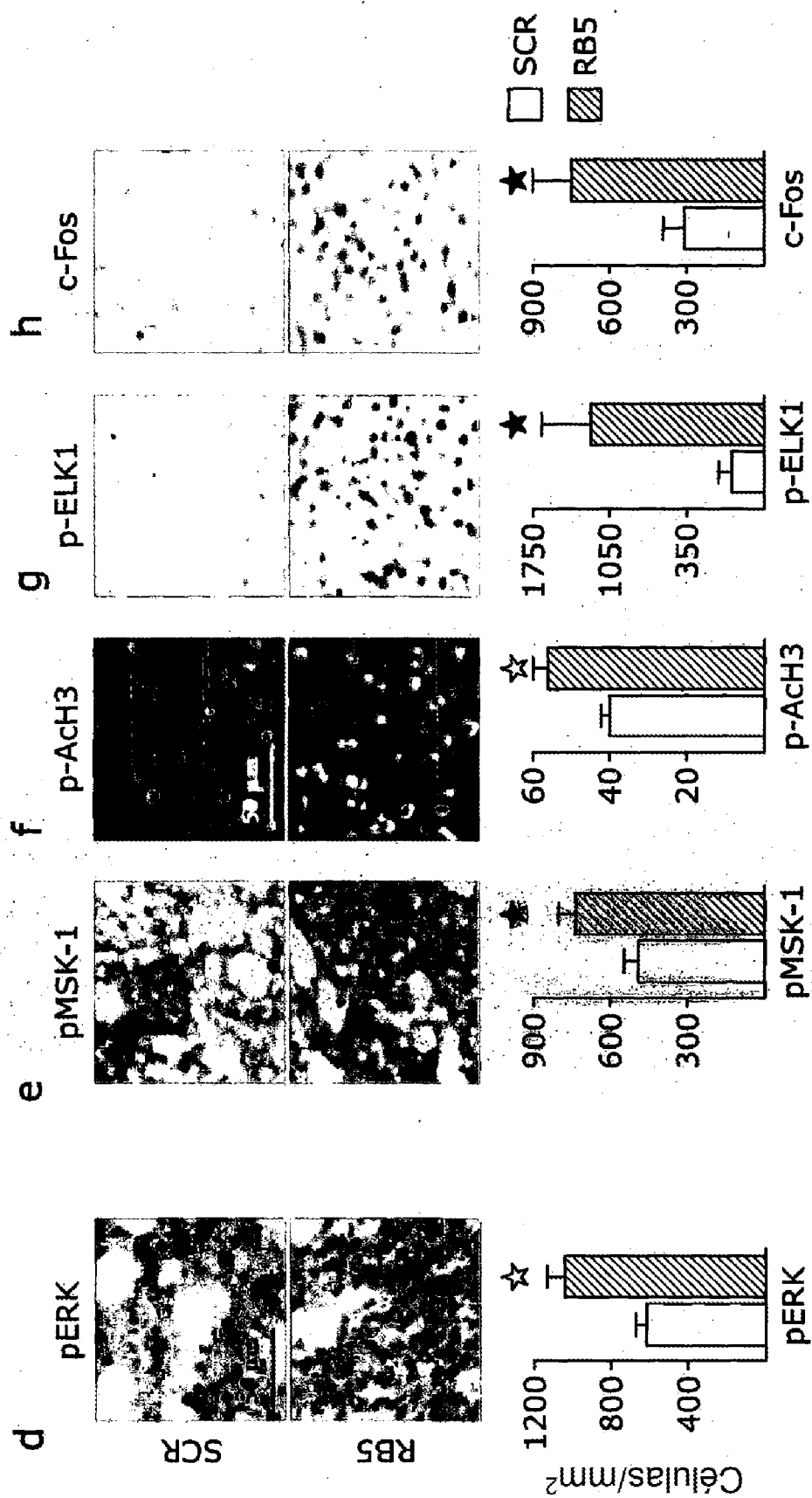
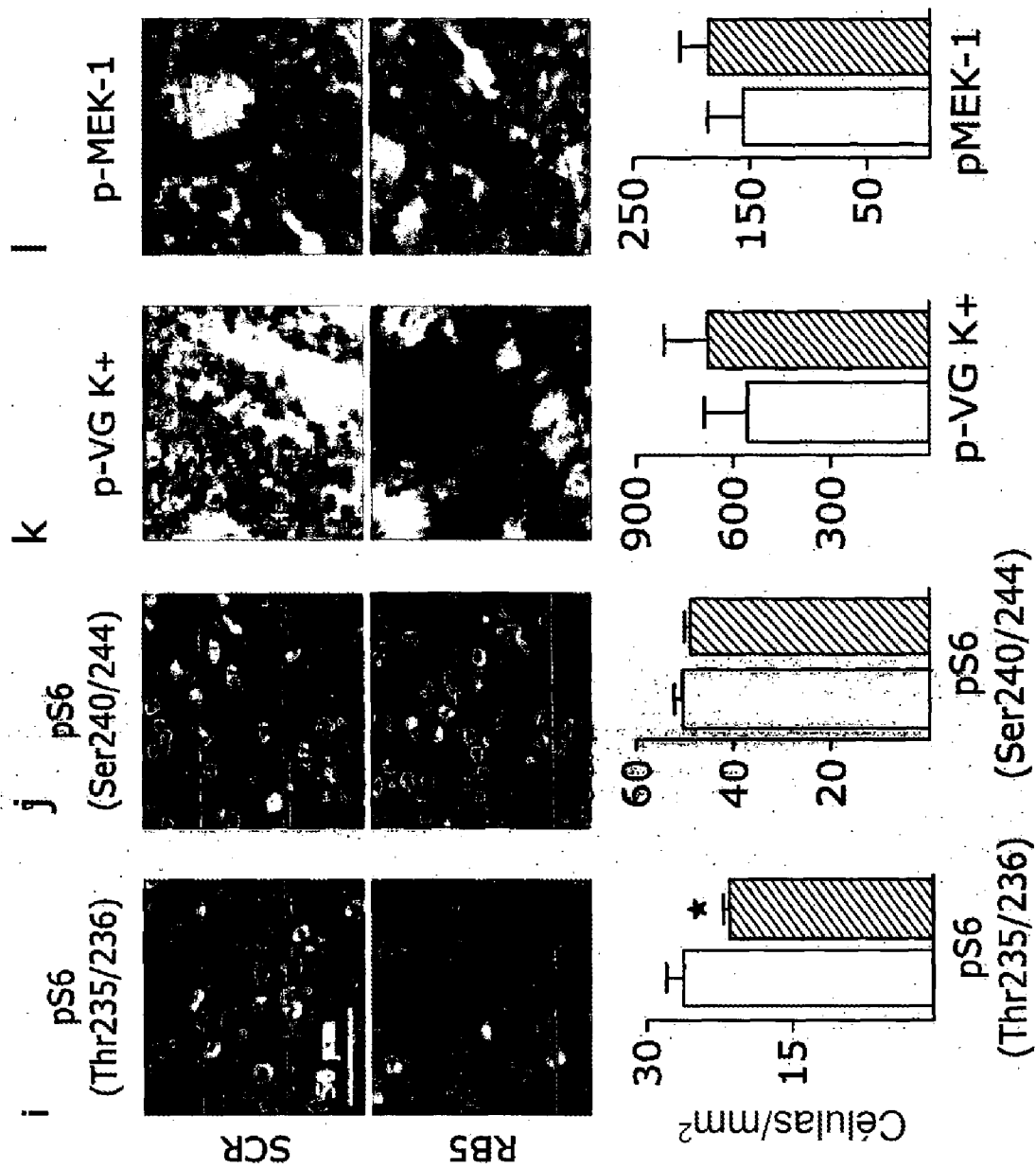


