

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
16 de julio de 2015 (16.07.2015)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/104443 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

s/n, Centro de Actividades Ambulatorias, 6ª planta Bloque D, E-28041 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2015/070004

(74) Mandatario: FUSTER OLAGUIBEL, Gustavo; Pº de la Habana, 9-11, E-28036 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
8 de enero de 2015 (08.01.2015)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201430015 8 de enero de 2014 (08.01.2014) ES

(71) Solicitantes: SERVICIO ANDALUZ DE SALUD [ES/ES]; Avda de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). UNIVERSIDAD DE SEVILLA [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES). FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE [ES/ES]; Avda de Córdoba, s/n, Centro de Actividades Ambulatorias, 6ª Planta Bloque D, E-28041 Madrid (ES). CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS (CIBERNED) [ES/ES]; Valderrebollo, 5, E-28031 Madrid (ES).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores: TAVARES VAZQUEZ, Eva; Avda de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). MIÑANO SÁNCHEZ, Javier; Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES). CARRO DÍAZ, Eva María; Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda de Córdoba,

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: N-PROCALCITONIN-MODULATING AGENTS FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

(54) Título : AGENTES MODULADORES DE N-PROCALCITONINA PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

(57) Abstract: The invention relates to the use of an isolated peptide, an antibody or a fusion protein that can bind to NPCT, and the compositions and pharmaceutical forms comprising same, in the development of a medicament for the treatment and/or prevention of diseases related to the increase in beta-amyloids and/or tau hyperphosphorylation and/or neurotoxicity induced by domoic acid.

(57) Resumen: El uso de un péptido aislado, de un anticuerpo o de una proteína de fusión con capacidad de unión a la NPCT, y de las composiciones y formas farmacéuticas que los comprenden, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades relacionadas con el incremento de beta-amiloideas y/o hiperfosforilación de tau y/o neurotoxicidad inducida por ácido domoico.



WO 2015/104443 A1

Agentes moduladores de N-procalcitonina para la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Campo de la invención

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología y la medicina. Se refiere al uso de agentes moduladores, preferiblemente inhibidores de la actividad biológica de la N-procalcitonina , y más preferiblemente péptidos y/o anticuerpos capaces de unirse a la N-procalcitonina en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa de carácter progresivo, de origen todavía desconocido, y frente a la que actualmente no se puede ofrecer ningún tratamiento capaz de curarla o prevenirla. Dicha enfermedad afecta a
15 entre el 5 y el 7% de las personas de más de sesenta y cinco años y es la causa de invalidez y dependencia más frecuente, en la actualidad, entre las personas de edad avanzada. Se estima que 8 millones de europeos están afectados por la enfermedad de Alzheimer y, teniendo en cuenta el envejecimiento de la población, se prevé que el número de enfermos se duplique en 2020 y triplique en 2050.

20

A nivel neuropatológico la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la aparición de dos estructuras anormales que se acumulan en el cerebro. Estas estructuras son los depósitos amiloides y las placas neurofibrilares. En los cerebros de pacientes con EA las placas amiloides que contienen agregados de beta-amiloide aparecen en regiones
25 cerebrales específicas, desencadenando una respuesta inflamatoria, muerte neuronal y deterioro cognitivo progresivo. Uno de los mecanismos por los cuales el péptido beta-amiloide se genera a partir de la proteína precursora amiloidea o APP (del inglés Amyloid-Precursor-Protein) es la ruptura de APP en una posición extracelular (sitio beta) seguido por una ruptura inusual dentro del segmento transmembrana de APP
30 (sitio gamma), generando un fragmento de APP que contiene 39-43 aminoácidos. Varias mutaciones en la proteína APP han sido correlacionadas con la EA debido al incremento o alteración en la transformación de APP en beta-amiloide, en particular la

transformación de APP a cantidades grandes de la forma larga de beta-amiloide (es decir beta-amiloide 40 y beta-amiloide 42). El péptido beta-amiloide (BA) no solo ha sido encontrado en la enfermedad de Alzheimer (EA) sino que se puede observar en otras situaciones neurológicas como por ej. el síndrome de Down, que posee una copia extra del cromosoma 21, en el cual se localiza la APP, estos individuos desarrollan alteraciones neuropatológicas parecidas a la EA, cuando superan los 40 años, situación que parece estar relacionada con la formación de BA (Head y Lott, 2004). Otras enfermedades que presentan acumulación de este péptido son las demencias asociadas a cuerpos de Lewy, la angiopatía amiloide cerebral y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Varges *et al.*, 2011, *J Alzheimers Dis* 23:717-726; Viswanathan & Greenberg, 2011. *Ann Neurol* 70:870-880).

Las marañas neurofibrilares, son filamentos intracelulares formados por la polimerización de la proteína tau, que de forma normal actúa como una proteína asociada a los microtúbulos de los axones neuronales. Estas estructuras, las cuales se acumulan en el citoplasma de las neuronas degeneradas, fueron denominadas "filamentos pareados helicoidales" o PHFs. Estos presentan características diferentes a los neurofilamentos y microtúbulos normales. El constituyente fundamental de los PHFs es la proteína tau fosforilada. La hiperfosforilación de tau es debida, bien a un incremento de la expresión de tau por lo que existe mayor cantidad de sustrato susceptible de ser fosforilado, o bien por una hiperfosforilación por parte de las kinasas. Esta fosforilación proteica aberrante de tau, se encuentra íntimamente relacionada con la agregación anómala de dicha proteína.

La fosforilación proteica aberrante está íntimamente asociada a la agregación patológica de la proteína asociada a microtubulos tau. Las enfermedades relacionadas con alteraciones en la hiperfosforilación de la proteína tau comprenden actualmente unas 22 patologías que incluyen entre otras la enfermedad de Alzheimer, la demencia del lóbulo frontal (también llamada neurodegeneración frontotemporal), degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y la enfermedad de Parkinson con demencia

Por otro lado, existen multitud de otras enfermedades que cursan con alteraciones

simultáneas en ambas proteínas además del Alzheimer, como por ejemplo, aunque sin limitarse, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann- Straussler-Scheinker.

Inicialmente se desarrollaron estudios para tratar de dilucidar de forma independiente cual era la implicación tanto de tau como de β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Además, las primeras aproximaciones al tratamiento de la enfermedad, iban dirigidas a la mejora de los efectos de cada una de estas proteínas también de forma independiente. En la actualidad, los estudios llevados a cabo demuestran que ambas proteínas podrían estar relacionadas, ya que los depósitos amiloides pueden afectar diferentes vías moleculares que facilitan la fosforilación de tau y su posterior agregación (Blurton-Jones *et al.*, 2006. *Current Alzheimer Research* 3(5), 435-448). Los depósitos amiloides pueden activar diversas quinasas específicas que aumentan la hiperfosforilación de la proteína tau y por ello la formación de marañas neurofibrilares. A pesar de dicha relación, otros estudios llevados a cabo, indican que la mejora de la alteración en una de las proteínas no tiene porque llevar unida la mejora de la otra, llegando en algunos casos incluso a empeorarla (Oddo *et al.*, 2005. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 102(8), 3046-51). Por ello es necesario realizar estudios en modelos que presenten ambas patologías de forma simultánea. En la actualidad existen varios tratamientos para el Alzheimer que no permiten la curación de la enfermedad sino que actúan retardando el progreso de la misma.

Es necesario, por tanto, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Breve descripción de la invención

Un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de un agente modulador de la actividad biológica de N-procalcitonina (N-PCT) y/o procalcitonina (PCT) de ahora en adelante N-PCT/PCT, preferiblemente de la N-procalcitonina (N-PCT o NPCT), en la

elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, o alternativamente, a un agente modulador de la actividad biológica de N-PCT/PCT, preferiblemente de la N-PCT para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el agente modulador se selecciona de la lista que consiste en: a) una molécula orgánica, b) una molécula de RNA, c) un oligonucleótido antisentido, d) un péptido o anticuerpo, o e) una ribozima, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, el agente modulador es un
10 péptido aislado, de ahora en adelante péptido de la invención, o un anticuerpo con capacidad de unión a la N-procalcitonina (N-PCT), de ahora en adelante anticuerpo de la invención. Aún más preferiblemente, dicho agente modulador, por ejemplo dicho péptido aislado o anticuerpo, neutraliza, reduce y/o inhibe la actividad biológica de N-PCT *in vitro* y/o *in vivo*. Preferiblemente, dicho agente modulador es un inhibidor de la
15 actividad biológica de N-PCT *in vitro* y/o *in vivo*.

Dicho agente modulador de la actividad biológica de N-procalcitonina (N-PCT) presenta capacidad de unión a N-PCT/PCT, donde N-PCT es un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, un péptido de secuencia SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento
20 biológicamente activo de los mismos. Preferiblemente, dicho agente modulador presenta capacidad de unión a N-PCT, más preferiblemente a la secuencia SEQ ID NO: 3 situada en su extremo C-terminal, más preferiblemente a los últimos 7 residuos del extremo C-terminal. .

25 Asimismo, preferiblemente dicho agente modulador presenta un efecto neuroprotector caracterizado por:

- reducir la neurotoxicidad inducida por el péptido beta-amiloide *in vitro*;
- reducir la pérdida neuronal *in vivo*, preferiblemente en un modelo de neurotoxicidad inducida por ácido domoico o en un modelo de ratón transgénico
30 de la amiloidosis.

En una realización preferida, la inhibición de la actividad biológica de N-PCT se caracteriza por presentar al menos uno de los efectos siguientes:

- neuroprotección *in vitro*, preferiblemente determinada como reducción de la neurotoxicidad inducida por el péptido beta-amiloide *in vitro*;
- neuroprotección *in vivo*, preferiblemente determinada como reducción de la pérdida neuronal *in vivo*, por ejemplo en un modelo de neurotoxicidad inducida por ácido domoico o en un modelo de ratón transgénico de amiloidosis; y/o
- reducción de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y/o quimiocinas *in vivo* preferiblemente determinada en un modelo de ratón transgénico de amiloidosis.

Aún más preferiblemente, dicho agente modulador es un péptido aislado. Más preferiblemente, dicho péptido se ha obtenido por un procedimiento de *biopanning*.

En otra realización preferida, dicho agente modulador es un anticuerpo o un fragmento del mismo donde dicho fragmento retiene la capacidad de unión al antígeno. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab (del inglés, "Fragment antigen-binding"); un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fv; o un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) e.g., Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. Dichos fragmentos de anticuerpo son obtenidos por técnicas conocidas por un experto en la materia, y la función de dichos fragmentos es evaluada del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Preferiblemente, dicho anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento que comprende:

- a) inmunizar un animal mamífero con un péptido que consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, una variante o fragmento del mismo, donde preferiblemente dicha variante consiste esencialmente en un péptido de

secuencia SEQ ID NO: 2 y preferiblemente dicho fragmento consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 3

- b) opcionalmente, adicionar una cisteína en uno de los extremos de dicho péptido y/o conjugar el péptido con un adyuvante;
- 5 c) extraer el antisuero del animal,
- d) purificar los anticuerpos, preferiblemente con una columna de proteína A, y
- e) opcionalmente, purificar los anticuerpos que se unen específicamente a N-PCT.

En una realización preferida, dicho anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento
10 que comprende:

- a) adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, de secuencia SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento biológicamente activo de los mismos, preferiblemente de secuencia SEQ ID NO: 3,
- 15 b) conjugar el péptido con KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*),
- c) inmunizar un animal mamífero con un péptido según (b),
- d) extraer el antisuero del animal, y
- e) purificar el/los anticuerpo(s) que reconoce(n) específicamente N-procalcitonina.

20 Alternativamente, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y se ha obtenido por un procedimiento que comprende:

- a) inmunizar un animal mamífero con un péptido que consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, una variante o fragmento del mismo, donde
25 preferiblemente dicha variante consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 2 y preferiblemente dicho fragmento consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 3
- b) opcionalmente, adicionar una cisteína en uno de los extremos de dicho péptido y/o conjugar el péptido con un adyuvante;
- 30 c) obtener el suero de dicho(s) animal(es) y analizar el título de anticuerpos que se unen a dicho péptido, preferiblemente por ELISA, ,

- d) obtener los esplenocitos de dicho(s) animal(es) y e inmortalizarlos,
- e) expandir los clones, y
- f) opcionalmente, seleccionar los mejores productores.

5 En una realización preferida, el anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento que comprende:

- a) adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, de secuencia SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento biológicamente activo de los mismos.
- 10 b) conjugarla con KLH,
- c) inmunizar uno o varios animales mamíferos con un péptido según (b),
- d) analizar la titulación frente al péptido del paso (b) por ELISA, en el animal mamífero del paso (c),
- e) obtener los esplenocitos de uno o varios de dichos animales para la
- 15 generación de líneas celulares inmortalizadas o hybridomas,
- f) expandir los clones,
- g) seleccionar los mejores productores.

Aún más preferiblemente, el péptido del paso (a) es el péptido de secuencia SEQ ID
20 NO: 3, o una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo. Aún más preferiblemente, es un péptido recombinante.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere al uso de una proteína de fusión que comprende:

- 25 a) un péptido de la invención; y
- b) un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula,

en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, o alternativamente, a una proteína de fusión
30 que comprende:

- a) un péptido de la invención; y

b) un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula,

para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

- 5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En una realización más preferida, la proteína de fusión comprende, además, un péptido espaciador situado entre el péptido de la invención [péptido (i)] y el péptido
- 10 transportador [péptido (ii)]. Aún más preferiblemente, la proteína de fusión además comprende una secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención.

- Un **tercer aspecto** de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica,
- 15 de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido y/o de un anticuerpo de la invención, o de una proteína de fusión de la invención, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, o
- 20 alternativamente, a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido y/o de un anticuerpo de la invención, o de una proteína de fusión de la invención, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable, para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. En una realización preferida de este aspecto, la
- 25 composición farmacéutica de la invención además comprende otro principio activo.

- Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva o eficaz de un péptido y/o de un anticuerpo de la invención,
- 30 de una proteína de fusión de la invención, o de la composición farmacéutica de la invención, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento de una

enfermedad neurodegenerativa, o alternativamente, a la forma farmacéutica de la invención, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido y/o de un anticuerpo de la invención, de una proteína de fusión de la invención, o de la composición farmacéutica de la invención, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable, para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al uso de un agente modulador, de un péptido y/o un anticuerpo según de la invención, una proteína de fusión de la invención, una composición farmacéutica de la invención, o de una forma farmacéutica de la invención, como agente neuroprotector, i.e. previene y/o reduce el daño neuronal, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. Alternativamente, se refiere a un agente modulador, un péptido, un anticuerpo y/o una proteína de fusión de la invención, una composición farmacéutica de la invención, o de una forma farmacéutica de la invención para su uso en la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

Un **sexto aspecto** de la invención hace referencia a un método para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente modulador, un péptido, un anticuerpo y/o, una proteína de fusión de la invención.

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de agente modulador, péptido, anticuerpo y/o proteína de fusión de la invención que resulta efectiva, en administración única o múltiple a un sujeto (por ejemplo, a un paciente) para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

Dicha enfermedad neurodegenerativa se selecciona de la lista que consiste en: Alzheimer Parkinson, Huntington, la demencia con cuerpos de Lewy o, en general, las enfermedades resultado de un deterioro de las neuronas causado por procesos de oxidación, de desestabilización de los microtúbulos por formación de ovillos neurofibrilares, de otro tipo tales como desequilibrios en la concentración de iones, por

ejemplo de iones calcio, sistemas de neurotransmisión, y otras enfermedades o trastornos relacionados con una proteína agregante y/o con la proteína tau o tautopatías.

