

Figura 1

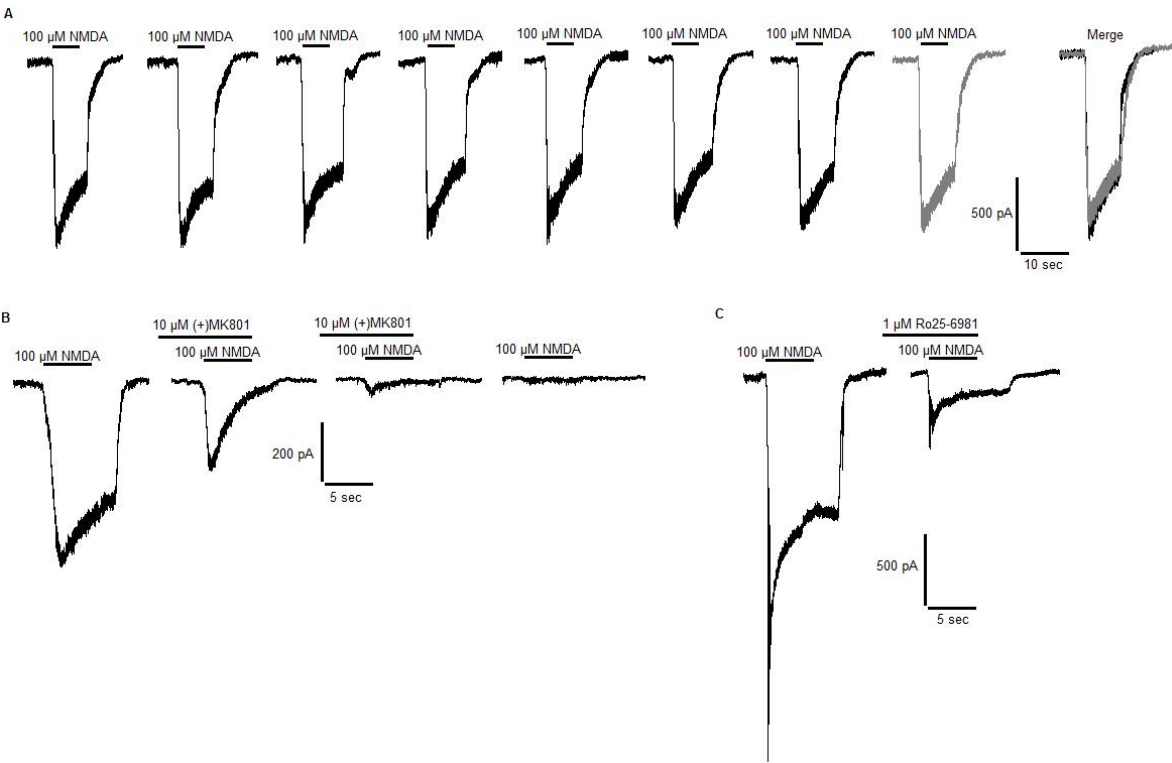


Figura 2

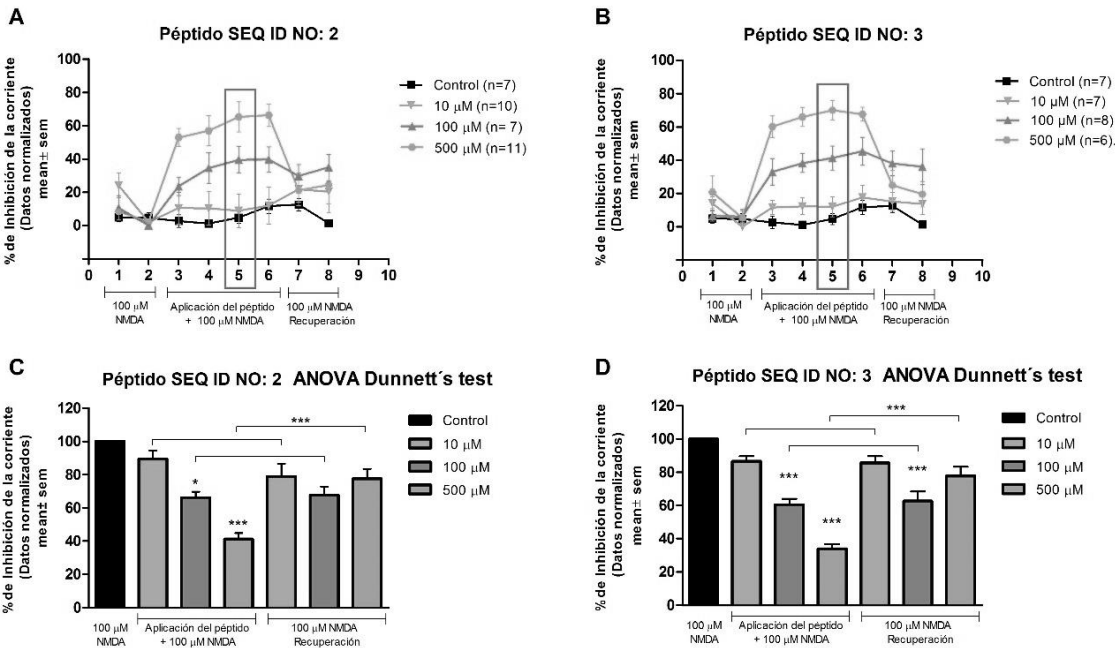