Figura 1 continuación



Ruta nuclear

Figura 1 continuación



Ruta citoplásmica

Figura 1 continuación

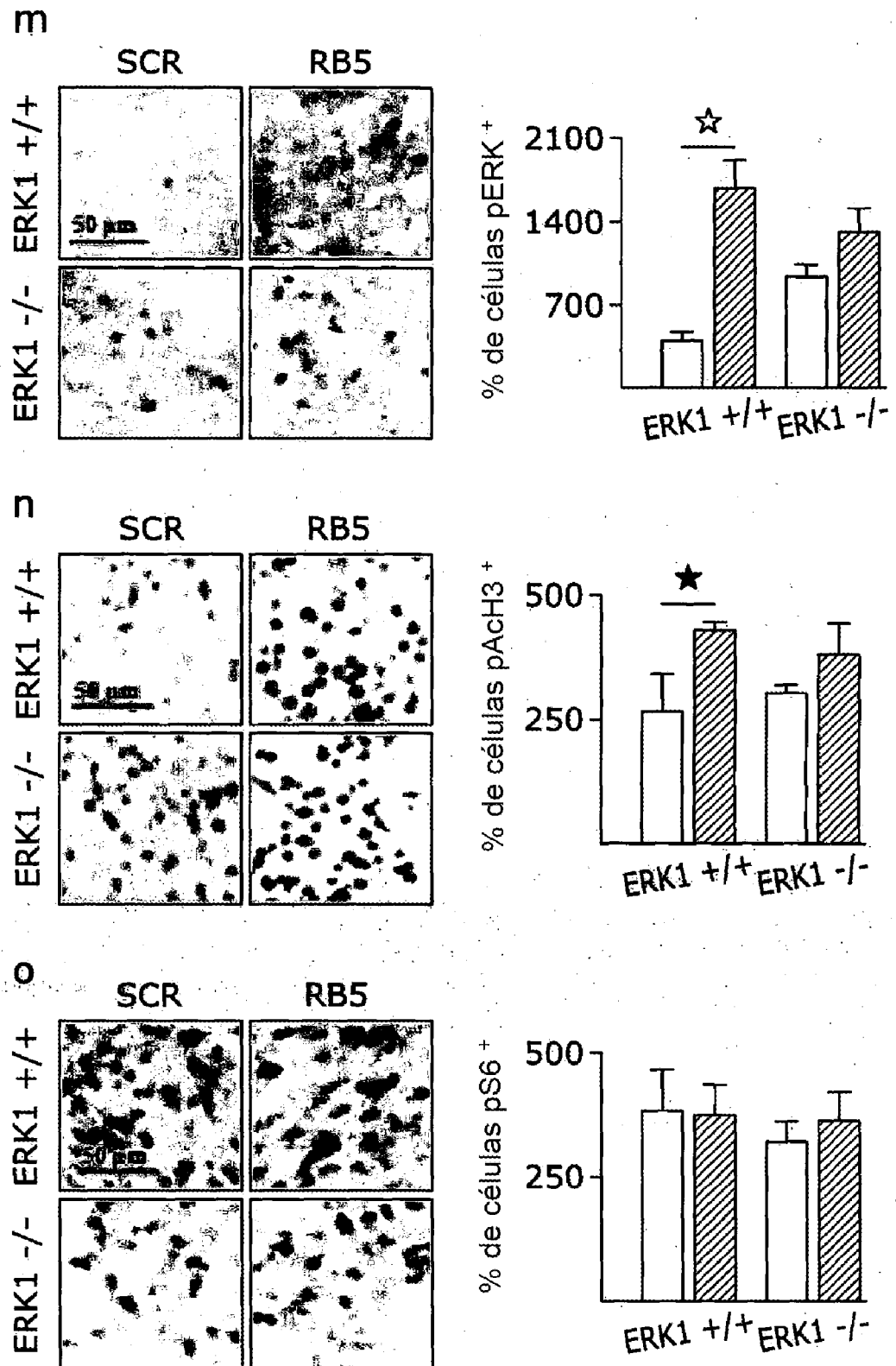


Figura 1

p

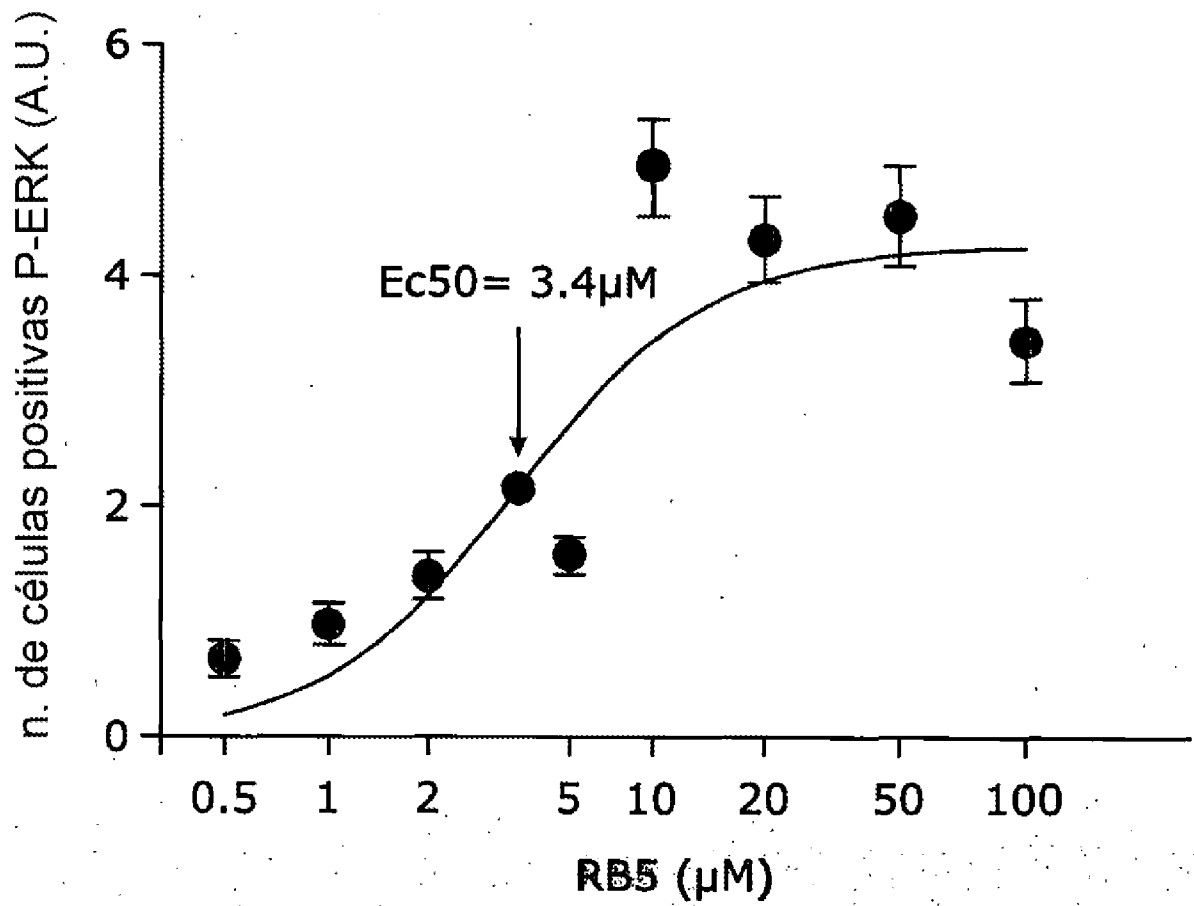


Figura 1 continuación