- 5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de la lista que consiste en: la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad o trastorno relacionado con una proteína agregante que se selecciona de la lista que consiste en enfermedad de Parkinson (PD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la
- 10 enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA), enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia frontotemporal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington, Diabetes tipo II, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal,
- 15 amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos similares a la esquizofrenia, así como tauopatías como la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (DFTP-17), esclerosis lateral amiotrófica, degeneración corticobasal,
- 20 demencia pugilística, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, y/o demencia de solo ovillo.

En una realización preferida, dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con el incremento de péptidos beta-amiloides y/o hiperfosforilación de tau

25 y/o neurotoxicidad inducida por ácido domoico, más preferiblemente dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere al uso de un agente modulador, de un péptido y/o un anticuerpo según de la invención, una proteína de fusión de la invención,

30 una composición farmacéutica de la invención, o de una forma farmacéutica de la invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento de la ansiedad, como ansiolítico.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Expresión de NPCT en las células cerebrales de ratón. Ensayos de doble inmunofluorescencia demostraron que NPCT se expresó en neuronas corticales y del hipocampo (A), microglia (B), y astrocitos (C), como se demuestra el uso de marcadores celulares específicos, incluyendo NeuN, GFAP, e Iba1, respectivamente. Barra de escala, 20µm.

Figura 2. Expresión de NPCT en cultivos celulares primarios de ratón. (A) Expresión de NPCT en cultivos mixtos de neuronas y astrocitos después de diferentes tratamientos. (B) Expresión de NPCT en cultivos de células neuronales primarias después de diferentes tratamientos. (C) Cuantificación de la inmunorreactividad en las neuronas NPCT marcadas. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, * $p < 0,05$.

Figura 3. Evaluación de la viabilidad en células de neuroblastoma SK-SY-5Y tratadas con o sin A β_{1-42} (10 mM), y anti-NPCT (2,5, 25, 50 µg/ml) 24 (A), y 48 (B) horas después del tratamiento. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 4. Protección contra la pérdida neuronal por el anti-NPCT en ratones inyectados con domoico. (A) Secciones teñidas con Nissl representativas de los correspondientes grupos experimentales. Los ratones inyectados con ácido domoico mostraron una disminución de las células teñidas con Nissl, mientras que el tratamiento con anti-NPCT contrarresta este efecto negativo, como se muestra en la inserción con un mayor aumento. Barra de escala, 20µm. (B) La pérdida de las neuronas después de la inyección de ácido domoico se evaluó en el hilio del giro dentado contando de las células teñidas con Nissl. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, * $p < 0,05$.

Figura 5. Efectos de anti-NPCT sobre la cognición de comportamiento en ratones APP/PS1. (A) El tratamiento con anti-NPCT en ratones APP/PS1 aumentó la relación de entradas en los brazos abiertos en la prueba del laberinto elevado. (B) Los ratones mostraron menos APP/PS1 thigmotaxis como tiempos más largos pasados en la zona central. El tratamiento con anti-NPCT indujo una atenuación a la duración que indica efectos contra la ansiedad. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, * $p < 0,05$. WT, ratones *wild-type*.

Figura 6. Expresión de PCT y NPCT en ratones APP/PS1 y WT. **A, B,** expresión PCT en muestras corticales y del hipocampo de 12 meses de edad (**A**), y 3 meses de edad (**C**) ratones APP/PS1 y WT. **B,** expression de NPCT en muestras del hipocampo se incrementan en ratones APP/PS1 de 12 meses de edad en comparación con ratones WT de su grupo de edad. **D** La expression de NPCT en muestras del hipocampo decrece con la edad. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM.

Figura 7. Expresión de NPCT en el cerebro de ratones APP/PS1. (**A**) Células corticales y del hipocampo en ratones APP/PS1 NPCT marcadas con inmunoreactividad. (**B**) Inmunohistoquímica doble muestra astrocitos GFAP-positivos (rojo) rodeada por inmunoreactividad NPCT (verde) en el hipocampo de los ratones APP/PS1. (**E**) Inmunohistoquímica doble que muestra co-localización de A β (rojo) y NPCT (verde) en el hipocampo de los ratones APP/PS1. Barra de escala, 20 μ m. Hip, hipocampo, WT, ratones *wild-type*.

Figura 8. Expresión NPCT en muestras de cerebro de pacientes con AD. **A, B,** expresión NPCT en corticales (**A**) y del hipocampo (**B**) las muestras se incrementa en los pacientes con AD en comparación con los sujetos sanos. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, * $p < 0,05$. C, NPCT etiquetado inmunoreactividad en las células corticales es mayor en los pacientes con EA en comparación con los sujetos sanos. La barra de escala, 20 μ m. Cx, la corteza cerebral. **D,** inmunohistoquímica doble que muestra co-localización (asteriscos) de A β (rojo) y NPCT (verde) en muestras corticales de pacientes con EA. Nota NPCT inmunoreactividad en los vasos sanguíneos (flecha). Barra de escala, 20 μ m.

Figura 9. Efectos de la neutralización NPCT sobre los niveles plasmáticos de citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han demostrado, tal y como puede verse más adelante en los ejemplos, que péptidos capaces de unirse a la NPCT, o anti-NPCT podrían utilizarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con el incremento de péptidos beta-amiloides y/o hiperfosforilación de tau y/o neurotoxicidad inducida por ácido domoico.

Un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de un agente modulador de la actividad biológica de N-PCT en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, o alternativamente, a un agente modulador de la actividad biológica de N-PCT para su uso en la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

La procalcitonina (PCT) es un prohormona glicopeptídica de 116 aminoácidos y aproximadamente 13kDa de peso molecular. Esta molécula es el precursor de la calcitonina. Su síntesis comienza con la transcripción del gen Calca-1 situado en el cromosoma 11p. Posteriormente este transcrito se procesa dando lugar a la preprocalcitonina, precursor de la PCT. Este precursor está compuesto por 141 aminoácidos y por procesamiento posterior da lugar a la PCT. Su secuencia aminoacídica fue ya descrita en 1984 (Moullec et al. 1984. FEBS lett. 167: 93-97)

Esta PCT por su parte sufre sucesivas digestiones para dar lugar a 3 moléculas diferentes: aminoprocacitonina (N-procalcitonina o N-PCT) compuesto por 57 aminoácidos de la zona N-terminal; calcitonina en forma inmadura y no activa, formada por 33 aminoácidos de la zona central de la PCT; y péptido correspondiente a la zona C-terminal, formado por 21 aminoácidos (residuos 96-116 de la PCT) y denominado CCP-I o katalcalcina (Jacobs et al. 1981. J Biol Chem. 256:1803-2807; Steenbergh et al. 1986. FEBS lett. 209: 97-103). En condiciones fisiológicas normales (no patológicas), estas moléculas se producen como resultado de un proceso intracelular proteolítico llevado a cabo por la enzima prohormona convertasa en las células C del tiroides y en las células neuroendocrinas del pulmón.

Salvo en el caso de la calcitonina (CT), los efectos fisiológicos de todos estos péptidos no son bien conocidos. A pesar de ello si se ha observado que existe un aumento

importante de los niveles circulantes y cerebrales tanto de PCT como de N-PCT en situaciones de inflamación, infección y sepsis (Whang et al. 1998. J Clin Endocrinol Metab. 83: 3296-3301). Debido al aumento de las dos moléculas, a un mejor conocimiento estructural de la PCT frente a la N-PCT, y a la existencia de kits comerciales, hasta el momento se ha sugerido el uso de anticuerpos frente a PCT tanto
5 como marcador diagnóstico (US 6451311 B2) como para la terapia de la sepsis y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) (WO 98/33524).

10 A pesar de ello el papel fisiológico de la PCT así como sus efectos sistémicos son bastante desconocidos. Si es conocida su implicación en la respuesta inflamatoria sistémica debido a su relación con diversas citokinas y su aumento como respuesta a las toxinas bacterianas (Brunkhorst et al. 1998. Intensive Care Med. 24: 888-889). A pesar de ello, estudios recientes indican que la PCT por si misma presenta una baja o
15 nula actividad biológica, además de existir estudios contradictorios sobre sus efectos en diversos modelos in vitro. Dichos resultados no justifican su supuesto papel como mediador secundario en la sepsis.

Por su parte, la N-procalcitonina, a diferencia de la PCT, katacalcina o CT, ha
20 demostrado ser un péptido altamente conservado con una homología estructural superior al 90% en todas las especies de mamíferos estudiados, lo que sugiere un importante papel a nivel biológico. Esta proteína, presenta también una acusada actividad biológica en situaciones de hipermetabolismo como pueden ser obesidad, ayuno, es decir, situaciones de estrés metabólico. Mediante diversos estudios se
25 observó que en condiciones normales, la N-PCT se expresaba en regiones cerebrales implicadas en el control de la homeostasis energética (Ojeda et al. 2006. Neurosci Lett. 408: 40-45; Tavares et al. 2007. Endocrinology. 148: 1891-1901). También se observa que N-PCT se encuentra aumentada en el caso de administración de endotoxina bacteriana (Tavares et al. 2005. Clin Diagn Lab Immunol. 12: 1085-1093) sugiriendo un
30 papel en la respuesta inflamatoria. Además, se ha demostrado que la administración central de N-PCT simula las respuestas inflamatorias que suceden en la sepsis (letargia, fiebre, anorexia, disminución de peso), indicando su importancia en la respuesta inflamatoria a través de mecanismos dependientes de la activación de

neuronas POMC y de la síntesis de prostaglandinas. Por todo ello, es una proteína que ha despertado gran interés como mediador secundario en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Además puede resultar útil como marcador diagnóstico en sepsis (Jones et al Ann emerg ed. 2007. 50: 47-51).

En esta memoria se entiende por N-procalcitonina (N-PCT o NPCT) un péptido neuroendocrino de 56 o 57 aminoácidos derivado de la mitad N-terminal de la procalcitonina (PCT).

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la N-PCT es un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1

(APFRSALESSPADPATLSEDEARLLLLAALVQDYVQNKASELEQEQEREGSSLDSPRS)

; o

Alternativamente, una variante de la misma de SEQ ID NO: 2

(PFRSALESSPADPATLSEDEARLLLLAALVQDYVQMKASELEQEQEREGSSLDSPRS).

En esta memoria también se considera como NPCT una variante o un fragmento biológicamente activo de las secuencias SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En una realización particular, dicho fragmento biológicamente activo es el péptido de secuencia SEQ ID NO: 3 (QEREGSSLDSPRS) que corresponde a los aminoácidos 44-57 de SEQ ID NO: 1.

El término "agente modulador" o "que modula la actividad" como se usa aquí, se refiere principalmente a que inhibe (disminuye) el nivel de actividad biológica de N-PCT en una célula. La actividad de N-PCT puede ser modulada por la modificación de los niveles y/o de la actividad de N-PCT, o por la modificación de los niveles a los que se transcriben los genes que codifican N-PCT/PCT, preferiblemente N-PCT, tal que los niveles de actividad de N-PCT en la célula es modulada. Los agentes moduladores pueden ser también agonistas (sustancias que son capaces de unirse a un receptor y

provocar una respuesta en la célula, preferiblemente una disminución de la actividad de N-PCT), como antagonistas (sustancias que no solamente no activan el receptor, sino que en realidad bloquea su activación por los agonistas). En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación. Preferiblemente, dicho agente modulador tiene un efecto neutralizante o inhibidor de la actividad biológica de N-PCT. El efecto neuroprotector obtenido por inhibición de la actividad biológica de N-PCT puede ser evaluado determinando uno o más de los siguientes indicadores:

- neurotoxicidad inducida por el péptido beta-amiloide *in vitro*; y/o
- neurotoxicidad *in vivo*, preferiblemente en un modelo de neurotoxicidad inducida por ácido domoico o en un modelo de ratón transgénico de amiloidosis;

tal y como se demuestra en los ejemplos.

En los últimos años, quizás la teoría más aceptada sobre la neurotoxicidad del péptido beta-amiloide (A β) apunta a que dicha neurotoxicidad resulta del stress oxidativo inducido por A β (Pike et al. 1997, Journal of neurochemistry, 69(4),01601-1611). Existen diversos métodos para determinar la neurotoxicidad inducida por el péptido beta-amiloide *in vitro*, bien conocidos por un experto en la materia, tales como por ejemplo los descritos en Patel and Good, 2007, Journal of Neuroscience Methods 16, 1-10, que consisten básicamente en determinar la muerte celular causada por una toxina (en este caso el péptido beta-amiloide, por ejemplo: A β ₁₋₄₂) en un cultivo neuronal, por ejemplo en células neuronales primarias o en células immortalizadas tales como células de neuroblastoma, por ejemplo, neuroblastoma SK-SY-5Y.

Para evaluar si el agente anti-NPCT impide la neurodegeneración *in vivo*, se pueden utilizar distintos modelos animales. Preferiblemente, se utiliza un modelo de muerte neuronal inducida por toxicidad, y un modelo de amiloidosis. Un ejemplo del primer modelo es el modelo de toxicidad por ácido domoico descrito por Carro et al. (Carro et al., 2001. J Neurosci. Aug 1;21(15):5678-84). Un modelo de amiloidosis es el de los ratones doblemente transgénicos APP/PS1, descrito por Van Groen et al. (Van Groen et al., 2006, Neurobiology of disease 23 (3), 653-662) Dichos modelos animales y el protocolo utilizado para la determinación de neurotoxicidad *in vivo* son detallados en el apartado "Materiales y Métodos" de los ejemplos.

En otra realización particular, la inhibición de la actividad biológica de N-PCT se caracteriza por presentar al menos uno de los efectos siguientes:

- 5 - neuroprotección *in vitro*, preferiblemente determinada como reducción de la neurotoxicidad inducida por el péptido beta-amiloide *in vitro*;
- neuroprotección *in vivo*, preferiblemente determinada como reducción de la pérdida neuronal *in vivo*, por ejemplo en un modelo de neurotoxicidad inducida por ácido domoico o en un modelo de ratón transgénico de amiloidosis; y/o
- 10 - reducción de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y/o quimiocinas *in vivo* preferiblemente determinada en un modelo de ratón transgénico de amiloidosis.

El término "citoquinas proinflamatorias" se refiere a aquellas citoquinas que
15 generalmente promueven procesos inflamatorios las cuales incluyen pero no se limitan a IL-6, IL-8, TNF, and BL-I las cuales difieren de la citoquinas alérgicas en su estructura y función. Las "quimiocinas" son citoquinas quimiotácticas. Algunas quimiocinas son consideradas proinflamatorias y pueden ser inducidas durante la respuesta inmune para reclutar a las células del sistema inmune al sitio de la infección. En una
20 realización preferida, las citoquinas proinflamatorias y quimiocinas determinadas en el modelo de ratón transgénico de amiloidosis consisten en o comprenden al menos una de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas seleccionadas de la siguiente lista: IL-1 β , IL-6, TNF α , MCP-1, leptina y MIP-2. Preferiblemente, dos o más, más preferiblemente consisten en/comprenden dichas citoquinas proinflamatorias y quimiocinas.

25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el agente modulador se selecciona de la lista que consiste en: a) una molécula orgánica, b) una molécula de RNA, c) un oligonucleótido antisentido, d) un péptido o anticuerpo, o e) una ribozima, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, el agente modulador es un
30 péptido aislado, de ahora en adelante péptido de la invención, o de un anticuerpo con capacidad de unión a la N-procalcitonina (N-PCT). Aún más preferiblemente, el péptido aislado o el anticuerpo es un inhibidor de la actividad biológica de N-PCT *in vitro* y/o *in vivo*.