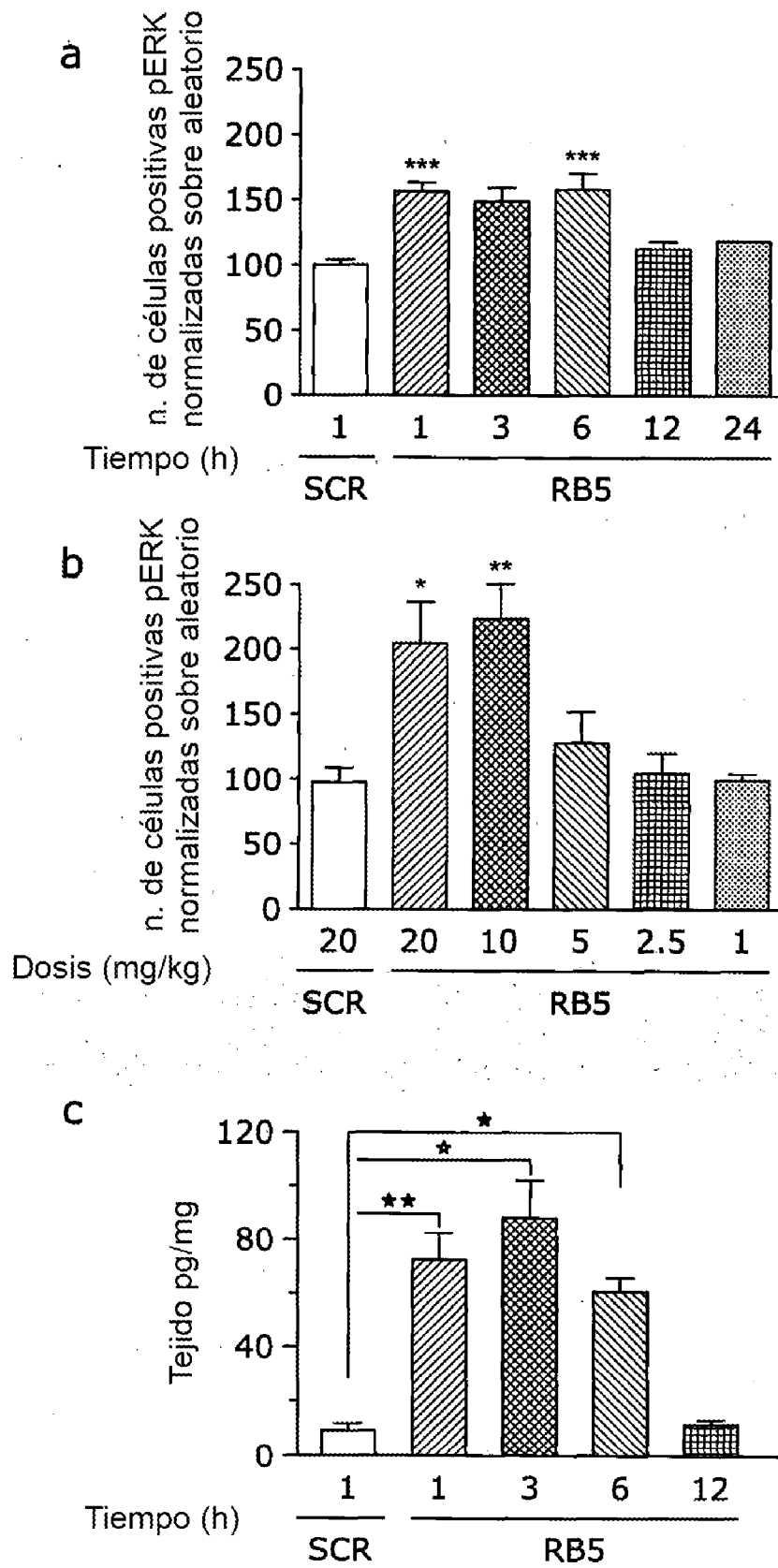


Figura 2

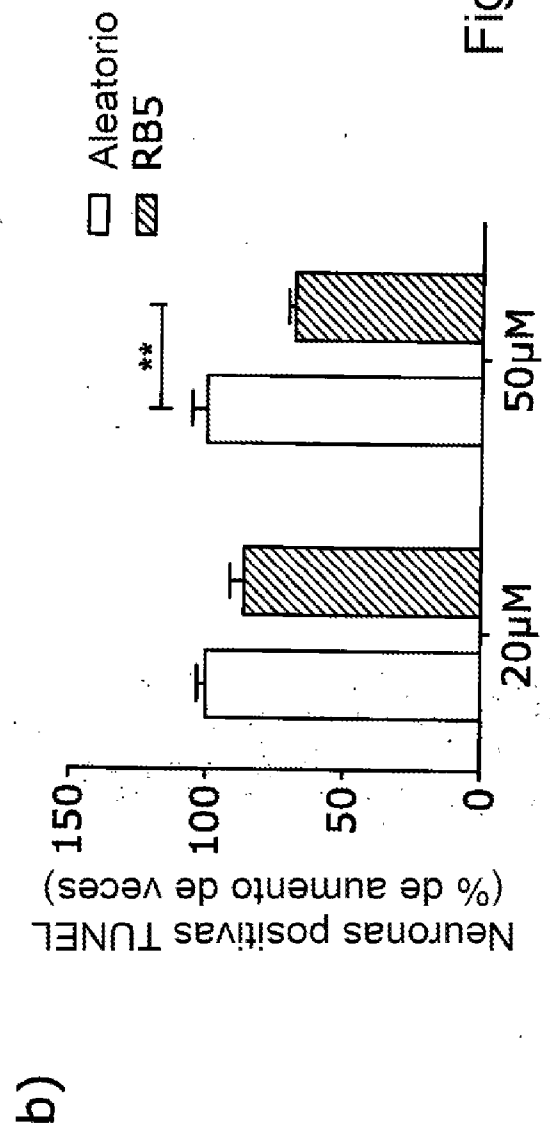
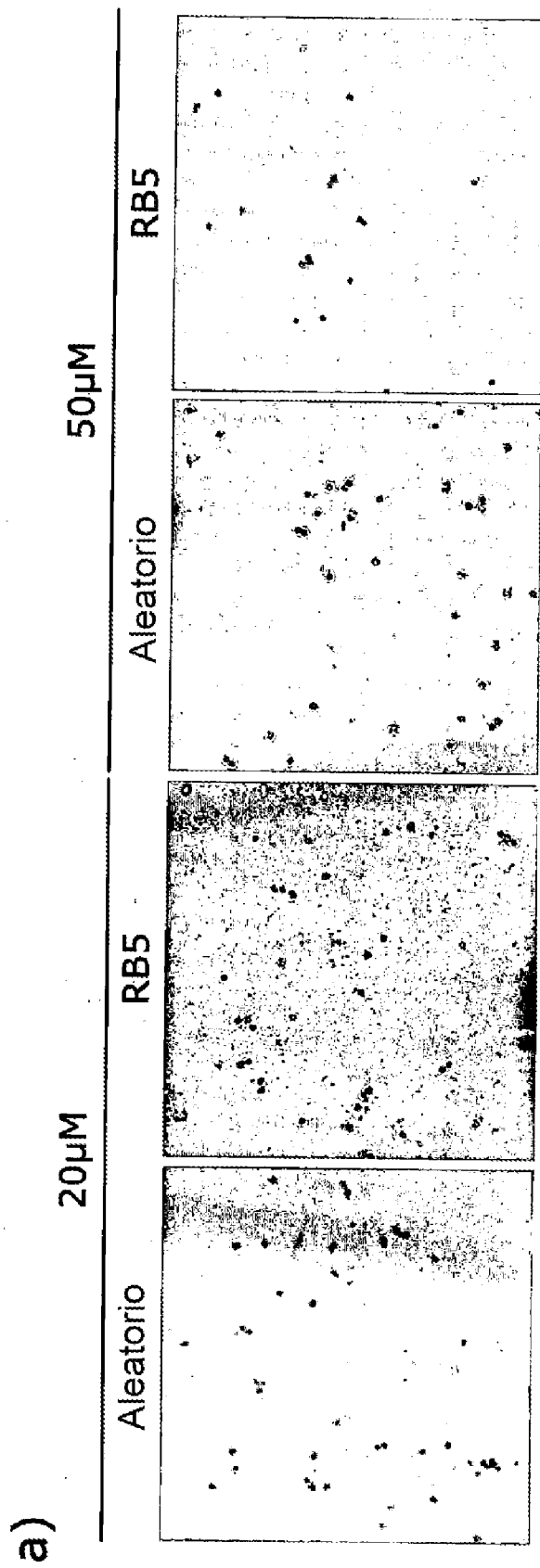


Figura 3

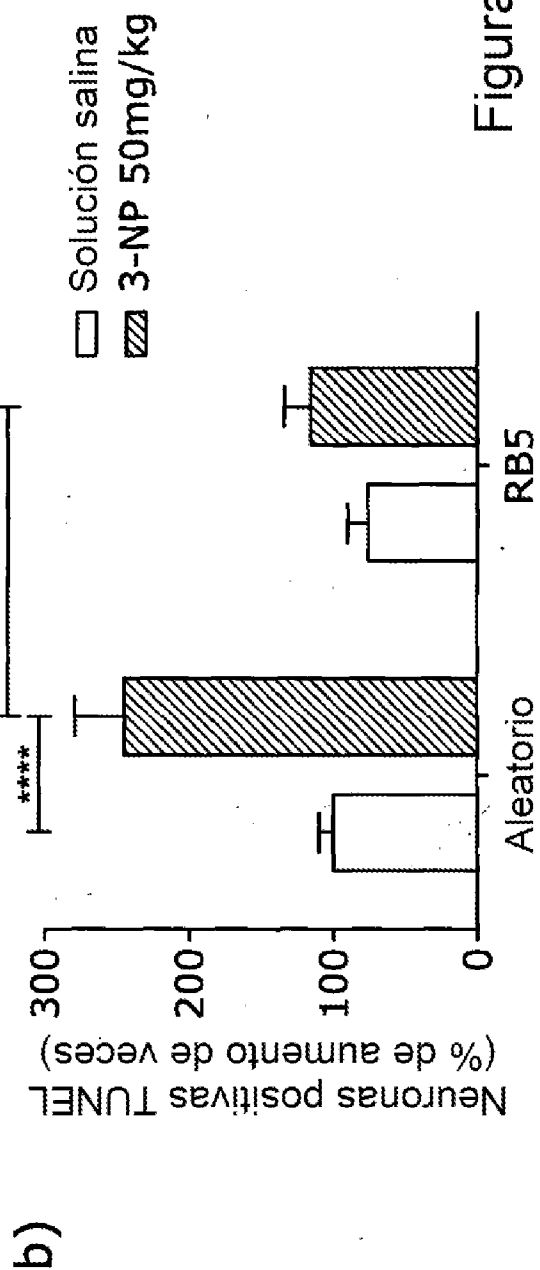
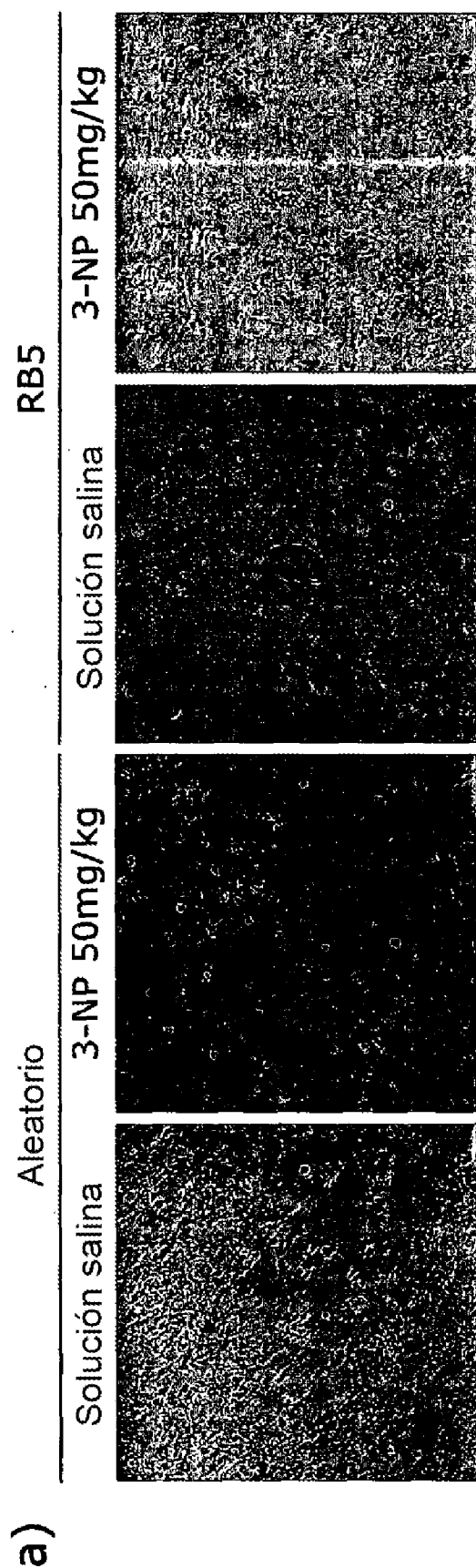