Un experto en la materia podría preparar moléculas orgánicas que pueden unirse específicamente a N-PCT/PCT, preferiblemente a N-PCT, sin unirse a otros polipéptidos o proteínas. Las moléculas orgánicas tendrán preferiblemente un peso de 5 100 a 20.000 daltons, más preferiblemente 500 a 15.000 daltons, y más preferiblemente 1000 a 10.000 daltons. Librerías de moléculas orgánicas se encuentran disponibles comercialmente. La vía de administración puede ser, sin limitarse a estas, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmica. Entre las moléculas orgánicas moduladoras 10 de la actividad de N-PCT se encuentran, pero sin limitarnos, proopiomelanocortin (POMC, hormona precursora de la ACTH, alfa-melatonina y alfa-endorfina), melanocortin 3/4-receptors, Prostaglandinas, CRF, y receptores CRF.

Recientemente, con el desarrollo de la tecnología antisentido, secuencias de 15 nucleótidos específicamente complementarios a una determinada secuencia de ADN o ARN, podrían formar complejos y bloquear la transcripción o traducción. Así, con el progreso del silenciamiento génico post-transcripcional, y en particular del ARN de interferencia (RNA interferente o RNAi), se han desarrollado herramientas que permiten la inhibición específica de la expresión de un gen. La inhibición de la expresión de las 20 proteínas N-PCT/PCT constituiría por ende la inhibición de su actividad biológica, y en concreto, de la actividad que está contribuyendo a la enfermedad neurodegenerativa.

Por "polinucleótidos antisentido" se entienden cadenas de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que pueden inhibir N-PCT/PCT por uno de estos tres 25 mecanismos:

- 1- Interfiriendo la transcripción, al hibridar en el gen estructural o en una región regulatoria del gen que codifica para N-PCT/PCT. Puesto que la transcripción o expresión es bloqueada de manera efectiva por la hibridación del oligonucleótido antisentido con el ADN, disminuye la producción de N-PCT/PCT.
- 30 2- La unión del oligonucleótido antisentido en el citoplasma con el mRNA, interfiriendo con la formación de la construcción de traducción propiamente dicha, inhibiendo la traducción de mRNA a la proteína.

3- La formación de un mRNA - antisentido dúplex que permite una rápida degradación del mRNA dúplex por ARNasas (como ARNasa H). Esto da lugar a una menor producción de N-PCT/PCT.

5 Por ejemplo, y sin limitarnos, podría ser una secuencia de ribonucleótidos o ARN que pertenece al denominado siRNA (small interfering RNA), ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento, capaz de inhibir la expresión genética de la proteína N-PCT/PCT. En el contexto de la presente memoria se entiende como "siRNA" (small
10 interfering RNA ó ARN pequeño de interferencia) una clase de ARN de doble cadena de 19 a 25 nucleótidos de largo, y más preferentemente entre 21 y 23 nucleótidos, que está involucrado en la ruta de la interferencia de ARN, donde el siRNA interfiere la expresión de un gen específico. En la presente invención, este gen específico es el gen CALC-I y CALC-II del cromosoma 11 (Burns *et al.*, 1989. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9519–9523; Jacobs *et al.*, 1981. *J Biol Chem* 256: 2803–2807. NPCT y PCT son
15 proteínas).

También podría ser cualquier siRNA capaz de hibridar una molécula de ácido nucleico que codifique la proteína N-PCT/PCT humana que se recoge en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. También podrían ser una construcción de ARN que al menos contenga
20 una cualquiera de las secuencias de nucleótidos posibles de siRNA capaces de inhibir la expresión de N-PCT/PCT, y sin perjuicio de que adicionalmente formen parte de la presente invención cualquiera de las secuencias y construcciones de RNA de la invención anteriormente descritas que sean objeto de modificaciones, preferentemente químicas, que conduzcan a una mayor estabilidad frente a la acción de ribonucleasas y
25 con ello a una mayor eficiencia. Sin que dichas modificaciones supongan la alteración de su mecanismo de acción, que es la unión específica al complejo RISC (RNA- / induced silencing complex), activándolo y manifestando una actividad helicasa que separa las dos hebras dejando solo la hebra antisentido asociada al complejo. El complejo ribonucleoprotéico resultante se une al mRNA diana (ARN mensajero de N-
30 PCT/PCT). Si la complementariedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se atenúa la traducción. Pero si es perfecta, RISC actúa como RNasa, cortando al mensajero y quedando libre para repetir el proceso.

Adicionalmente resulta evidente para un experto en la materia que una gran cantidad de polinucleótidos de mRNA pueden traducirse a N-PCT/PCT como consecuencia, por ejemplo, de que el código genético es degenerado. Cualquier siRNA capaz de inhibir la traducción de estos mRNA también forman parte de la invención.

La preparación de la secuencias de siRNA de la invención o de las construcciones de RNA de la invención serían evidentes para un experto en la materia, y se podría llevar a cabo por síntesis química, lo cual permite además la incorporación de modificaciones químicas tanto en los distintos nucleótidos del producto como la incorporación de otros compuestos químicos en cualquiera de los extremos. Por otro lado, la síntesis también podría realizarse enzimáticamente utilizando cualquiera de las RNA polimerasas disponibles. La síntesis enzimática también permite alguna modificación química de los productos o RNAs inhibidores.

El diseño de las secuencias de nucleótidos del siRNA de la invención también sería evidente para un experto en la materia. Así, se podría realizar mediante un diseño aleatorio en el que se seleccionen 19-25 bases del mRNA diana sin tener en cuenta la secuencia o la información posicional que tiene en el transcrito. Otra alternativa no limitativa de la presente invención sería el diseño convencional mediante parámetros simples desarrollados por los pioneros de la técnica (Calipel *et al.*, 2003. *J Biol Chem.* 278(43): 42409-42418) completados con un análisis BLAST de nucleótidos. Otra posibilidad podría ser un diseño racional, en el que se emplee un procedimiento informático dirigido a identificar las dianas óptimas de siRNA en un mRNA. Las secuencias diana se analizan en grupos de 19 nucleótidos a la vez y se identifican las que tienen mejores características en función de un algoritmo que incorpora un gran número de parámetros termodinámicos y de secuencia.

También podría formar parte de la composición de la invención una construcción genética de ADN, la cual dirigiría la transcripción in vitro o intracelular de la secuencia siRNA o construcción de ARN de la invención, y que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente

de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante del siRNA de la invención o de la construcción de ARN de la invención para su transcripción, o, b) secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de ARN de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc.. para su uso en aquellos contextos patológicos en los que N-PCT/PCT está contribuyendo a las enfermedades neurodegenerativas. Múltiples de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Las composiciones de la presente invención permiten la transfección del siRNA de la invención a la célula, *in vivo* o *in vitro*. La transfección se podría llevar a cabo, pero sin limitarnos a, transfección directa o vectores que faciliten el acceso del siRNA al interior de la célula. Así, ejemplos de estos vectores son, sin limitarse a, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del Herpes simplex, plásmidos de DNA no virales, liposomas catiónicos y conjugados moleculares. Así, por ejemplo, los siRNA de la presente invención, así como ARN o ADN precursores de estos siRNA, pueden conjugarse con péptidos de liberación u otros compuestos para favorecer el transporte de estos siRNA al interior de la célula.

Los autores de la presente invención han demostrado que anti-NPCT induce neuroprotección/protege contra la pérdida neuronal en el modelo de neurotoxicidad inducido por ácido domoico.

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, donde el agente modulador es un péptido aislado o un anticuerpo aislado con capacidad de unión a la N-procalcitonina (NPCT/PCT).

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, el péptido aislado o el anticuerpo tiene, además, la capacidad de inhibir la actividad biológica de la NPCT *in vitro* y/o *in vivo*.

5

El término "aislado", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a nucleótidos o péptidos, u otros elementos que: 1) se encuentran sustancialmente libres de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con él en la naturaleza, o 2) si se encuentran en su medio natural, han sido sintéticamente (no naturalmente) alterados por la intervención humana y/o introducidos en una célula que no los posee de forma nativa. Por ejemplo, un nucleótido natural se convierte en "aislado" si se ha alterado, o si proviene de un ADN que ha sido alterado por medio de la intervención humana (por medio de, por ejemplo pero sin limitarnos, mutagénesis dirigida, inserciones, deleciones, etc). De la misma manera, un nucleótido natural se convierte en "aislado" si se introduce por medios no naturales en un genoma no nativo a dicho nucleótido (transfección). Por tanto, el término "aislado" en este último caso, es equivalente al término "heterólogo".

El término "péptido", tal como aquí se utiliza, se refiere a un polímero formado por la unión, en un orden definido, de alfa-aminoácidos mediante un enlace peptídico, e incluye modificaciones o derivados del mismo, por ejemplo, glicosilación, fosforilación, acetilación, amidación, etc.

Los aminoácidos del péptido de la invención, en función de la orientación del grupo amino que lleva el átomo de carbono alfa, pueden pertenecer a la serie L o a la serie D, preferentemente, a la serie L. Adicionalmente, los aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales o aminoácidos modificados o poco comunes. Entre los aminoácidos naturales están los aminoácidos alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina), los aminoácidos hidroxilados (serina y treonina), los aminoácidos azufrados (cisteína y metionina), los aminoácidos dicarboxílicos y sus amidas (ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico y glutamina), los aminoácidos que poseen dos grupos básicos (Usina, arginina e histidina), los aminoácidos aromáticos (fenilalanina,

tirosina y triptófano) y los aminoácidos cíclicos (prolina). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de aminoácidos modificados o poco comunes incluyen ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2- aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2- aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alo- hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, 6-N-metil-lisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, ornitina, etc.

10

El péptido aislado o el anticuerpo de la invención se caracterizan por su capacidad de unión a NPCT, y, ventajosamente, por su capacidad de inhibir la actividad biológica de la NPCT. La capacidad de unión de un péptido a la N-PCT se puede determinar mediante cualquier método apropiado que permita determinar la unión entre dos moléculas (e.g., mediante un ensayo de afinidad), comprendiendo dicho método poner en contacto la NPCT con el péptido a ensayar bajo condiciones que permiten la unión de dicho péptido a la NPCT y evaluar la unión entre el péptido y la NPCT. En una realización particular, dicho ensayo de afinidad puede realizarse, por ejemplo pero sin limitarse, utilizando la técnica de Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR), o técnicas similares que utilicen NPCT marcada radiactivamente, o, alternativamente, marcando radiactivamente el péptido a ensayar. En general, este tipo de ensayos de afinidad comprende poner en contacto la NPCT, v.g., inmovilizada en los pocillos de una placa, con el péptido cuya capacidad de unión a NPCT se desea conocer, y, tras incubar durante un periodo de tiempo apropiado, analizar la unión del péptido a la NPCT. Los péptidos con baja afinidad por la NPCT se eliminan mediante lavados mientras que los péptidos con mayor afinidad permanecen unidos a la NPCT y pueden ser liberados rompiendo las interacciones moleculares entre ambas moléculas, lo que puede realizarse, por ejemplo, bajando el pH.

30 Ventajosamente, el péptido y/o el anticuerpo de la invención se caracterizan no solo por su capacidad de unión a la NPCT, sino, además, por su capacidad para inhibir la actividad biológica de la NPCT, y, en consecuencia, indirectamente, regular o inhibir, de

forma transitoria o temporal, la actividad de NF- κ B. Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, se cree que la capacidad de un péptido o de un anticuerpo de inhibir la actividad biológica de la NPCT es debida a la unión directa de dicho péptido o anticuerpo a la NPCT. La capacidad de un péptido o de un anticuerpo de inhibir la actividad biológica de la NPCT se puede analizar, *in vitro*, por cualquier método convencional apropiado ilustrativo de tal efecto, e.g.:

a) mediante un ensayo basado en la medida de la proliferación celular en un cultivo de linfocitos T efectores, en presencia de un anticuerpo anti-CD3, linfocitos Treg y timidina tritiada, y en presencia o ausencia del péptido a ensayar; o bien

b) mediante un ensayo basado en el co-cultivo de esplenocitos de ratones transgénicos OT-I (ratones en los que los linfocitos T presentan un receptor de la célula T específico para el péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) de la ovalbúmina) con linfocitos Treg en presencia de antígeno [péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 4)], en presencia o ausencia de linfocitos Treg, y en presencia o ausencia del péptido a ensayar; o bien, alternativamente c) mediante un ensayo basado en una respuesta mixta linfocitaria (MLR) en la que se mezclan células efectoras de un ratón (e.g., BALB/c) con células dendríticas obtenidas de otra cepa de ratón (e.g., C57BL/6) en presencia o en ausencia de linfocitos Treg obtenidos de un ratón de una de las estirpes (e.g. BALB/c) y en presencia o ausencia del péptido a ensayar. Análogamente se pueden realizar experimentos similares utilizando linfocitos Treg de origen humano.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la NPCT es un péptido de secuencia SEQ ID NO:1, un péptido de secuencia SEQ ID NO:2, o una variante o un fragmento biológicamente activo de los mismos. En una realización preferida, dicho fragmento biológicamente activo es SEQ ID NO:3.

El péptido o el anticuerpo de la invención, con capacidad de unirse a la NPCT pueden identificarse por distintas técnicas. Así, por ejemplo, pero sin limitarse, puede emplearse la tecnología asociada con las librerías de fagos denominada Biopanning desarrollado por Smith, G.P., 1985, *Science* 228:1315. Esta técnica permite identificar péptidos que presentan una unión de alta afinidad con una proteína determinada (en este caso, NPCT), y cuantificar, posteriormente, mediante ensayos *in vitro*, la

capacidad de los distintos péptidos para inhibir la actividad biológica de dicha proteína. La secuencia de los péptidos que se unen a la NPCT se puede deducir a partir de la secuencia del ADN correspondiente al cabo de varios ciclos de "*biopanning*" (generalmente, pero sin limitarse, 3).

- 5 Se han descrito diversas variaciones de la técnica de *biopanning* presentada por Smith y se hace referencia a: Christian et al., 1992. *J. Mol. Biol.* 227:711; Cwiria et al., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378; Cull et al., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:1865; Huls et al., 1996. *Nature Biotechnol.* 7:276 y Bartoli et al., 1998 *Nature Biotechnol.* 16:1068, el documento WO98/54312, patente estadounidense nº 5.582.981, Balass et al., 1996. 10 *Anal. Biochem.* 243:264, el método SELEX, patente estadounidense nº 5.475.096, el documento WO99/06542A

Por tanto, en una realización preferida, el péptido de la invención se obtiene mediante un procedimiento de biopanning que comprende:

- 15 a) incubar una librería de péptidos expuestos en fagos se incuba con un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, o una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo,
- b) dejar que los péptidos expuestos en fagos se unan con el péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo 20 (este paso se denomina *panning*), Utiliza las interacciones de unión de modo que sólo los péptidos específicos presentados por el bacteriófago se unen a la diana. Por ejemplo, pero sin limitarse, la selección de un anticuerpo presentado por el bacteriófago con antígeno recubierto en placas de microtitulación.
- c) Etapa de lavado: los fagos no unidos se eliminan. Sólo los fagos unidos con 25 fuerte afinidad se mantienen.
- d) Los fagos específicamente unidos se eluyen en medio ácido. El *pool* eluído de fagos se amplifica in vivo y el procedimiento se repite.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la variante de la SEQ ID 30 NO: 1 es la SEQ ID NO: 2, y el fragmento de la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO. 3 (QEREGSSLDS PRS).

El resultado final es que los péptidos producidos por el bacteriófago son específicos. Después de varios ciclos, los clones individuales se aíslan y secuencian.

En una realización particular de la invención, dicho agente modulador de la actividad biológica de N-PCT es un anticuerpo.