Figura 4

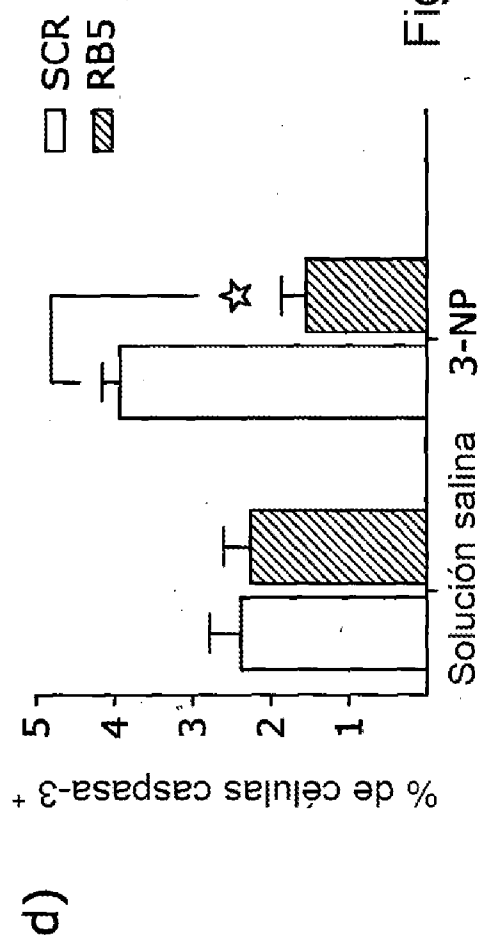
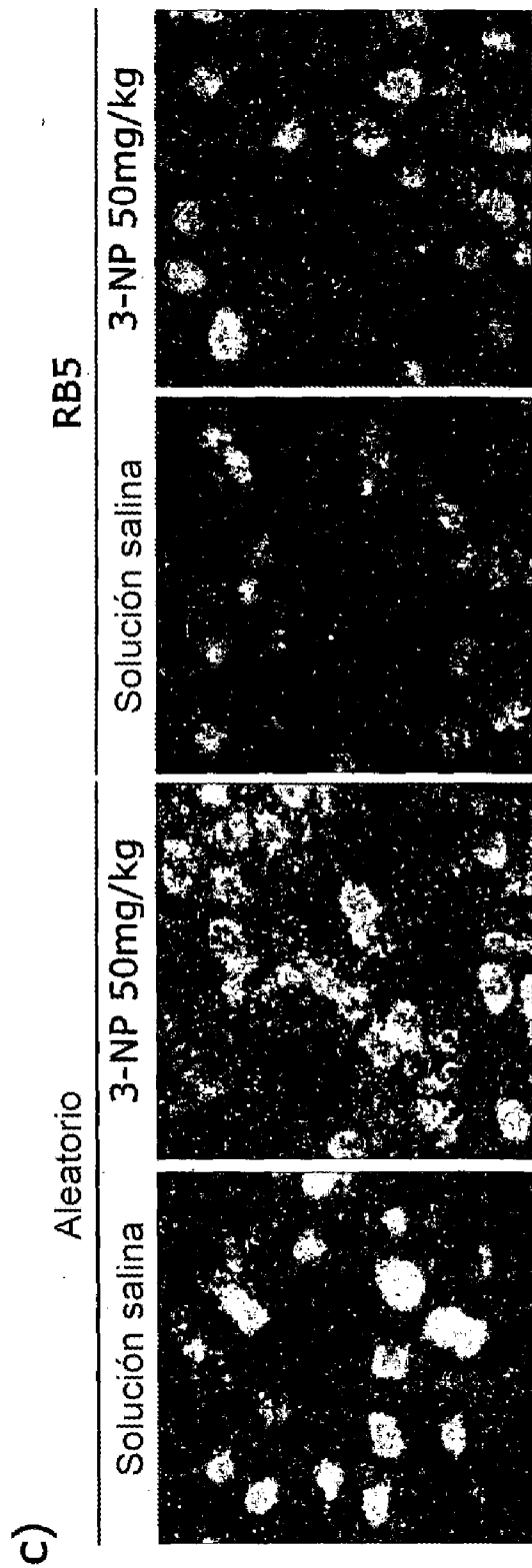


Figura 4 continuación

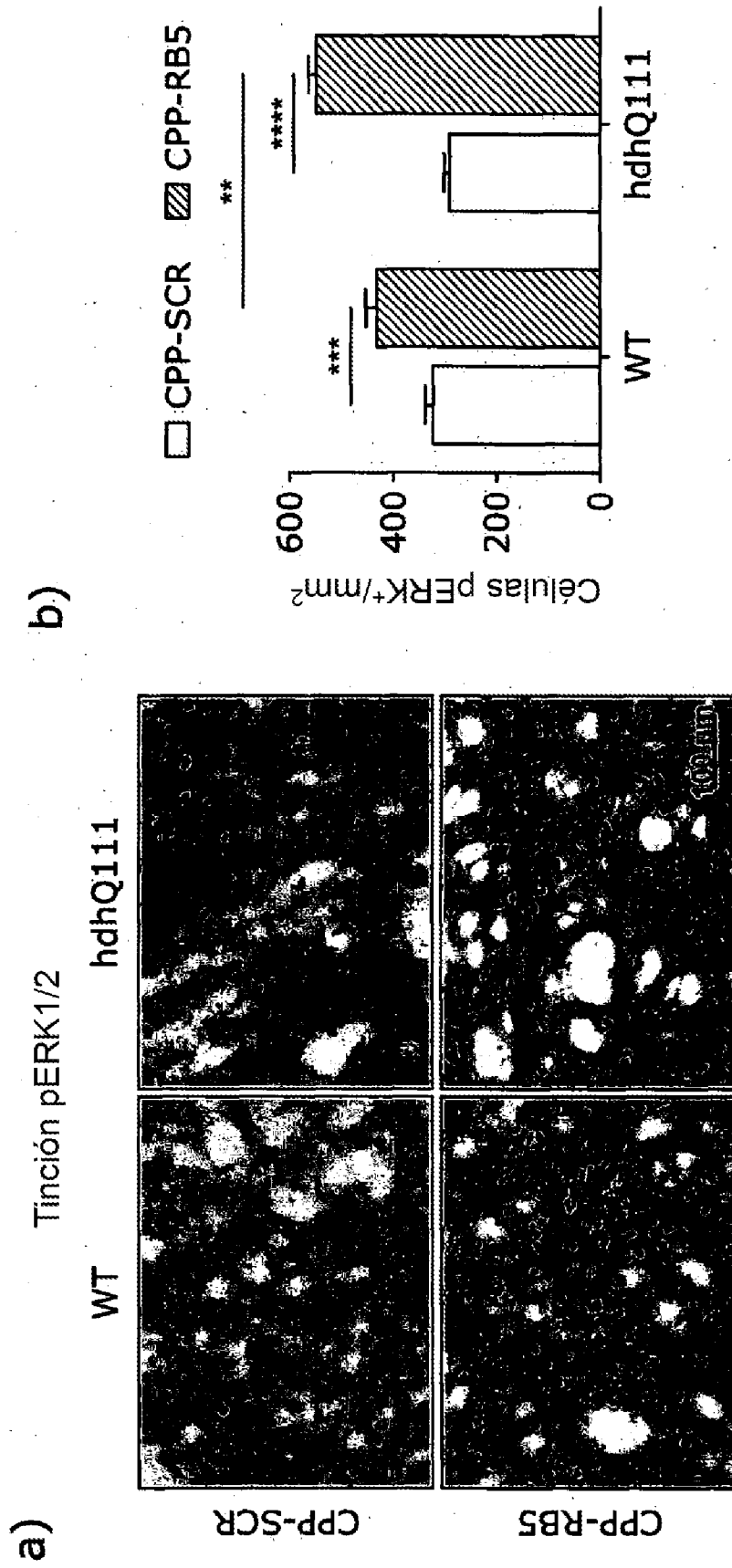


Figura 5

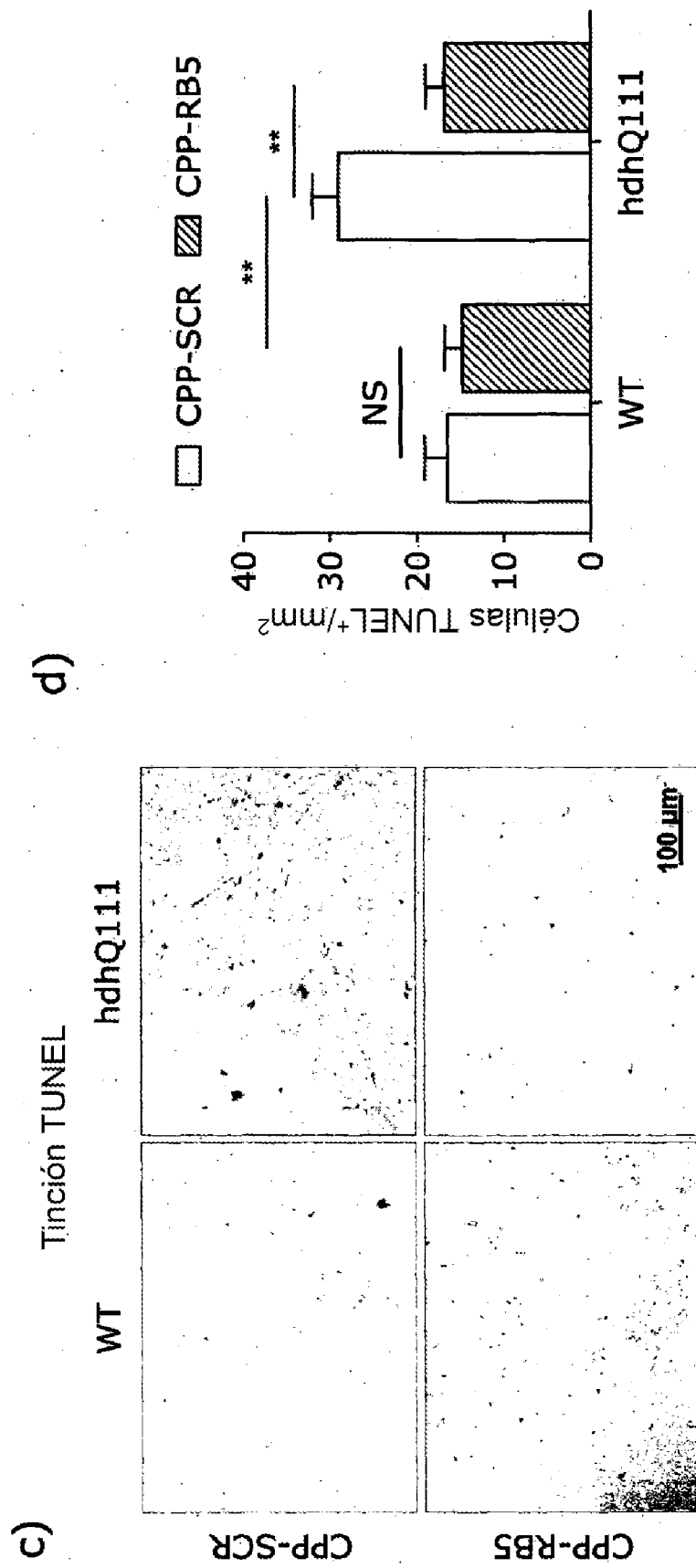


Figura 5 continuación

e)

Tinción caspasa-3 dividida

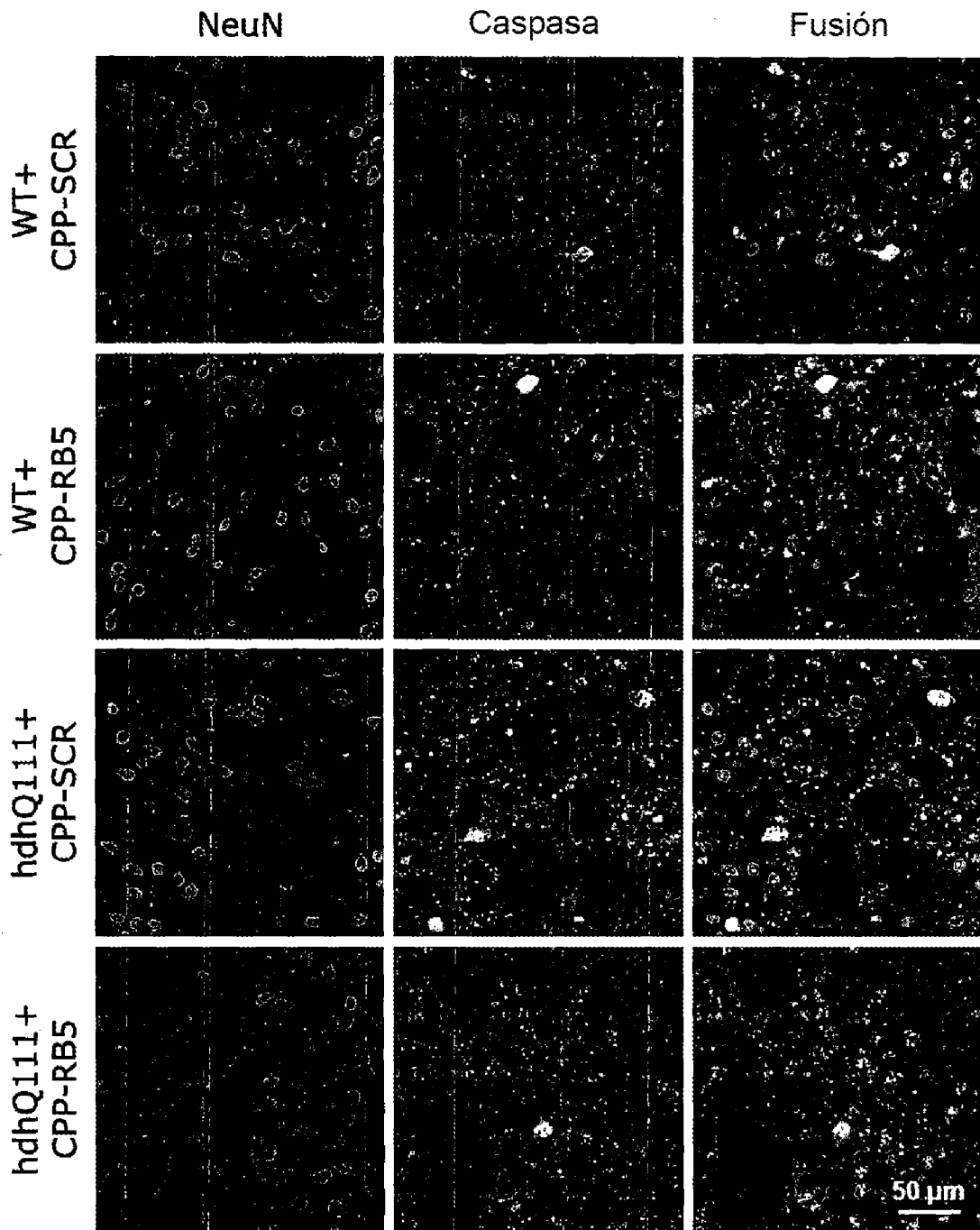


Figura 5 continuación

f)