El término “anticuerpo” tal y como es utilizado en esta memoria, hace referencia a una inmunoglobulina o a un fragmento del mismo que mantiene su capacidad de unión al antígeno. A no ser que se especifique lo contrario, dicho término incluye, pero no se limita a anticuerpos, policlonales, monoclonales, monospecíficos, polispecíficos, humanizados, humanos, chimericos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados y generados *in vitro*. Dicho anticuerpo puede incluir una región constante o una porción de la misma, tales como las regiones constantes codificadas por los genes kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon y mu. Por ejemplo, la cadena pesada puede ser de los diversos isotipos: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgD, y IgE. Y la cadena ligera puede ser por ejemplo, kappa o lambda.

- En una realización preferida dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Existen anticuerpos monoclonales anti-NCPT disponibles comercialmente. Los siguientes anticuerpos se citan a modo de ejemplo: anti-procalcitonin antibody [42] (HRP) (ab24454), de Abcam; y anti-procalcitonin antibody [6F10], de Gene Tex.

Asimismo, en la solicitud de patente US 2013/0046085 que presenta varios inventores en común con la presente invención y que es incorporada por referencia en su totalidad, describe la obtención de anticuerpos anti-NPCT. En particular, se describe la obtención de anticuerpos anti-NPCT por inmunización de un animal con un péptido que consiste esencialmente en la secuencia SEQ ID NO:3, i.e., los 13 últimos aminoácidos de la secuencia de N-PCT (SEQ ID NO: 1) o bien con un péptido que consiste esencialmente en los 7 últimos residuos de la secuencia de N-PCT (SEQ ID NO: 1).

En realización particularmente preferida, dicho agente modulador anti-NPCT es un anticuerpo, monoclonal o policlonal, obtenido por inmunización de un mamífero con N-PCT, donde N-PCT consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, una variante o un fragmento del mismo, donde preferiblemente dicha variante consiste

esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 2 y preferiblemente dicho fragmento consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 3 o bien en los últimos 7 residuos de SEQ ID NO:1. Un anticuerpo anti-NPCT particularmente preferido es el utilizado en Tavares y Miñano (Clinical Science 2010, 119, 519–534), cuyo contenido es incorporado por referencia en su totalidad, se describe la obtención y caracterización de un suero policlonal anti-NPCT con un péptido sintético de secuencia EQEREGSSLDSPRS correspondiente a los aminoácidos 69-82 de la proteína precursora de procalcitonina, la cuál corresponde a los aminoácidos 44-57 de SEQ ID NO:1.

En otra realización preferida, el anticuerpo de la invención se obtiene mediante un procedimiento que comprende:

- a) adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 o a una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo,
- b) conjugar el péptido con KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin),
- c) inmunizar un animal mamífero con un péptido según (c),
- d) extraer el antisuero del animal, y
- e) purificar el anticuerpo que reconoce específicamente N-procalcitonina.

En otra realización preferida el método para la generación de anticuerpos (de ahora en adelante segundo método de la invención) que comprende los siguientes pasos:

- a) adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, de secuencia SEQ ID NO: 2 o a una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo,
- b) conjugarla con KLH,
- c) inmunizar un animal mamífero con un péptido según (g),
- d) analizar la titulación frente al péptido del paso (g) por ELISA, en el animal mamífero del paso (h),

- e) fusionar los esplenocitos de los animales hospedadores para la generación de líneas celulares inmortalizadas,
- f) expandir los clones,
- g) seleccionar los mejores productores.

5

En otra realización preferida, el péptido del paso (a) del primer o el segundo método de la invención, es el péptido de secuencia SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 3 se corresponde con la secuencia aminoacídica de los 13 últimos residuos de la proteína NPCT.

10

Adicionalmente, en los métodos descritos en la invención pueden incluir un paso previo, que consiste en la generación del péptido o los péptidos de la invención, del paso (a), de manera recombinante.

15

Por tanto, en otra realización preferida, el anticuerpo de la invención se ha obtenido por el primer o el segundo método de la invención, donde el péptido del paso (a) es un péptido recombinante.

20

En esta memoria se entiende por “animal” cualquier organismo del superreino *Eukaryota* y reino *Metazoa*. El término “mamífero” se utiliza para referirse a cualquier organismo del superreino *Eukaryota*, reino *Metazoa*, filo *Chordata*, subfilo *Craniata*, superclase *Gnathostomata* y clase *Mammalia*.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere al uso de una proteína de fusión que comprende:

25

- a) un péptido de la invención; y
- b) un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula,

en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, o alternativamente, a una proteína de fusión que comprende:

- a) un péptido de la invención; y
- b) un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula,

para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En una realización más preferida, la proteína de fusión comprende, además, un péptido espaciador situado entre el péptido de la invención [péptido (i)] y el péptido transportador [péptido (ii)]. Aún más preferiblemente, la proteína de fusión además comprende una secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención.

Un "péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula", en ocasiones identificado en esta descripción como "péptido transportador", es un péptido capaz de atravesar la membrana celular y penetrar en una célula desde el exterior, característica que puede ser conferida al péptido (v.g., péptido de la invención) al que está fusionado (proteína de fusión de la invención) proporcionando de este modo una alternativa al transporte de péptidos de interés (v.g., péptidos de la invención) al interior de las células diana. Este mecanismo de entrada de péptidos a la célula es conocido como "transducción (o transporte) de proteínas" ("*protein transduction or delivery*"). Se conocen diversos péptidos transportadores con capacidad para internalizar un péptido en una célula (Schwarze *et al.*, 1999. *Science*, 3, 285(5433):1569-72; Niesner *et al.*, 2002. *Bioconjug. Chem.* 13(4),729-36; Ford *et al.*, 2001. *Gene Therapy* 8:1-4; Gusarova *et al.*, 2007. *J. Clin. Invest.* 117(1), 99-111). Prácticamente cualquier péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención; no obstante, en una realización particular, dicho péptido transportador es un péptido que comprende un segmento "PTD" (del inglés "*protein transduction domain*"). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de proteínas que comprenden dichos dominios de transducción de proteínas (PTD) incluyen la proteína TAT (del inglés "*transacting translational protein*") del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-I), el factor de transcripción homeótico (Antp) de *Drosophila antennapedia* y la proteína de unión al ADN VP22 de herpesvirus

simples 1 (HSV-I), aunque también se ha sugerido que esta propiedad de internalizar péptidos en células la poseen otras proteínas tales como la hemaglutinina de virus influenza, la lactoferrina, el factor de crecimiento de fibroblastos 1, el factor de crecimiento de fibroblastos 2 y las proteínas Hoxa-5, Hoxb-4 y Hoxc-8 (Ford *et al.*, 2001. *Gene Therapy* 8:1-4).

En una realización particular, dicho péptido transportador es un péptido derivado de la proteína TAT del HIV-I, que comprende la secuencia responsable de la transducción de péptidos, cuyo dominio básico (PTD) comprende los restos 49-57 de dicha proteína TAT de HIV-I, concretamente, la secuencia aminoacídica RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 5), o los restos 47-57 de dicha proteína TAT de HIV-I, tal como el péptido cuya secuencia de aminoácidos es YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 6) o el péptido cuya secuencia de aminoácidos es CGISYGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7). En otra realización particular, dicho péptido transportador es un péptido derivado de la proteína Antp de *D. antennapedia*, que comprende el homeodominio de *antennapedia* (AntpHD) que comprende el dominio responsable de la transducción de péptidos (PTD) [restos 43-58 de dicha proteína Antp), que comprende la secuencia aminoacídica RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 8), o un fragmento funcional del mismo. En otra realización particular, dicho péptido transportador es un péptido derivado de la proteína VP22 de HSV-I que comprende un dominio responsable de la transducción de péptidos (PTD).

En otra realización particular, dicho péptido transportador es un péptido derivado de la proteína supresora de tumores ARF (del inglés "*alternative reading frame*") que comprende la secuencia aminoacídica responsable de la capacidad del péptido de penetrar en las células, tal como el fragmento que comprende los restos 26-44 de dicha proteína ARF, concretamente, la secuencia aminoacídica KFVRSRRPRT ASCALAFVN (SEQ ID NO: 9), o un fragmento del mismo que comprende los restos 37-44 de dicha proteína ARF, concretamente, la secuencia aminoacídica SCALAFVN (SEQ ID NO: 10). El péptido de la invención puede estar unido a cualquiera de los extremos (amino o carboxilo) terminal del péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido de la invención en una célula. Por tanto, en una realización particular, el extremo carboxilo terminal del péptido de la invención está unido al extremo amino terminal de

dicho péptido transportador, mientras que, en otra realización particular, el extremo amino terminal del péptido de la invención está unido al extremo carboxilo terminal de dicho péptido transportador.

- 5 El péptido de la invención puede estar unido directamente, o no, a dicho péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula. Por tanto, en una realización particular, el péptido de la invención [péptido (i)] está unido directamente a dicho péptido transportador [péptido (ii)], mientras que, en otra realización particular, el péptido de la invención [péptido (i)] está unido a dicho péptido
- 10 transportador [péptido (ii)] a través de un péptido espaciador ("*linker*" o "*spacer*") entre dichos péptidos (i) y (ii). En consecuencia, si se desea, la proteína de fusión de la invención puede contener, además, un péptido espaciador situado entre dicho péptido de la invención [péptido (i)] y dicho péptido transportador [péptido (ii)]. Ventajosamente, dicho péptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural, tal como un péptido
- 15 que da lugar a un dominio no estructurado. Prácticamente cualquier péptido con flexibilidad estructural puede ser utilizado como péptido espaciador; no obstante, ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos péptidos espaciadores incluyen péptidos que contienen repeticiones de restos de aminoácidos, v.g., de Gly y/o Ser, o cualquier otra repetición adecuada de restos de aminoácidos. Opcionalmente, si se desea, la
- 20 proteína de fusión de la invención puede incluir una secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención. Dicha secuencia estará situada en una región de la proteína de fusión de la invención que no afecte adversamente a la funcionalidad del péptido de la invención. Prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser utilizada para aislar o purificar una proteína
- 25 de fusión (denominadas genéricamente péptidos etiqueta o "tag") puede estar presente en dicha proteína de fusión de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dicha secuencia aminoacídica útil para aislar o purificar una proteína de fusión puede ser, por ejemplo, una cola de argininas (Arg-tag), una cola de histidinas (His-tag), FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-
- 30 tag, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. (Terpe *et al.*, 2003. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 523-525), β -galactosidasa, VSV-glicoproteína (YTDIEMNRLGK) (SEQ ID NO: 11), o una

secuencia de aminoácidos tal como: Ala His Gly His Arg Pro (SEQ ID NO: 12) (2, 4, y 8 copias), Pro lie His Asp His Asp His Pro His Leu Val He His Ser (SEQ ID NO: 13), etc.

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. Más preferiblemente, la proteína de fusión comprende, además, una secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido y/o de un anticuerpo de la invención, o de una proteína de fusión de la invención, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa y/o neurotóxicas, o alternativamente, a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido y/o de un anticuerpo de la invención, o de una proteína de fusión de la invención, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable, para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa y/o neurotóxicas. En una realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica de la invención además comprende otro principio activo.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo

glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida o cualquier otro tipo de administración.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de una forma farmacéutica, de
5 ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende una cantidad
terapéuticamente eficaz de un péptido y/o de un anticuerpo de la invención, de una
proteína de fusión de la invención, o de la composición farmacéutica de la invención,
junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la elaboración de
un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad
10 neurodegenerativa, o alternativamente, a la forma farmacéutica de la invención, que
comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido y/o de un anticuerpo de
la invención, de una proteína de fusión de la invención, o de la composición
farmacéutica de la invención, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente
aceptable, para la prevención, alivio y/o tratamiento de una enfermedad
15 neurodegenerativa.

En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más
principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su
adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

20 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al uso de un péptido y/o de un anticuerpo
de la invención, de una proteína de fusión de la invención, de una composición
farmacéutica de la invención, o de una forma farmacéutica de la invención, en la
elaboración de un medicamento para prevención alivio y/o tratamiento de una
25 enfermedad neurodegenerativa, donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona
de la lista que consiste en: Alzheimer Parkinson, Huntington, la demencia con cuerpos
de Lewy o, en general, las enfermedades resultado de un deterioro de las neuronas
causado por procesos
de oxidación, de desestabilización de los microtúbulos por formación de ovillos
30 neurofibrilares, de otro tipo tales como desequilibrios en la concentración de iones, por
ejemplo de iones calcio, sistemas de neurotransmisión, y otras enfermedades o

trastornos relacionados con una proteína agregante y/o con la proteína tau o tautopatías.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad o trastorno relacionado con una proteína agregante que se selecciona de la lista que consiste en enfermedad de Parkinson (PD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA), enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia frontotemporal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington, Diabetes tipo II, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos similares a la esquizofrenia, así como tauopatías como la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (DFTP-17), esclerosis lateral amiotrófica, degeneración corticobasal, demencia pugilística, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, y/o demencia de solo ovillo.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la patología relacionada con el incremento de β -amiloide, respecto de un control, se selecciona de la lista que comprende: esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas y enfermedad de Creutzfeldt Jacobs.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la patología relacionada con hiperfosforilación de tau, respecto de un control, se selecciona de la lista que comprende: demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal y enfermedad de Pick.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la patología relacionada con el incremento de β -amiloide e hiperfosforilación de tau, respecto de un control, se selecciona de la lista que comprende: Alzheimer, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker. Aún más preferiblemente la patología relacionada con el incremento de β -amiloide e hiperfosforilación de tau, respecto de un control, es la enfermedad de Alzheimer.

La formación de depósitos de filamentos intracelulares de tau es común a varias demencias y esta familia de enfermedades neurodegenerativas se conoce con el nombre de taupatías. Éstas incluyen: EA, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (DFTP-17), esclerosis lateral amiotrófica, degeneración corticobasal, demencia pugilística, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, demencia de solo ovillo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la patología relacionada con el incremento de β -amiloide, respecto de un control, se selecciona de la lista que comprende: esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas y enfermedad de Creutzfeldt Jacobs.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la patología relacionada con hiperfosforilación de tau, respecto de un control, se selecciona de la lista que comprende: demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal y enfermedad de Pick.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la patología relacionada con el incremento de β -amiloide e hiperfosforilación de tau, respecto de un control, se

selecciona de la lista que comprende: Alzheimer, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann- Straussler-Scheinker. Aún más preferiblemente la patología relacionada con el incremento de β -amiloide e hiperfosforilación de tau, respecto de un control, es la enfermedad de Alzheimer.

- 10 El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere al/los péptidos de la invención, el/los anticuerpos de la invención, una proteína de fusión de la invención, una composición farmacéutica de la invención, o
15 una forma farmacéutica de la invención, o a una composición, o una forma farmacéutica o preparación que los comprenda.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad
20 farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

25 En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o presentan la misma utilidad que los descritos. Esto es, son funcionalmente equivalentes. Dichos efectos se pueden
30 determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los ejemplos que acompañan a esta descripción. Particularmente, el término "variante" se refiere a un péptido sustancialmente homólogo a cualquiera de los péptido cuya secuencia

aminoacídica se recoge en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a los péptidos resultantes de modificaciones postraduccionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Tal como aquí se utiliza, un péptido es "sustancialmente homólogo" a cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3, respectivamente; es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3, respectivamente de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homologas a cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3, pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, 1984. *Nucleic Acids Research* 12:287 Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410)

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLO DE LA INVENCION

Material y métodos

Cultivos celulares

Se realizaron cultivos neuronales primarios y de astrocitos de la corteza cerebral y el
5 hipocampo (Alvira-Botero et al., 2010 *Curr Aging Sci* Dec;3(3):219-29). Las neuronas
corticales primarias y del hipocampo se obtuvieron a partir de embriones de ratas
Wistar en el día 17 prenatal (E17) y los astrocitos corticales primarios de ratas Wistar
en el día 3 postnatal. Antes del desarrollo del experimento, los cultivos se mantuvieron
a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO₂ durante 7 días
10 Posteriormente, los cultivos se incubaron en medio fresco con o sin A β ₁₋₄₂ (10 μ M). A β ₁₋₄₂
se disolvió en ácido acético 0,1 M, y después se diluyó en agua destilada estéril
como se ha descrito anteriormente (Dietrich et al., 2008. *Neurobiol Aging*
Jun;29(6):902-12).