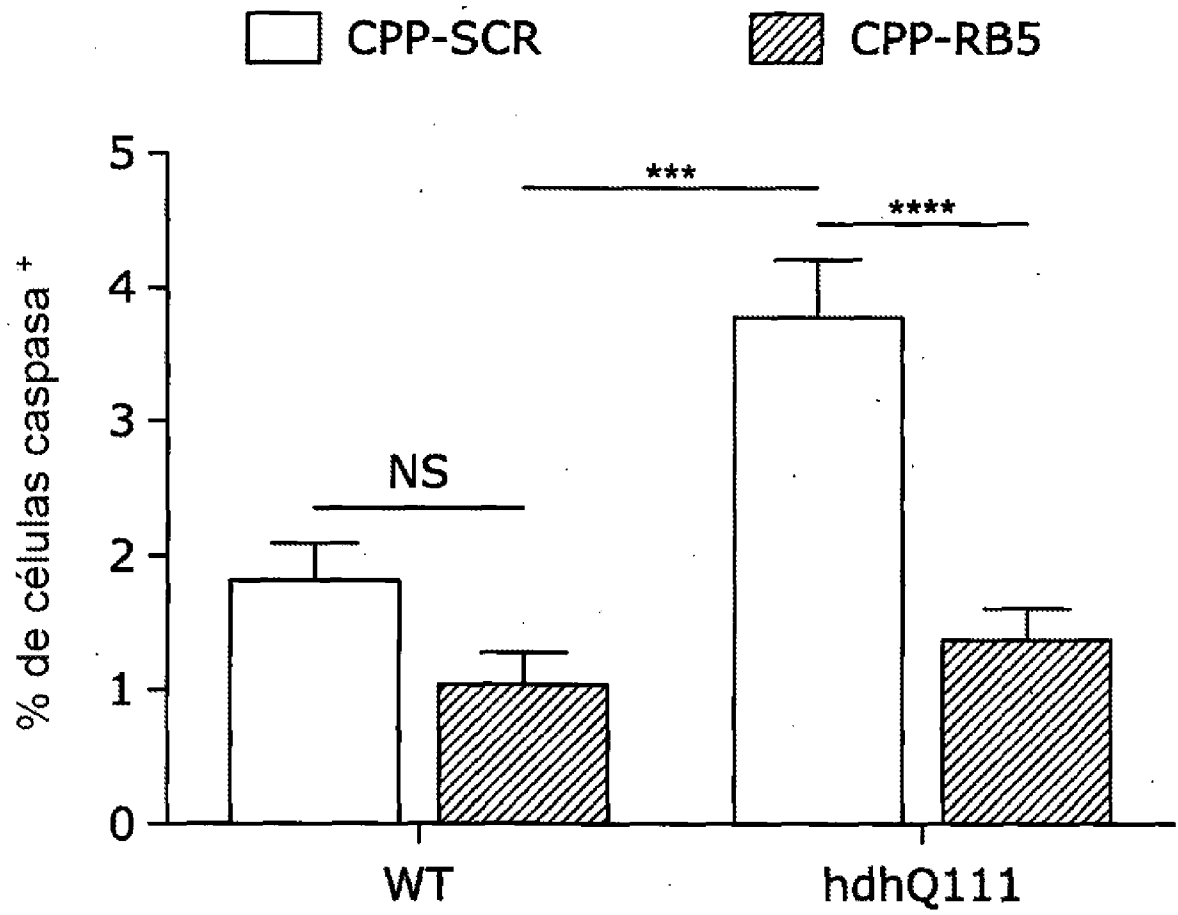


Figura 5 continuación

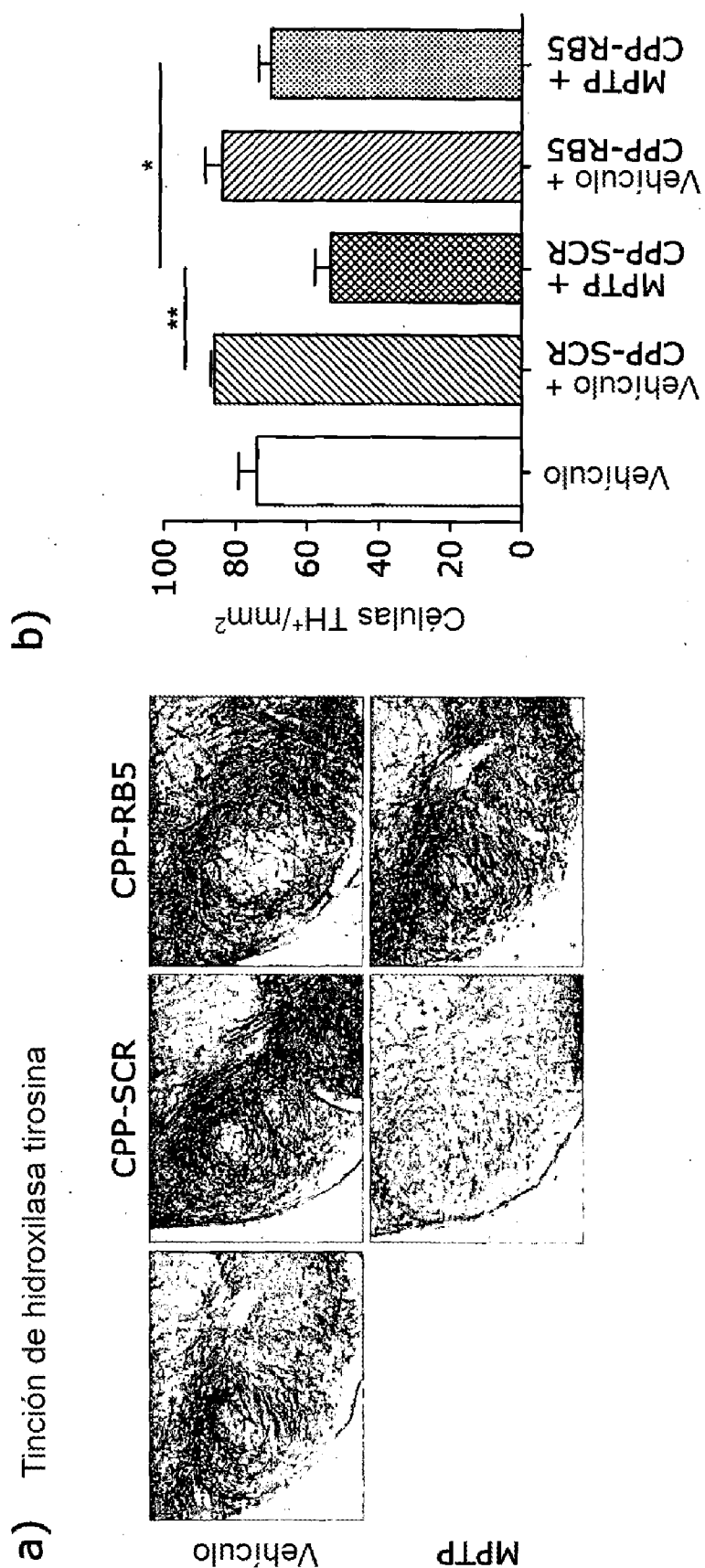


Figura 6

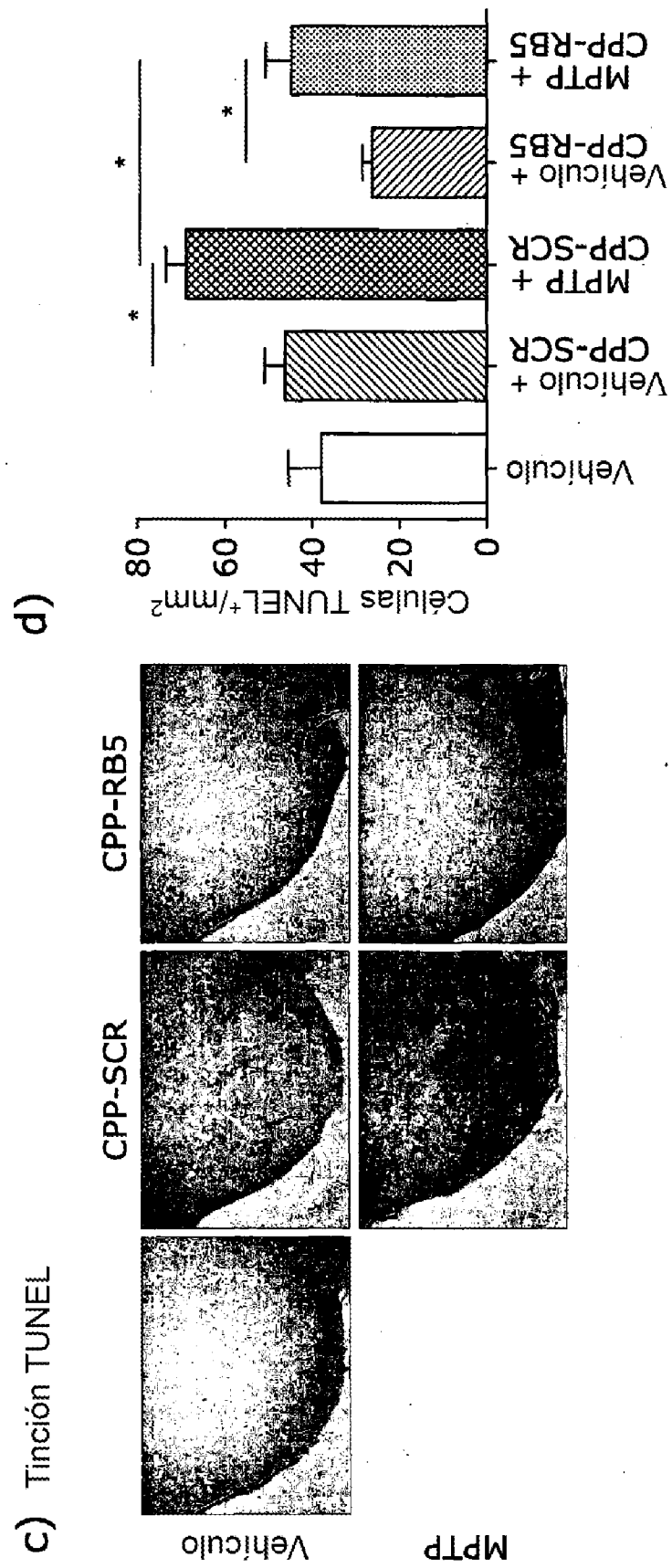


Figura 6 continuación

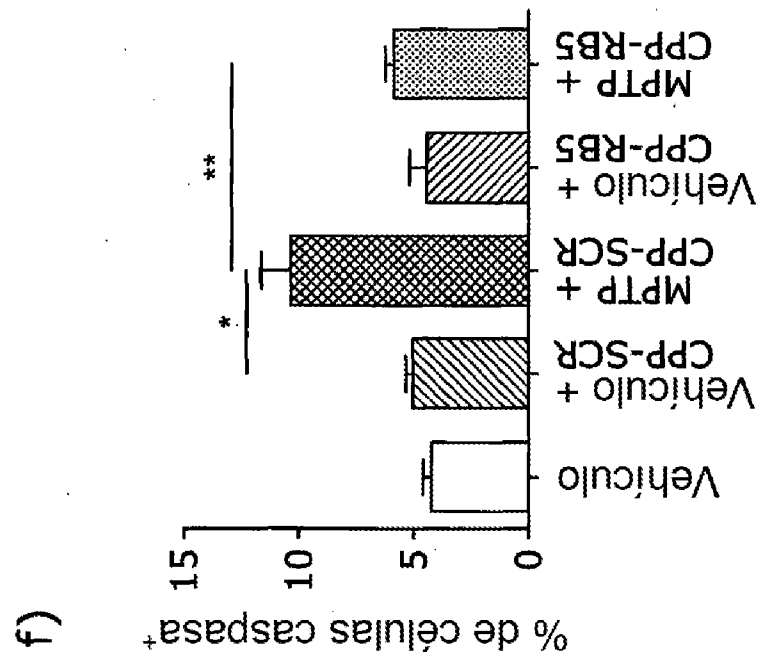
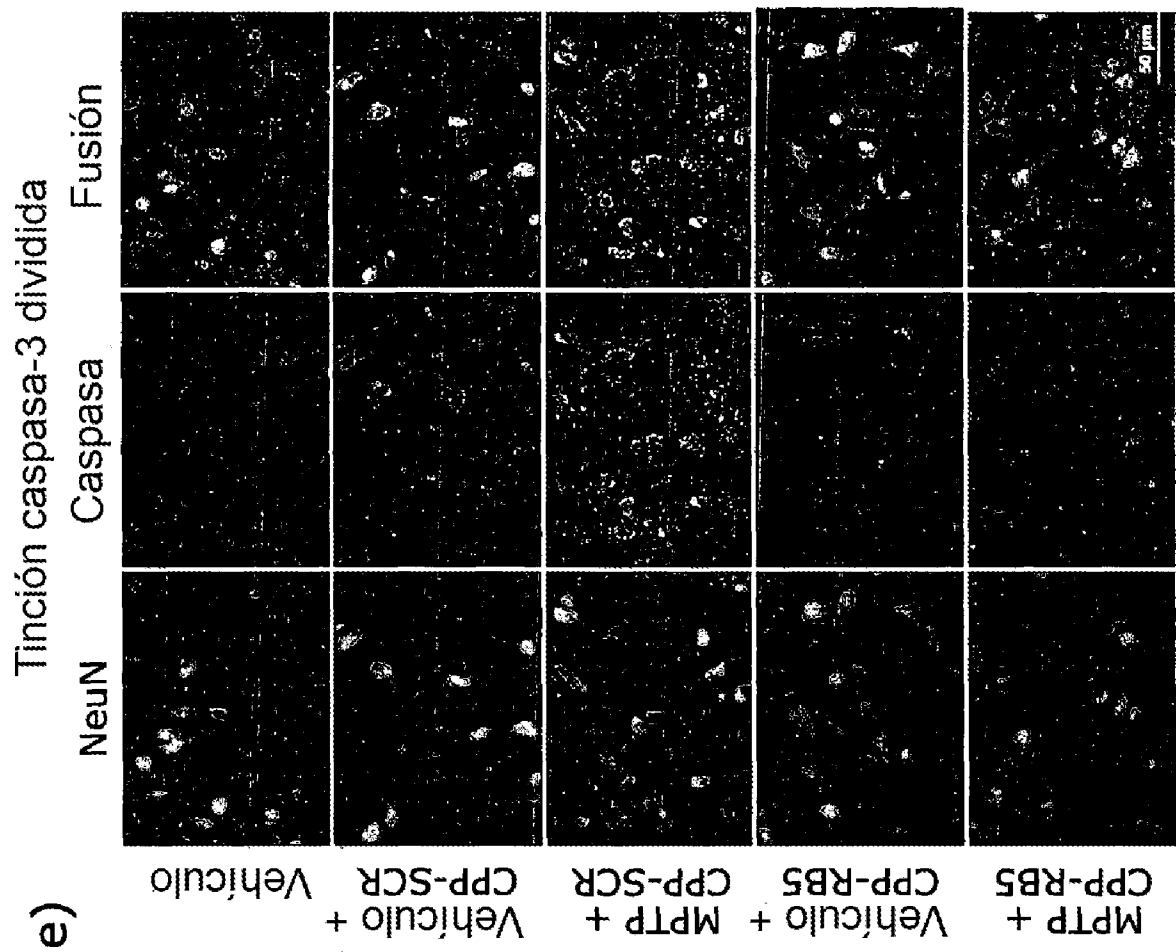


Figura 6 continuación

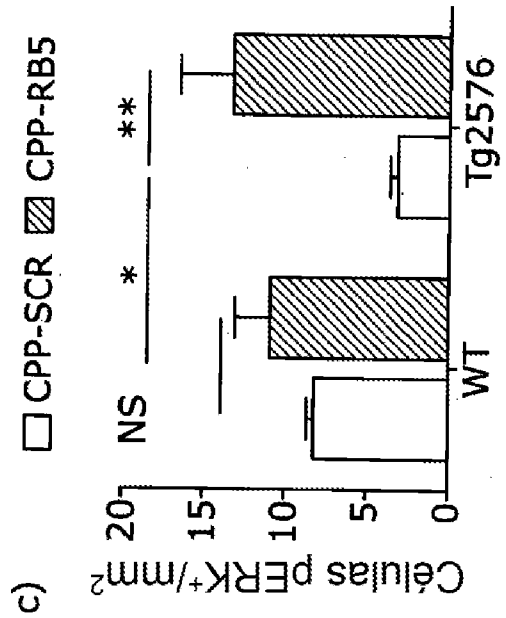
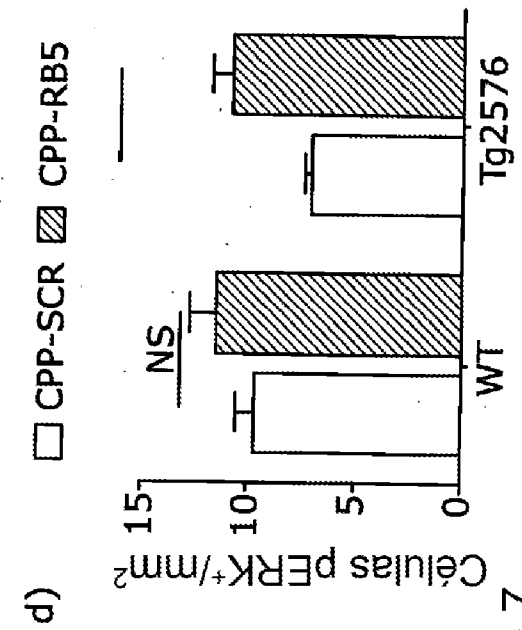
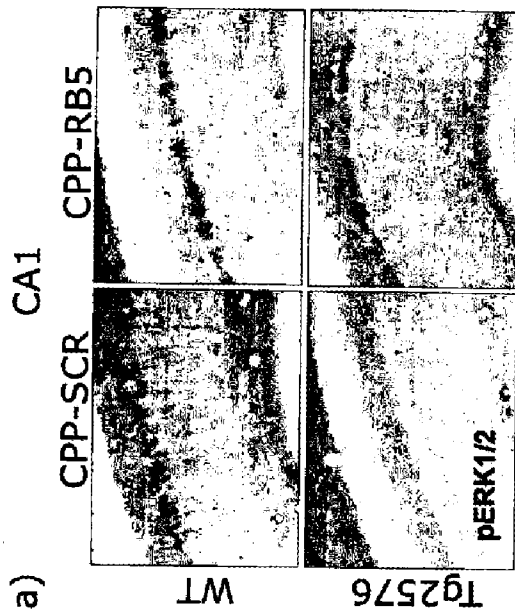
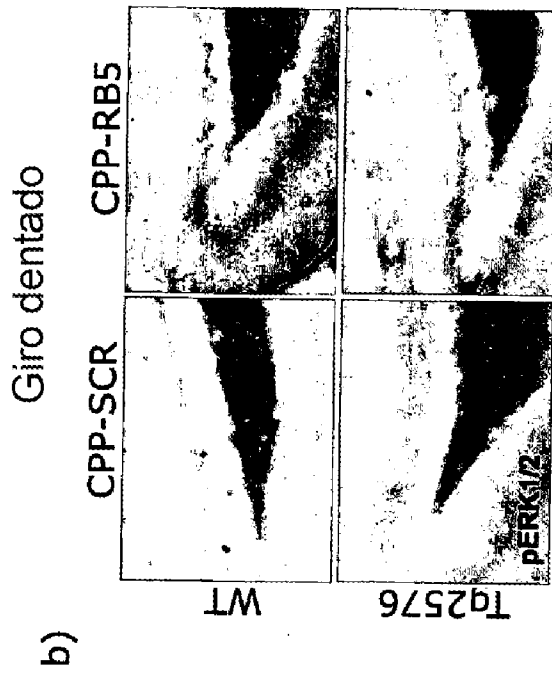


Figura 7

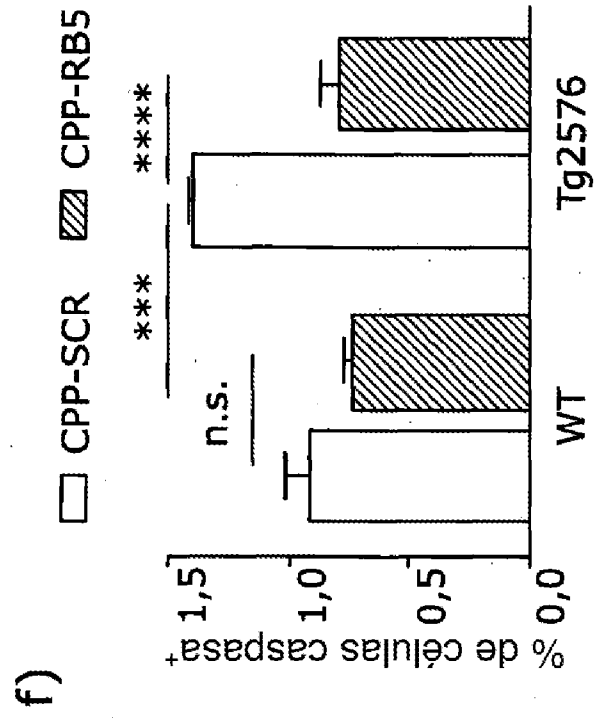
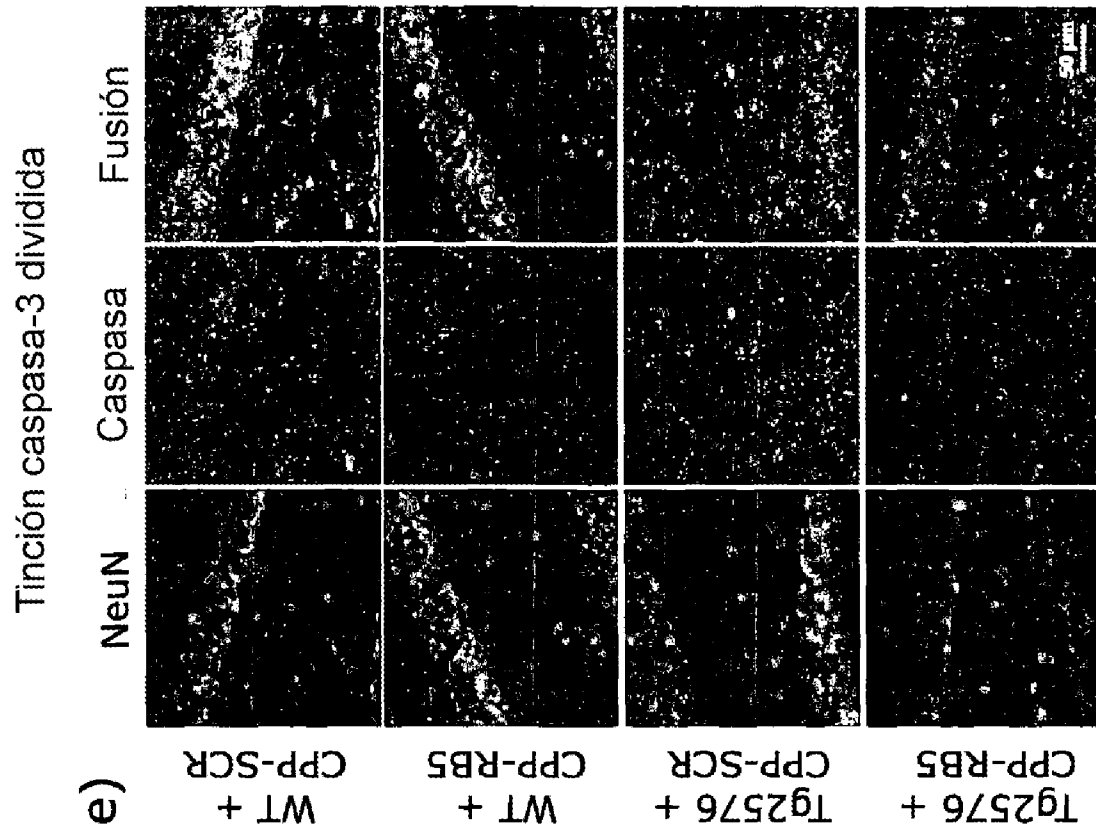