Las células de neuroblastoma SK-SY-5Y se cultivaron en medio modificado de Eagle,
15 suplementado con un 10% de suero fetal de ternera, 2 mM de L-glutamina, 0,01% de
piruvato de sodio (Lonza) y 50 μ g/ml de gentamicina (Lonza). Las células se trataron
posteriormente con A β ₁₋₄₂ (10 mM), y anti-NPCT (2,5, 25, 50 μ g/ml) durante 24, y 48
horas.

20 Bioactividad y cuantificación de la muerte celular

La viabilidad de las células de neuroblastoma SK-SY-5Y tratadas con o sin A β ₁₋₄₂ (10
 μ M), y anti-NPCT (2,5, 25, 50 μ g/ml) se evaluó utilizando *Cell Counting Kit-8* (Ensayo
CCK-8, Sigma, St. Louis, EE.UU.).

25 Modelos animales y neurodegeneración

Para evaluar si el anti-NPCT impide la neurodegeneración, se utilizaron dos modelos
experimentales: un modelo de muerte neuronal inducida por la toxicidad, y un modelo
de amiloidosis. Para el primer modelo, se inyecta el ácido domoico (0,5 mg / kg, i.p.
Tocris Bioscience) ratones machos a adultos C57BL/6 (25 g) para matar a las neuronas

del hipocampo por daño excitotóxico (Carro *et al.*, 2001. *J Neurosci.* Aug 1;21(15):5678-84). Para el segundo modelo, se utilizaron ratones doblemente transgénicos APP/PS1, un cruce entre Tg2576 (que sobreexpresan APP695 humano) y un mutante PS1 (M146L).

5 Siete días antes del sacrificio, ratones de 3 meses de edad C57BL/6 recibieron una inyección de ácido domoico (*Tocris Bioscience*). El grado de deterioro se evaluó siete días después de la administración de ácido domoico, cuando se alcanzó el nivel máximo de los efectos deletéreos de la neurotoxina (Carro *et al.*, 2001. *J Neurosci.* Aug 1;21(15):5678-84).

10 Los ratones machos doblemente transgénicos APP/PS1 (3 y 12 meses de edad), un cruce entre Tg2576 (que sobreexpresan APP695 humano) y mutantes de Ps1 (M146L), se utilizaron de nuestra colonia endogámica (Instituto de Investigacion del Hospital 12 de Octubre). Los ratones emparejados por edad que no expresan el transgén se utilizaron como controles *wild-type*.

20 Se administró una infusión crónica de un bloqueante anti-NPCT (5µg/µl en 0,1 M, pH 7,4 tampón fosfato con 0,1% de BSA) en por vía subcutánea a través de una minibomba osmótica (ALZET ® 1004 en ratones; Alza, Palo Alto, CA). El grupo de control recibió una infusión del vehículo (en 0,1 M, pH 7,4 tampón fosfato con 0,1% de BSA). Los tratamientos se mantuvieron durante 4 semanas. Un total de 24 ratones C57BL/6 se dividieron en 4 grupos experimentales: A) ratones tratados subcutáneamente mediante bomba con el vehículo e inyección de solución salina por

25 vía intraperitoneal; B) ratones tratados subcutáneamente mediante bomba con el vehículo e inyección de ácido domoico por vía intraperitoneal; C) ratones tratados subcutáneamente con Anti-NPCT con bomba e inyección de solución salina por vía intraperitoneal; D) ratones tratados subcutáneamente mediante bomba con Anti-NPCT e inyección de ácido domoico por vía intraperitoneal.

30 Un total de 15 ratones APP/PS1 y 8 ratones de tipo *wild-type* (WT) se dividieron en 4 grupos experimentales: A) ratones WT tratados subcutáneamente mediante bomba con

vehículo; B) ratones WT tratados subcutáneamente mediante bomba con anti-NPCT; C) ratones APP/PS1 tratados subcutáneamente mediante bomba con vehículo; D) ratones APP/PS1 tratados subcutáneamente mediante bomba con anti-NPCT.

- 5 Los animales se acomodaron a un calendario 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Todos los ratones se alimentaron y se les suministro agua ad libitum. Los Animales se anestesiaron profundamente y perfundidos transcardialmente, con solución salina para el análisis bioquímico, o con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M (PB), pH 7,4 para el análisis inmunohistoquímico. Todos los animales fueron manipulados y
10 atendidos de acuerdo a la Directiva 2010/63/UE del Consejo, de 22 de septiembre de 2010.

15 **Pruebas de comportamiento**

- Después de la adaptación a la manipulación humana, se realizaron pruebas de comportamiento en ratones APP/PS1 y no transgénicos, como se describió previamente (Spuch *et al.*, 2010. *Neurotox Res.* 17(4):421-31; Pérez-González *et al.*, 2012, *J Biol Chem.* 14;287(51):43108-15). El campo abierto se realizó en una caja con
20 unos 50 cm × 50 cm de superficie, con paredes de 38 cm de alto y una zona central de 25 cm x 25 cm de superficie. Se realizaron recuentos ambulatorios durante un período de 5 min durante 3 días. Los valores se expresaron como el número total de entradas y el tiempo total dedicado a la zona central. En la prueba de laberinto elevado en cruz, se midió el tiempo pasado en los diferentes compartimentos del laberinto (brazos abiertos
25 y cerrados), y el número de entradas en los brazos. Luego se calcularon las entradas/brazos abiertos totales y las proporciones de duración. Estos dos parámetros se tomaron como medidas de comportamiento relacionado con la ansiedad.

Muestras humanas

- 30 Las muestras corticales y del hipocampo de autopsias humanas se obtuvieron del Instituto de Neuropatología del cerebro Banco IDIBELL-Hospital Universitario de

Bellvitge (Hospitalet de Llobregat, España), después de la aprobación del comité de ética local. Los sujetos fueron seleccionados sobre la base del diagnóstico *post mortem* de EA de acuerdo a la patología neurofibrilar y β -amiloide placas. Los casos control se consideraron aquellos sin síntomas neurológicos y sin lesiones en el examen neuropatológico. El tiempo entre la muerte y el procesamiento fue de entre 2 y 12 h.

Análisis Immunoblot

Los ensayos de *Western blot* se desarrollaron como se ha descrito previamente (Carro *et al.*, 2002. *Nat Med.* 8(12):1390-7). Las proteínas se aislaron a partir de tejido cerebral o de cultivos celular por métodos estándares. Los tejidos cerebrales se homogeneizaron en tampón de lisis (50 mM de Tris HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 2% de SDS) que contiene una mezcla de inhibidores de la proteasa. Los homogeneizados se centrifugaron, y los sobrenadantes se incluyeron en 4-20% de SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (GE Healthcare), y se incubaron con los anticuerpos específicos. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-ratón NPCT (1:500), y el ratón anti-actina β (1:10000, Millipore). Se utilizó un secundario-HRP conjugado de cabra anti-ratón (1:20000, Bio-Rad Laboratories).

Estudios inmunohistoquímicos

Tejido animal

Los cerebros fijos se redujeron en un vibratomo (*Leica Microsystems*) a 50 μ m, y las secciones de tejido se recogieron en frío PB 0,1 M, y se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios a 4 °C. Todos los anticuerpos primarios se diluyeron en tampón de fosfato 0,1 M que contenía 0,5 % de albúmina de suero bovino y 0,5 % de Triton X - 100. Para detectar los depósitos A β , se pre-incubaron secciones de cerebro de ratones APP/PS1 con ácido fórmico al 88 %, y se inmunotñieron como se describió previamente (Carro *et al.*, 2002. *Nat Med.* 8(12):1390-7). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-ratón NPCT (1:300), ratón anti- A β (1:500, MBL, Nagoya, Japón), ratón anti-NeuN (1:1000), conejo anti- GFAP (1:6000, Sigma), de conejo anti-Iba1 (1:500), y de conejo anti-A β (1:500, Millipore). La tinción de anticuerpo primario se reveló usando el método del complejo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC kit, Vector

Laboratories) y DAB reacción cromogénica (Vector Laboratories), o en fluorescencia conjugada anti-IgG de ratón 488 (1:1000, FluoProbes® , Interchim) , y rojo Texas anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (1:1000, Jackson Immunoresearch, West Grove). DAPI (1:10000, Sigma) se usó para teñir los núcleos.

5 Una serie adicional se utilizó para la tinción de Nissl con violeta de cresilo (Acros Organics). El número de neuronas se determinó estereológicamente siguiendo el método descrito por Trejo *et al.*, 2001. *J Neurosci.* 21(5):1628-34. Para estimar el número de neuronas en giro dentado, las células de Nissl-positivas se contaron en una
10 serie de uno de cada seis de las secciones (2,0 mm de rostral a bregma y -4,3 mm de caudal a bregma) bajo un microscopio óptico (Carl Zeiss Microimaging GmbH) a una magnificación de 40X.

Cultivo celular

15 Para la inmunocitoquímica, las neuronas y los astrocitos se cultivaron en portaobjetos de vidrio de poli-L-lisina, y se trataron con A β ₁₋₄₂ (10 M) durante 24 y 48 h, después de lo cual se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 1 h. Luego, las células se incubaron con un anti-NPCT de ratón (1:500), y un anticuerpo de conejo anti-GFAP (1:6000). Todos los anticuerpos primarios se diluyeron en PB 0,1 M que contenía 0,5%
20 albúmina de suero bovino y 0,5% de Triton X-100. Los anticuerpos secundarios como los anteriores.

Cuantificación de citoquinas y chemoquinas en plasma.

Los niveles de interleucina (IL)-1 β , IL-6, adiponectina, TNF- α , MCP-1, leptina, y MIP-2
25 se cuantificaron en el plasma de APP/PS1 y ratones *wild-type* utilizando tecnología de multianálisis Luminex (Procarta citoquina kit de ensayo: Affymetrix, Santa Clara, CA).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como las medias $\pm$ error estándar de la media (SEM). Las
30 diferencias entre grupos se analizaron mediante un análisis unidireccional de la

varianza. Las comparaciones post hoc entre dos grupos se realizaron con la prueba de t de *Student*. Todos los cálculos se realizaron con el software SPSS v15.0. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

5 Resultados

Expresión celular de NPCT

Ensayos de doble inmunofluorescencia demostraron que NPCT se expresó en neuronas corticales y del hipocampo (Fig. 1A), astrocitos (Fig. 1B), y microglia (Fig. 1C), como lo demuestra el uso de marcadores celulares específicos, incluyendo NeuN, GFAP, y Iba1, respectivamente.

Para examinar si $A\beta$ modula la expresión NPCT en las células neuronales y astrocitos, los cultivos celulares fueron tratados con $A\beta_{42}$ (5 μ M) durante 24 y 48 horas. Hemos encontrado que $A\beta_{42}$ indujo un incremento marcado de la expresión de NPCT en astrocitos (Fig. 2A), y neuronas (Fig. 2B) tratados con $A\beta_{42}$ para 24, y 48 horas. La cuantificación de la inmunorreactividad de NPCT de las neuronas cultivadas demostraron el aumento de expresión de NPCT (Fig. 2C).

NPCT y anti-NPCT indujeron neuroprotección *in vitro*.

Para investigar si NPCT es capaz de regular la citotoxicidad inducida por $A\beta$, decidimos estudiar la influencia de anti-NPCT en una neurotoxicidad inducida por $A\beta$. Para probar esta hipótesis, las proteínas anti-NPCT y $A\beta_{42}$ se añadieron a cultivos de células neuroblastoma SK-SY-5Y. Como se muestra en la Figura 3, después de 24 y 48 h de incubación con $A\beta_{42}$, se aumentó la muerte celular.

Sin embargo, cuando anti-NPCT está a la vez presente en el medio, la citotoxicidad de $A\beta_{42}$ se bloqueó completamente utilizando todas las concentraciones (2,5, 25, 50

µg/ml), y a 24 (Fig. 3A), y 48 horas (Fig. 3B) después de la administración del tratamiento.

Anti-NPCT induce neuroprotección/protege contra la pérdida neuronal en el modelo de ácido domoico.

Se ha probado si la administración de anti-NPCT también bloquearía la muerte neuronal inducida por ácido domoico. Como se muestra en la Figura 4, el ácido domoico induce un marcado daño neuronal. En los ratones tratados con ácido domoico, se redujeron las neuronas teñidas con Nissl de la hilio de la giro dentado en el hipocampo, mientras que el tratamiento con anti-NPCT impidió la muerte neuronal inducida por la lesión (Fig. 4A). La cuantificación estereológica reveló que la inyección de ácido domoico en ratones resultó en la pérdida de 53,26% de las neuronas en el hilio del hipocampo, en comparación con los ratones control ($p < 0,05$, Fig. 4B), mientras que el tratamiento con anti-NPCT impidió significativamente la lesión inducida por la muerte neuronal (Fig. 4B).

Pruebas de comportamiento

Para evaluar el potencial ansiolítico se utilizó el "laberinto elevado en cruz" («*Elevated plus-maze*») como modelo de conducta ansiosa y para el «*screening*» de potenciales ansiolíticos, y las pruebas a campo abierto. En la prueba de laberinto elevado, un paradigma bien establecido para detectar tanto el comportamiento ansiolítico y como axiogenico-, anti-NPCT aumentó la proporción de entradas en los brazos abiertos en comparación con los APP/PS1 ratones tratados con vehículo (Fig. 5A). El tratamiento anti-NPCT no alteró las entradas o el tiempo dedicado a la exploración del brazo en ratones *wild-type* (Fig. 5A). Agentes ansiolíticos son conocidos por aumentar significativamente visitas en los brazos abiertos.

En la prueba de campo abierto, la ansiedad-como *thigmotactic* ('pared siguiente') comportamiento se midió por la frecuencia y la duración total de la visitas a la zona central (30x30 cm). Se sabe que los ansiolíticos aumentan estos criterios de valoración del comportamiento. Se observó que los ratones APP/PS1, en comparación con los

controles WT, mostraron una disminución de la conducta *thigmotactic* como se determina en la duración zona central (Fig. 5B). En los ratones APP/PS1 tratados con anti-NPCT se encontró que el tratamiento fue capaz de atenuar este comportamiento mostrando patrón de comportamiento similares a los observados en ratones WT (Fig. 5B).

Anti-NPCT induce neuroprotección en modelos amiloides

Se evaluó la expresión de PCT en la corteza cerebral y el hipocampo de los ratones APP/PS1. Por *Western blot*, se encontraron cambios estadísticamente significativos en ambas áreas cerebrales determinadas a los 3 (Fig. 6B) y 12 meses de edad (Fig. 6A) en la comparación de APP/PS1 con los ratones *wild-type* emparejados por edad. Sin embargo, a los 12 meses de edad APP/PS1, y usando ensayos de inmunohistoquímica, se observó una importante inmunorreactividad de NPCT tanto en células corticales y del hipocampo (Fig. 7A). El marcado por inmunofluorescencia doble GFAP / NPCT (Fig. 7B), y los experimentos A β /NPCT demostraron que los examinados, a la edad de 12 meses, las placas A β estaban rodeadas con astrocitos y grupos de depósito NPCT-positivo (Fig. 7C) GFAP-positivas.

A continuación, se determinó la expresión PCT en la corteza cerebral y el hipocampo de los tejidos humanos. En contraste con el modelo de ratón transgénico de la amiloidosis, los niveles de PCT medidos por western blot se mejoraron drásticamente tanto cortical (Fig. 8A) como en el hipocampo (Fig. 8B) de las muestras de pacientes con EA en comparación con los sujetos sanos. Se observó inmunorreactividad de NPCT principalmente en las neuronas corticales (Fig. 8C), y también se concentró en torno A β placas, siendo positiva tanto para las NPCT y A β marcadas (Fig. 8D).

Efectos de neutralización de NPCT sobre los niveles plasmáticos de citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas.

Las citoquinas inflamatorias aparecieron incrementadas en el plasma de los ratones

APP/PS1 de 3 meses de edad en comparación con los ratones WT. Como se indica en la Figura 9 A-G, los niveles plasmáticos de IL-1 β , IL-6, TNF α , MCP-1, leptina, y MIP-2 aumentaron en 642 veces, 3,5 veces, 6 veces, 59 veces, 15,8 veces y 47,3 veces, respectivamente.

5 Los niveles de adiponectina se redujeron 0,9 veces en los ratones APP/PS1 en comparación con los ratones WT.

10 La neutralización NPCT tuvo un efecto global significativo en la liberación de estas citoquinas inflamatorias. El tratamiento anti-NPCT en ratones APP/PS1 disminuyó los niveles plasmáticos de IL-1 β , IL-6, TNF α , MCP-1, leptina, y MIP-2 en 80,77%, 63,89%, 39,58 %, 100%, 46,19%, 63,90%, respectivamente, en comparación con los ratones APP/PS1 tratados con el vehículo. Sin embargo, en contraste con el tratamiento mediador inflamatorio anti-NPCT, no modificaron los niveles de adiponectina.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un agente modulador de la actividad biológica de N-Procalcitonina (N-PCT) en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa,

5 donde dicho agente modulador presenta capacidad de unión a N-PCT y es un inhibidor de la actividad biológica de N-PCT *in vitro* y/o *in vivo*; y

 donde N-PCT consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO:

1, una variante o un fragmento del mismo, donde preferiblemente dicha variante consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 2 y preferiblemente
10 dicho fragmento consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 3.

2.- El uso de un agente modulador según la reivindicación anterior, donde dicho agente modulador presenta capacidad de unión a un péptido que consiste esencialmente en la secuencia SEQ ID NO: 3.

15 3.- El uso de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho agente modulador inhibe la neurotoxicidad inducida por N-PCT.

4.- El uso de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde
20 la inhibición de la actividad biológica de N-PCT se caracteriza por presentar al menos uno de los efectos siguientes:

- neuroprotección *in vitro*, preferiblemente determinada como reducción de la neurotoxicidad inducida por el péptido beta-amiloide *in vitro*;
- 25 - neuroprotección *in vivo*, preferiblemente determinada como reducción de la pérdida neuronal *in vivo*, por ejemplo en un modelo de neurotoxicidad inducida por ácido domoico o en un modelo de ratón transgénico de amiloidosis; y/o
- reducción de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y/o quimiocinas *in vivo* preferiblemente determinada en un modelo de ratón
30 transgénico de amiloidosis.

5.- El uso de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde el agente modulador es un péptido aislado.

6.- El uso de un péptido aislado según la reivindicación 5, donde dicho péptido se ha obtenido por un procedimiento de *biopanning*.

5 7.- El uso de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde el agente modulador es un anticuerpo o un fragmento del mismo, preferiblemente un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv o un fragmento single chain Fv (scFv).

10 8.- El uso de un anticuerpo según la reivindicación 7 donde dicho anticuerpo, se ha obtenido por un procedimiento que comprende:

- 15 a) inmunizar un animal mamífero con un péptido que consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, una variante o fragmento del mismo, donde preferiblemente dicha variante consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 2 y preferiblemente dicho fragmento consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 3
- b) opcionalmente, adicionar una cisteína en uno de los extremos de dicho péptido y/o conjugar el péptido con un adyuvante;
- c) extraer el antisuero del animal,
- 20 d) purificar los anticuerpos, preferiblemente con una columna de proteína A, y
- e) opcionalmente, purificar los anticuerpos que se unen específicamente a N-PCT.

9.- El uso de un anticuerpo según la reivindicación 7 donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y se ha obtenido por un procedimiento que comprende:

- 25 a) inmunizar un animal mamífero con un péptido que consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, una variante o fragmento del mismo, donde preferiblemente dicha variante consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 2 y preferiblemente dicho fragmento consiste esencialmente en un péptido de secuencia SEQ ID NO: 3
- 30 b) opcionalmente, adicionar una cisteína en uno de los extremos de dicho péptido y/o conjugar el péptido con un adyuvante;
- c) obtener el suero de dicho(s) animal(es) y analizar el título de anticuerpos que se unen a dicho péptido, preferiblemente por ELISA, ,

- d) obtener los esplenocitos de dicho(s) animal(es) y e inmortalizarlos,
- e) expandir los clones, y
- f) opcionalmente, seleccionar los mejores productores.

5 10.- Uso de una proteína de fusión que comprende:

- a) un péptido (i), que consiste en el agente modulador definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y
- b) un péptido (ii) que consiste en un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula;

10 en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

11.- El uso de una proteína de fusión según la reivindicación 10, en la que dicho péptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre
15 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

12.- El uso de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, que comprende, además:

- 20 - un péptido espaciador situado entre dicho péptido (i) y dicho péptido (ii); y/o
- una secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención.

13.- Uso de una composición farmacéutica que comprende una cantidad
25 terapéuticamente eficaz de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, de un péptido y/o de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, o de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de
30 una enfermedad neurodegenerativa.

14.- El uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 13, que comprende, además otro principio activo.

15.- Uso de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, o una composición farmacéutica
5 según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, donde la enfermedad neurodegenerativa es el resultado de un deterioro de las neuronas causado por procesos de oxidación, de desestabilización de los microtúbulos por formación de ovillos neurofibrilares, de desequilibrios en la concentración de iones, en los sistemas de neurotransmisión, y otras enfermedades o trastornos relacionados con una proteína
10 agregante.

16.- Uso de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, o una composición farmacéutica
15 según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, donde la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad o trastorno relacionado con una proteína agregante que se selecciona de la lista que consiste en enfermedad de Parkinson (PD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA), enfermedad de
20 Alzheimer, síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia frontotemporal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington, Diabetes tipo II, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad,
25 neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y trastornos similares a la esquizofrenia.

17.- Uso de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, o una composición farmacéutica
30 según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, donde dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con el incremento de péptidos beta-amiloides y/o hiperfosforilación de tau y/o neurotoxicidad inducida por ácido domoico.

18.- , Uso de un agente modulador según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, o una composición farmacéutica
5 según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, donde dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