Figura 7 continuación

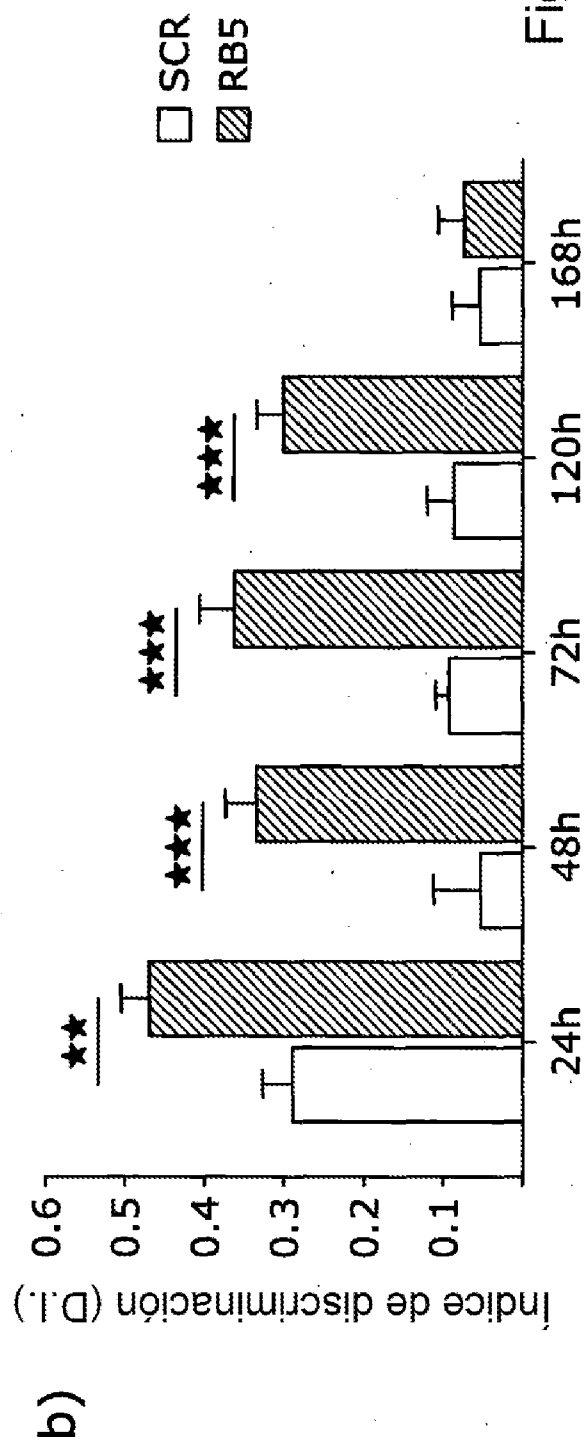
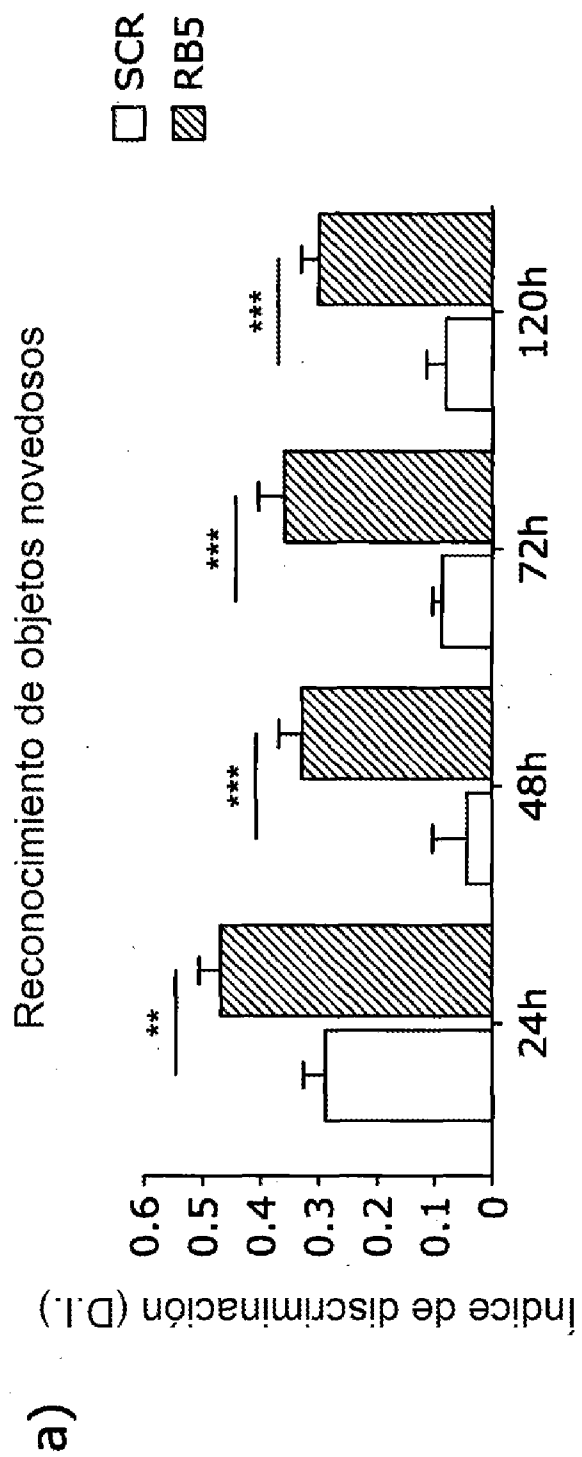


Figura 8

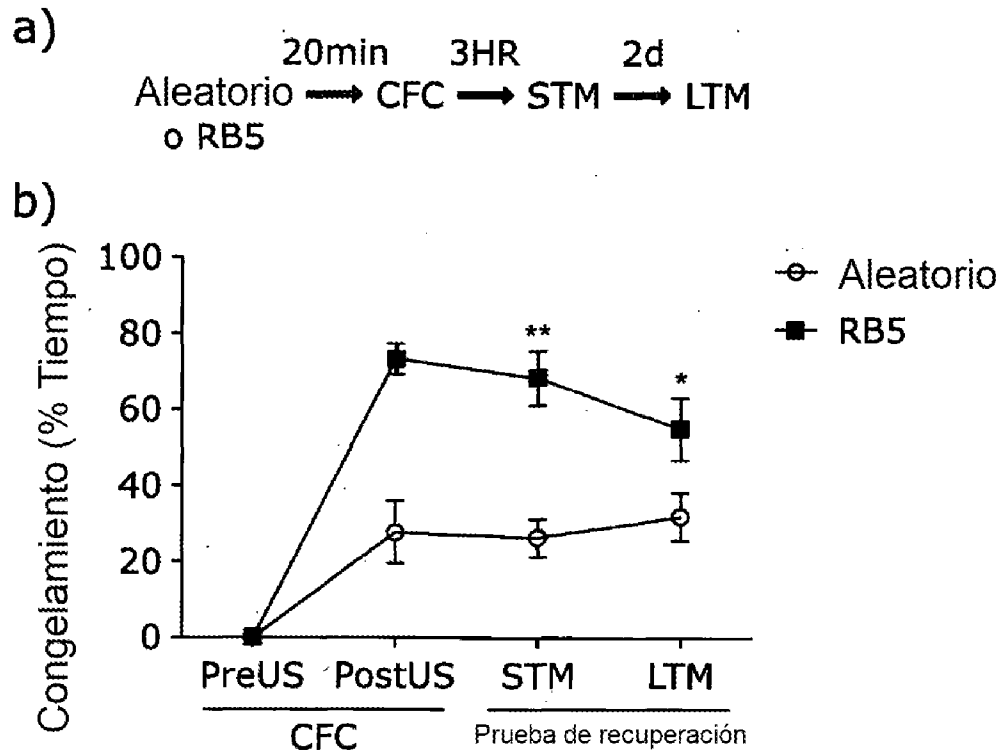


Figura 9

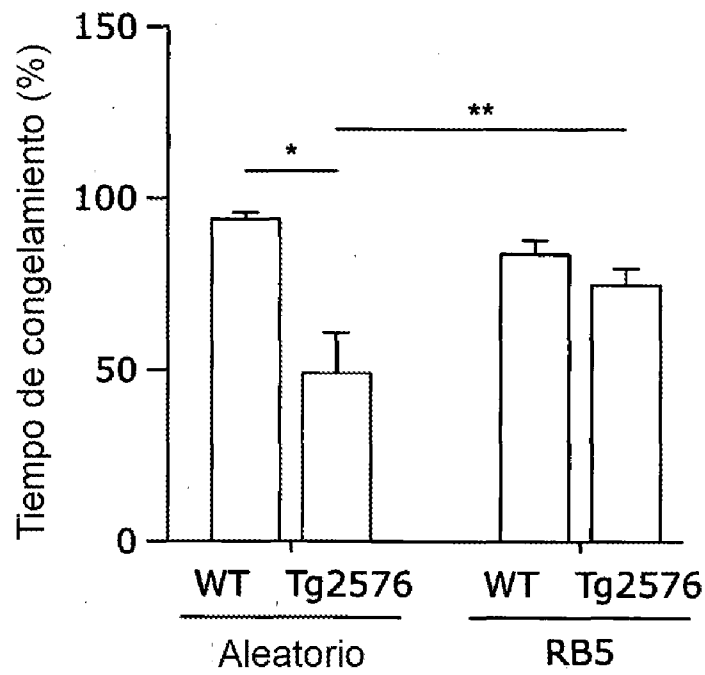


Figura 10

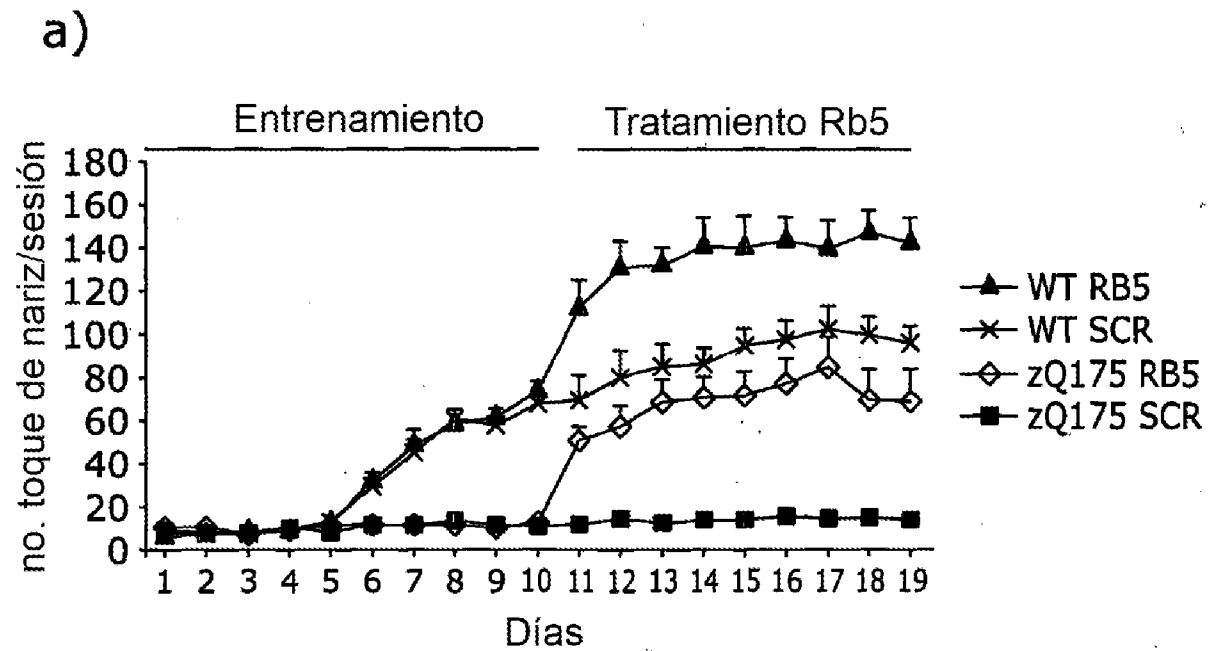


Figura 11