FIGURAS

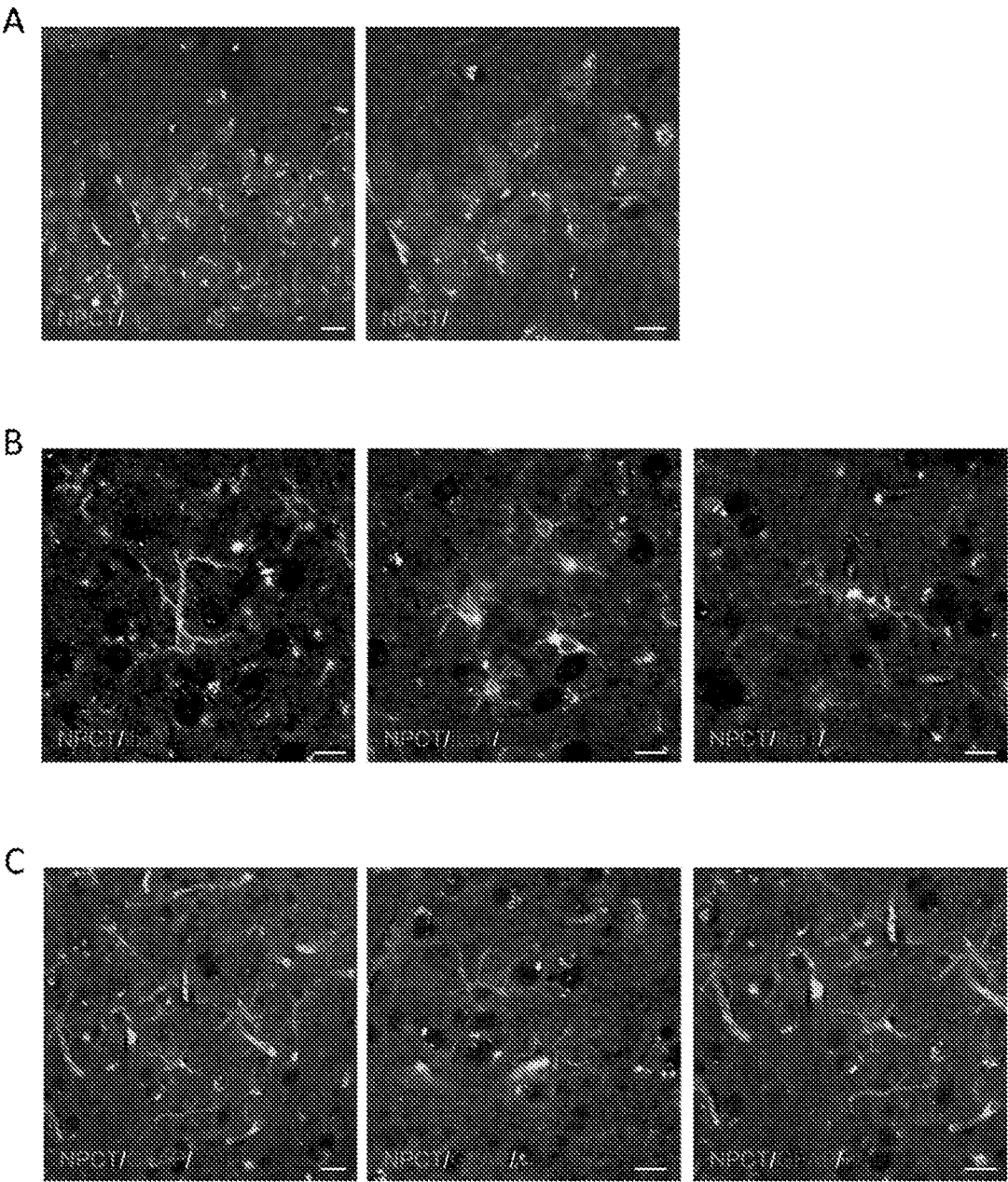


Fig.1

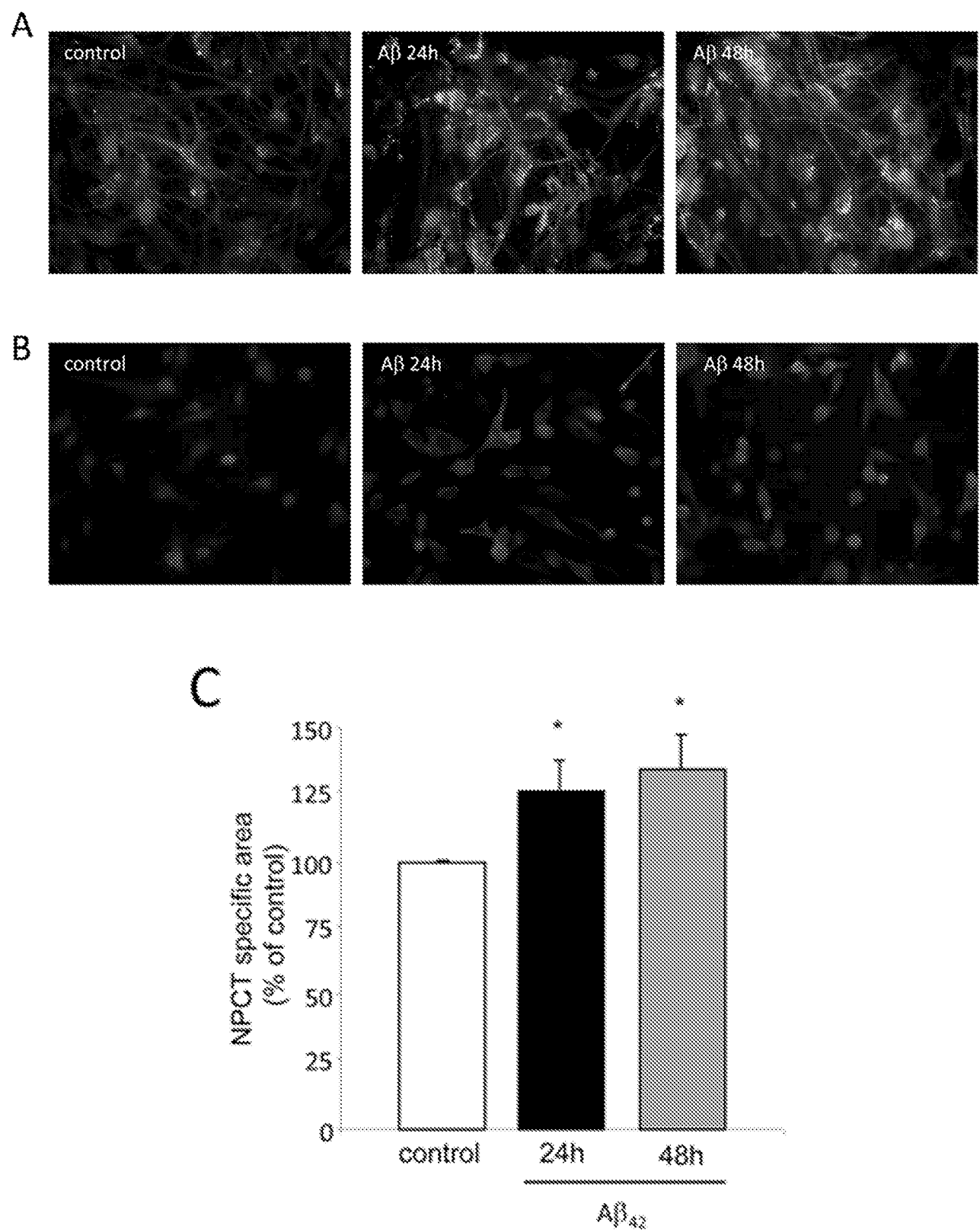


Fig. 2

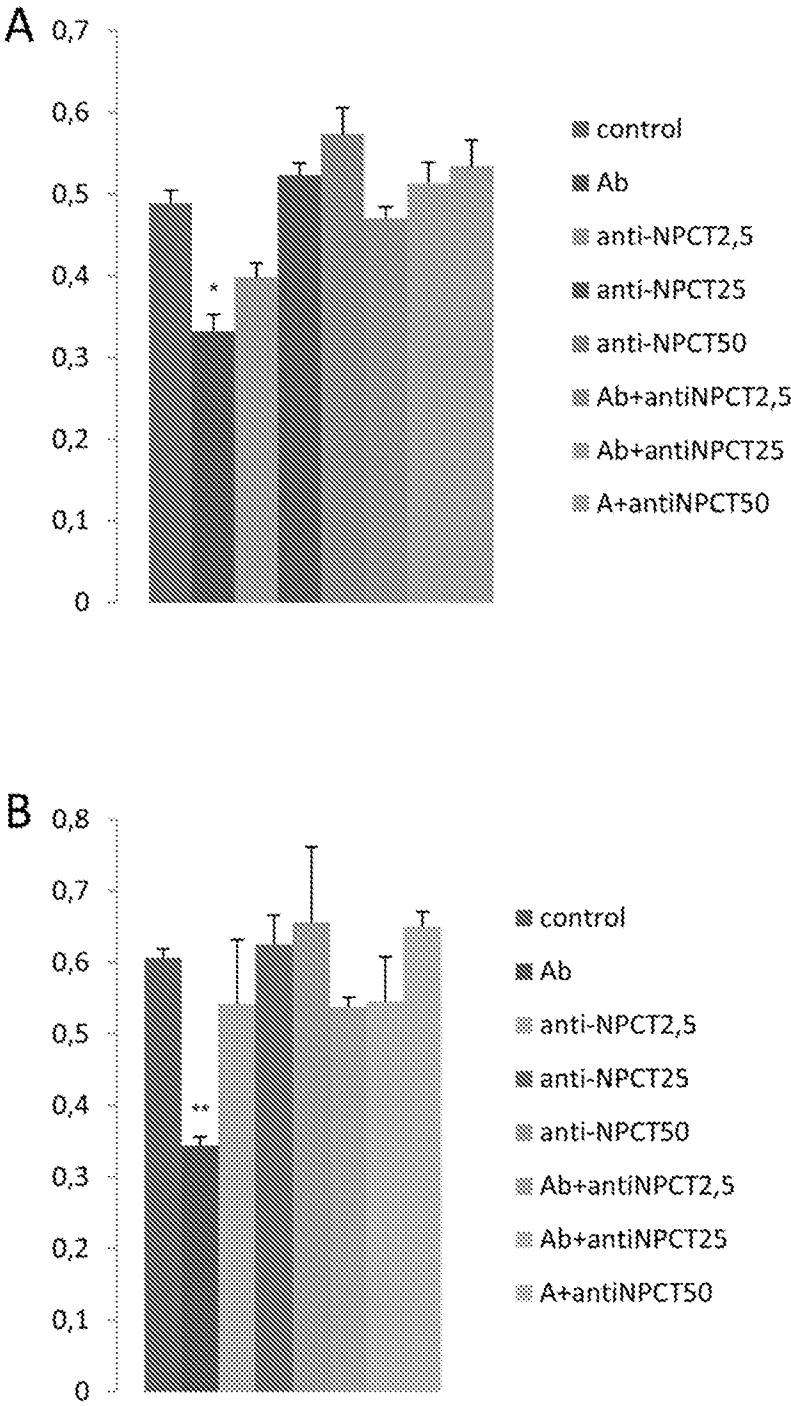


Fig 3

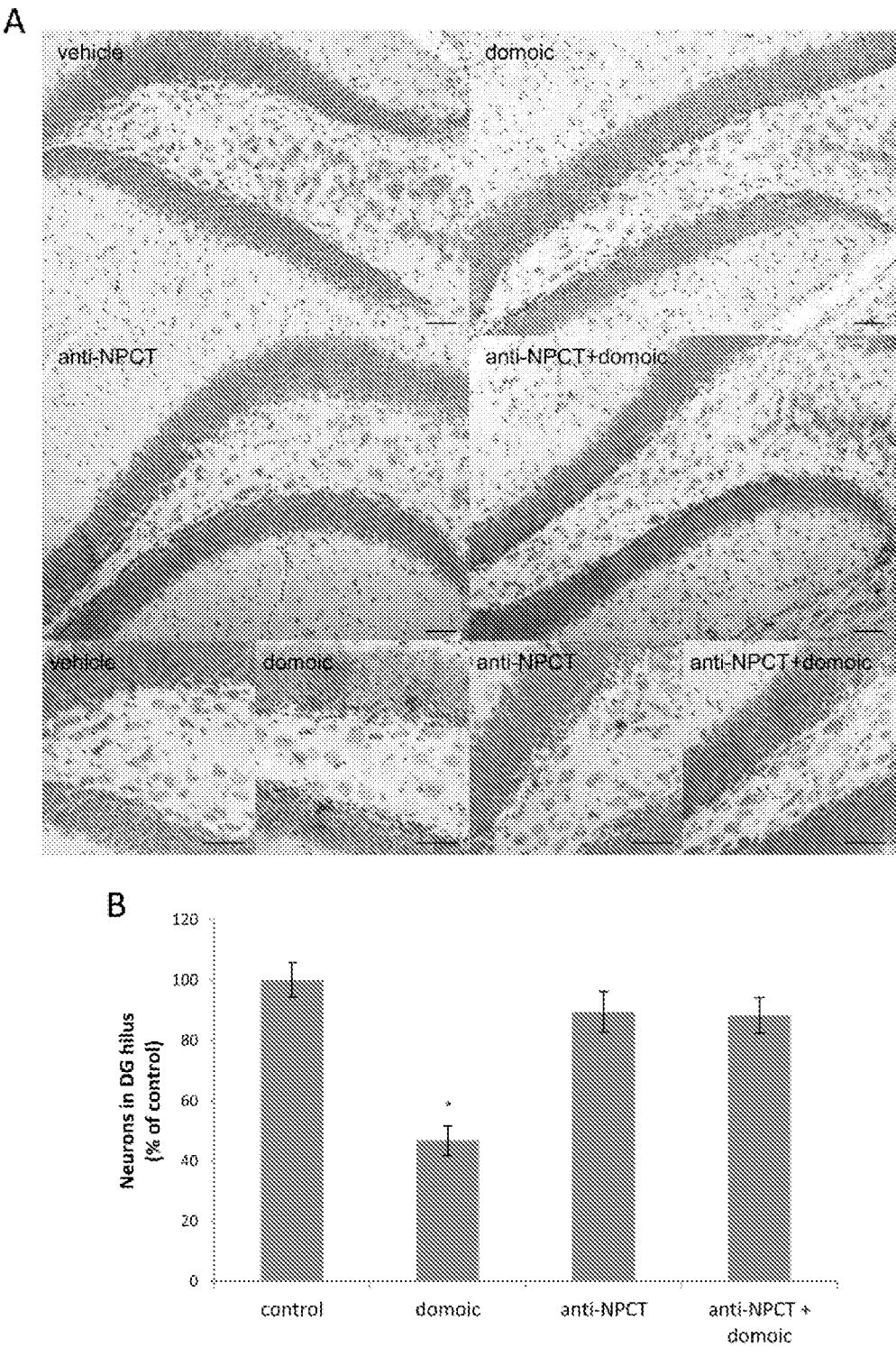


Fig. 4

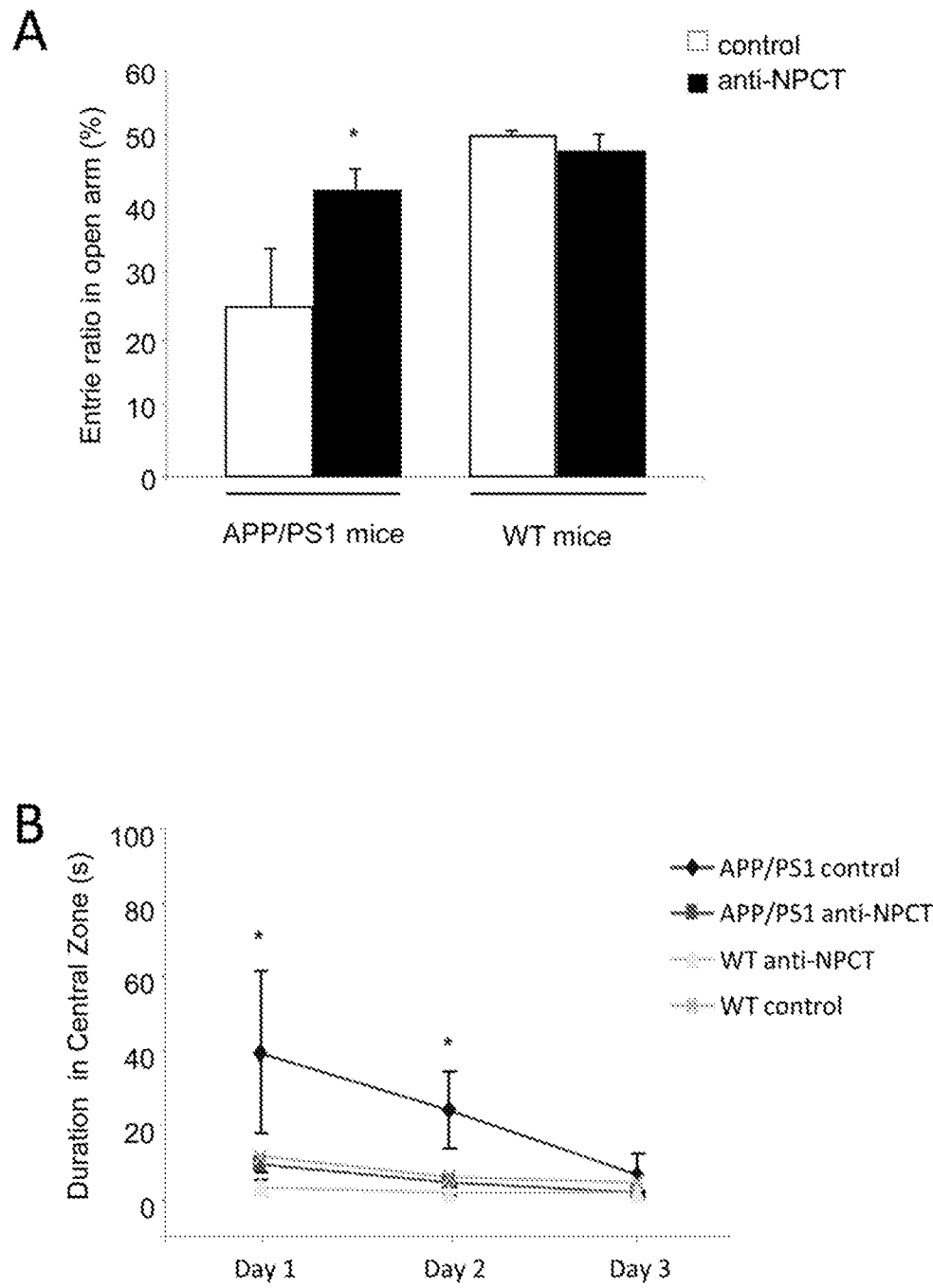


Fig. 5

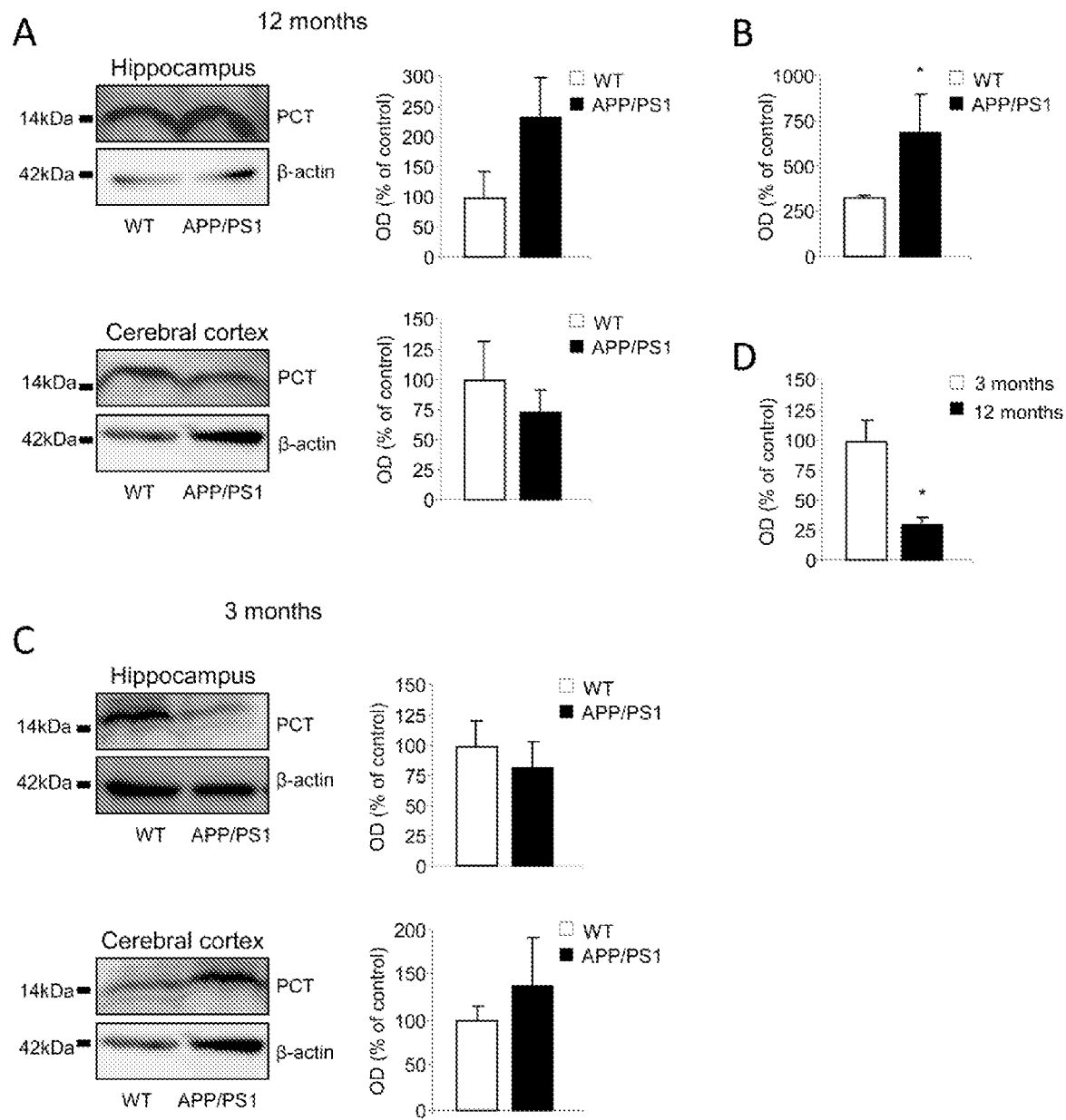


Fig 6

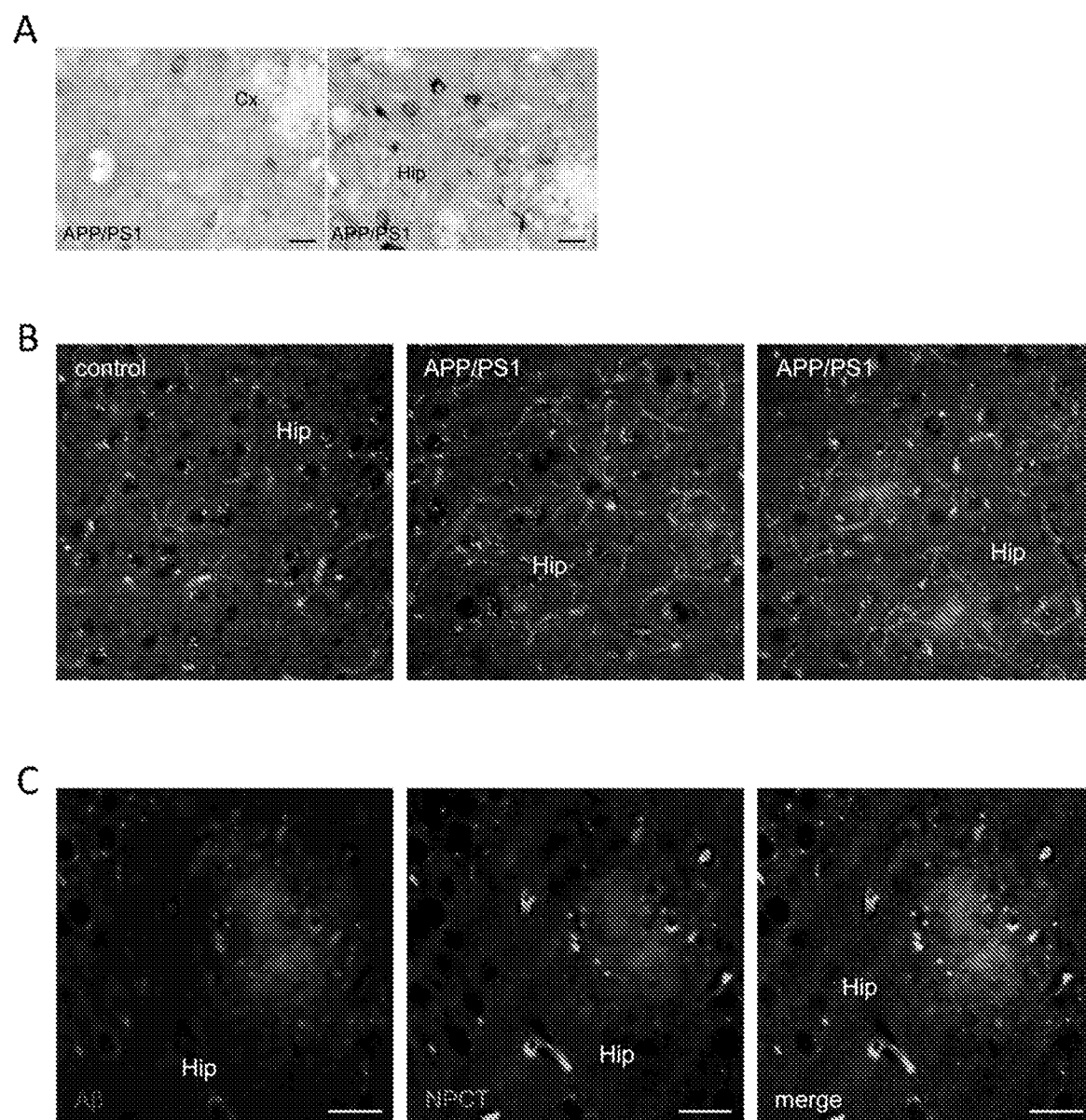


Fig. 7

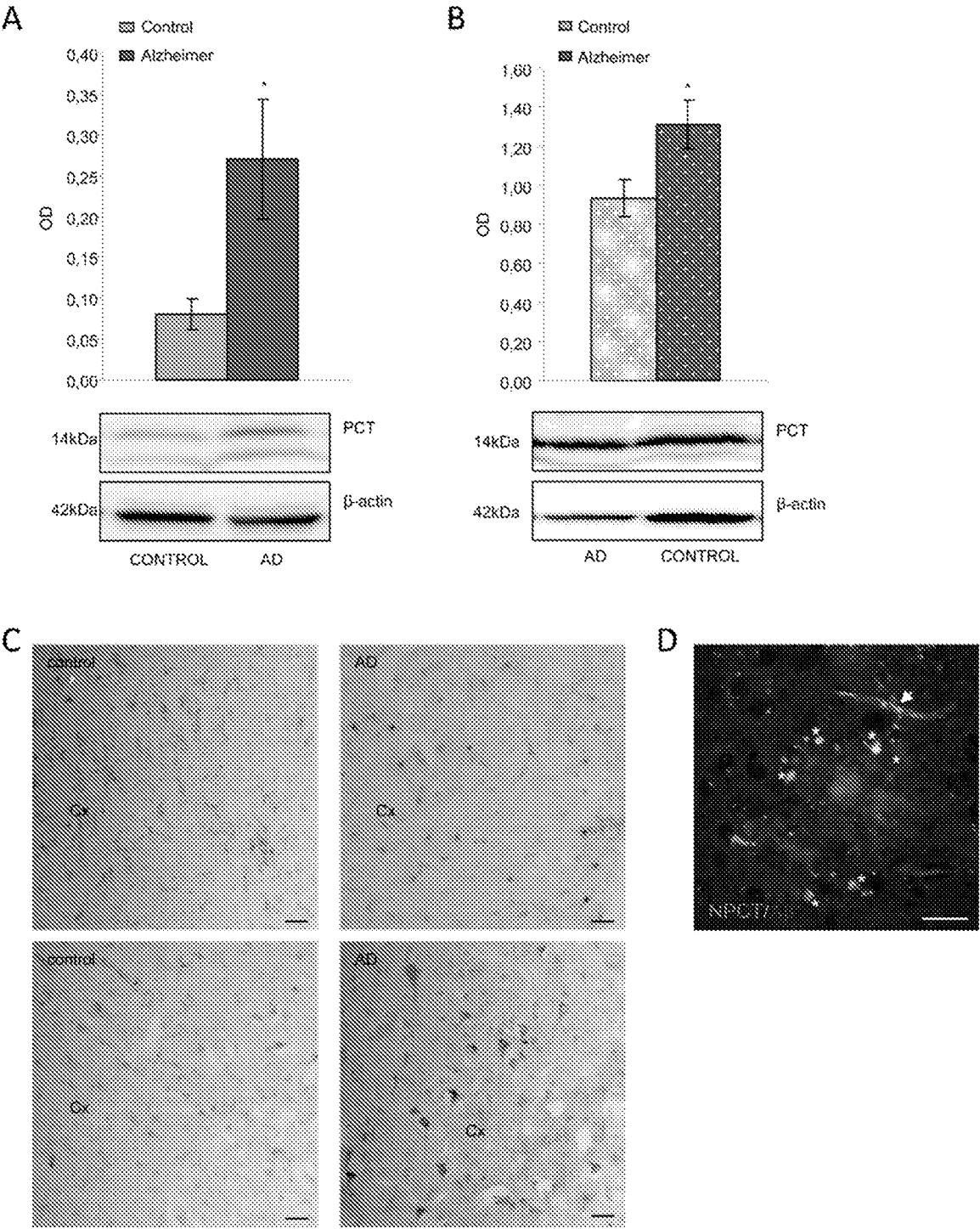


Fig. 8

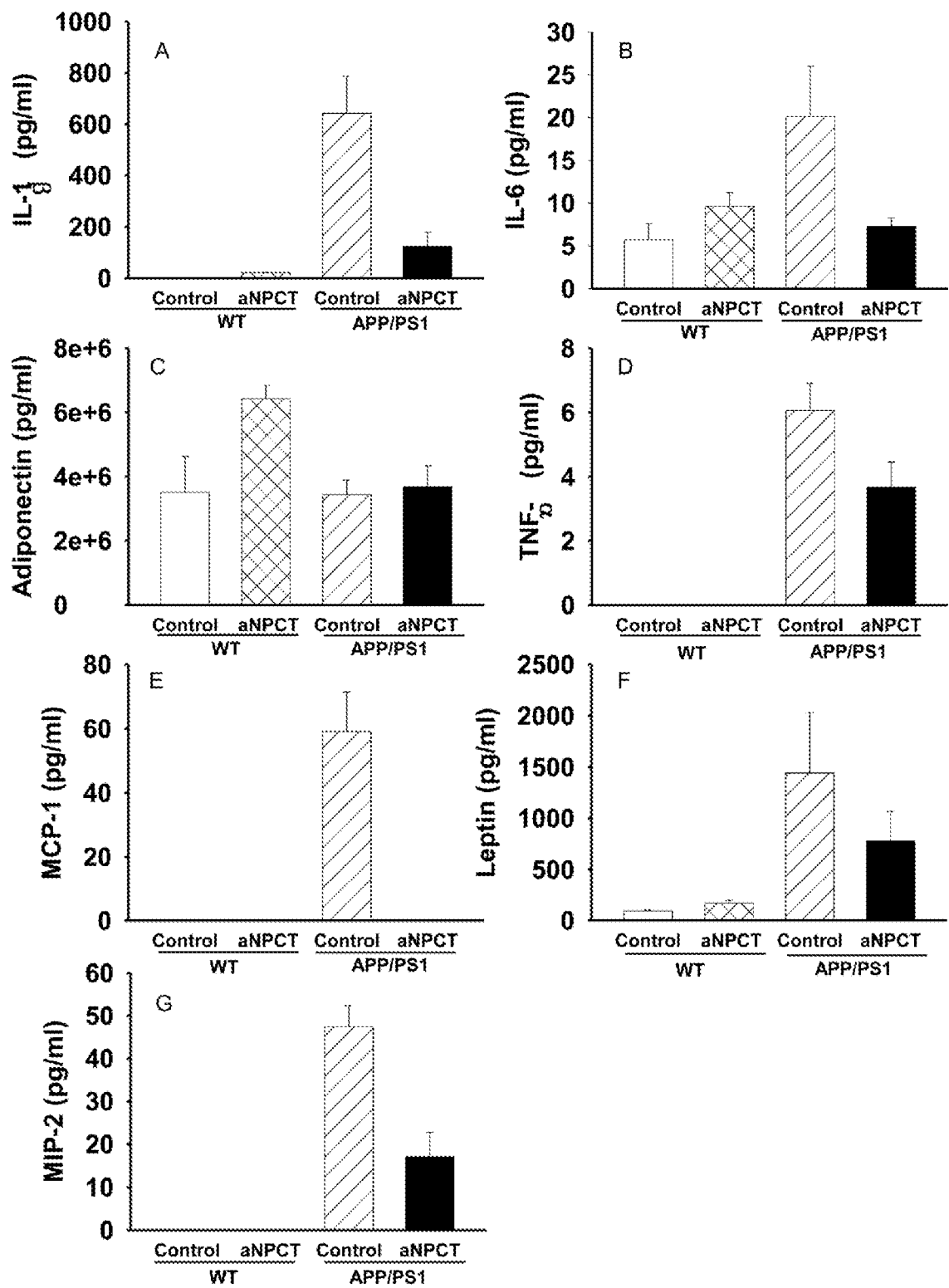


Fig 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**A61K39/395** (2006.01)**A61P25/28** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE/ELSEVIER, bases de datos de texto completo TXT, EMBL-EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013046085 A1 (TAVARES VAZQUEZ EVA ET AL.) 21/02/2013, paragraphs [0023]-[0029], [0033]-[0040] and [0043].	1, 2, 7-9, 13, 15-18
A	WO 2010125076 A1 (BRAHMS AG ET AL.) 04/11/2010, the whole document.	1, 2, 7-9, 13, 15-18
A	WO 2007009789 A1 (BRAHMS AG ET AL.) 25/01/2007, the whole document.	1, 2, 7-9, 13, 15-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31/03/2015

Date of mailing of the international search report

(01/04/2015)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer

M. García Coca

Telephone No. 91 3493411

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070004

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **3-6, 10-12 y 14**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplemental box

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- see supplemental box**
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070004

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2013046085 A1	21.02.2013	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO2007009789 A1	25.01.2007	JP2009501917 A	22.01.2009
		JP4837734B B2	14.12.2011
		ES2353722T T3	04.03.2011
		AT483982T T	15.10.2010
		US2008206797 A1	28.08.2008
		DE102005034174	08.02.2007
		A1	02.04.2008
		EP1904855 A1	06.10.2010
-----	-----	EP1904855 B1	-----
WO2010125076 A1	04.11.2010	-----	22.10.2012
		JP2012525568 A	17.05.2012
		US2012122114 A1	28.03.2012
		CN102395887 A	07.03.2012
-----	-----	EP2425259 A1	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070004

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070004

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE/ELSEVIER, bases de datos de texto completo TXT, EMBL-EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	US 2013046085 A1 (TAVARES VAZQUEZ EVA ET AL.) 21/02/2013, párrafos [0023]-[0029], [0033]-[0040] y [0043].	1, 2, 7-9, 13, 15-18
A	WO 2010125076 A1 (BRAHMS AG ET AL.) 04/11/2010, todo el documento.	1, 2, 7-9, 13, 15-18
A	WO 2007009789 A1 (BRAHMS AG ET AL.) 25/01/2007, todo el documento.	1, 2, 7-9, 13, 15-18

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
31/03/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
01 de Abril de 2015 (01/04/2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Coca
Nº de teléfono 91 3493411

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2015/070004

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☒ Las reivindicaciones n°s: **3-6, 10-12 y 14**
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

Ver Recuadro Suplementario.

3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver Recuadro Suplementario.

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070004

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2013046085 A1	21.02.2013	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
WO2007009789 A1	25.01.2007	JP2009501917 A	22.01.2009
		JP4837734B B2	14.12.2011
		ES2353722T T3	04.03.2011
		AT483982T T	15.10.2010
		US2008206797 A1	28.08.2008
		DE102005034174	08.02.2007
		A1	02.04.2008
		EP1904855 A1	06.10.2010
-----	-----	EP1904855 B1	-----
WO2010125076 A1	04.11.2010	-----	22.10.2012
		JP2012525568 A	17.05.2012
		US2012122114 A1	28.03.2012
		CN102395887 A	07.03.2012
-----	-----	EP2425259 A1	-----

CONTINUACIÓN DE RECUADRO II:

Las **reivindicaciones 3 y 4** carecen de características técnicas, en ellas únicamente se describen los efectos técnicos que se esperan obtener con el uso de un modulador de la actividad biológica de N-Procalcitonina (Regla 6.3 PCT).

Las **reivindicaciones 5 y 6** presentan falta de claridad (art. 6 PCT).

En estas reivindicaciones se indica que el agente modulador de la actividad biológica de N-PCT es un péptido aislado (Reiv. 5) que se obtiene mediante la técnica de biopanning (Reiv. 6). Según se indica en la descripción (página 17 líneas 25-28) “esta técnica permite identificar péptidos que presentan una unión de alta afinidad con una proteína determinada (en este caso, NPTC), y cuantificar, posteriormente, mediante ensayos in vitro, la capacidad de los péptidos para inhibir la actividad biológica de dicha proteína. Es decir, que el mero hecho de identificar péptidos mediante este procedimiento, no aporta ninguna característica técnica a los dichos péptidos, que les aporte una ventaja técnica o que les diferencie de otros péptidos identificados mediante otro procedimiento.

Para poder identificar un péptido de forma inequívoca, se debe de dar información sobre su secuencia de aminoácidos, o al menos sobre algún elemento técnico de tipo estructural.

Las **reivindicaciones 10-12 y 14** no están basadas en descripción (art. 6 PCT).

CONTINUACIÓN DE RECUADRO III:

La solicitud internacional no presenta un concepto general único tal y como se exige en la Regla 13.1 PCT. El concepto general que se desprende de la reivindicación 1, es el uso de **un agente modulador de la actividad biológica de la N-PCT** para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. Para que una patente que presenta varios compuestos (o el uso de varios compuestos) cumpla con el requisito de unidad de invención, éstos han de tener una estructura química común que sea la que les confiera una actividad común. Como no está claramente definido el objeto de la invención y los compuestos propuestos en la presente solicitud carecen de dicha estructura química común, no existe un concepto general único, ya que entre estos compuestos no existe una relación técnica relativa a uno o varios elementos técnicos particulares idénticos o correspondientes.

Como tampoco se encuentran otras características que puedan considerarse como elementos particulares en el sentido de la Regla 13.2 PCT, existe falta de unidad de invención. Se distinguen las siguientes invenciones:

Invención 1: Uso de un péptido modulador de la actividad biológica de N-PCT en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. (Reiv. (1 y 2) parcialmente, 5 y (13, 15-18) parcialmente)

Invención 2: Uso de un anticuerpo modulador de la actividad biológica de N-PCT en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. (Reiv. (1 y 2) parcialmente, 7-9 y (13, 15-18) parcialmente)

Invención 3: Uso de una proteína de fusión moduladora de la actividad biológica de N-PCT en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. (Reiv. (1 y 2) parcialmente, 10-12 y (13, 15-18) parcialmente)