Figura 3

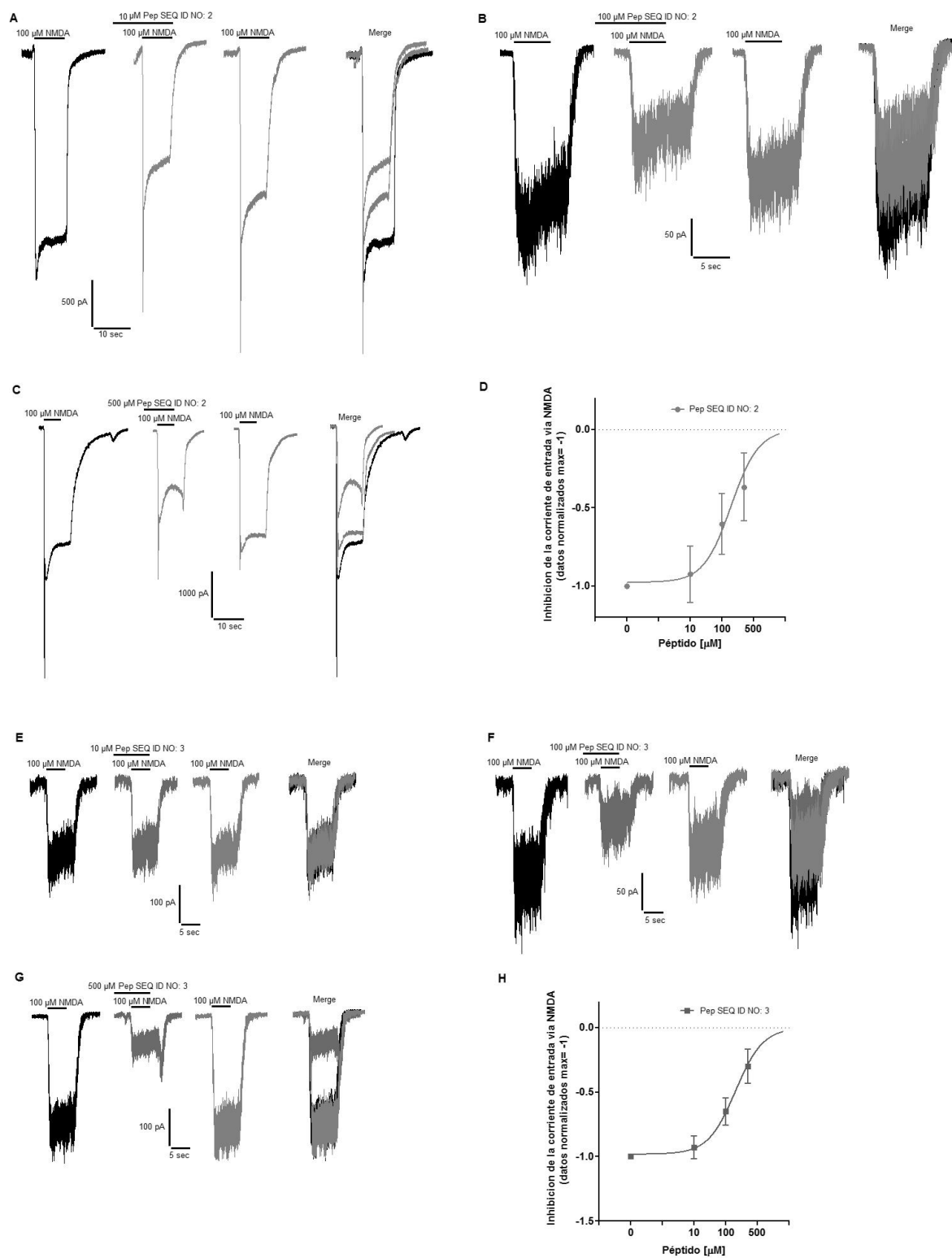


Figura 4

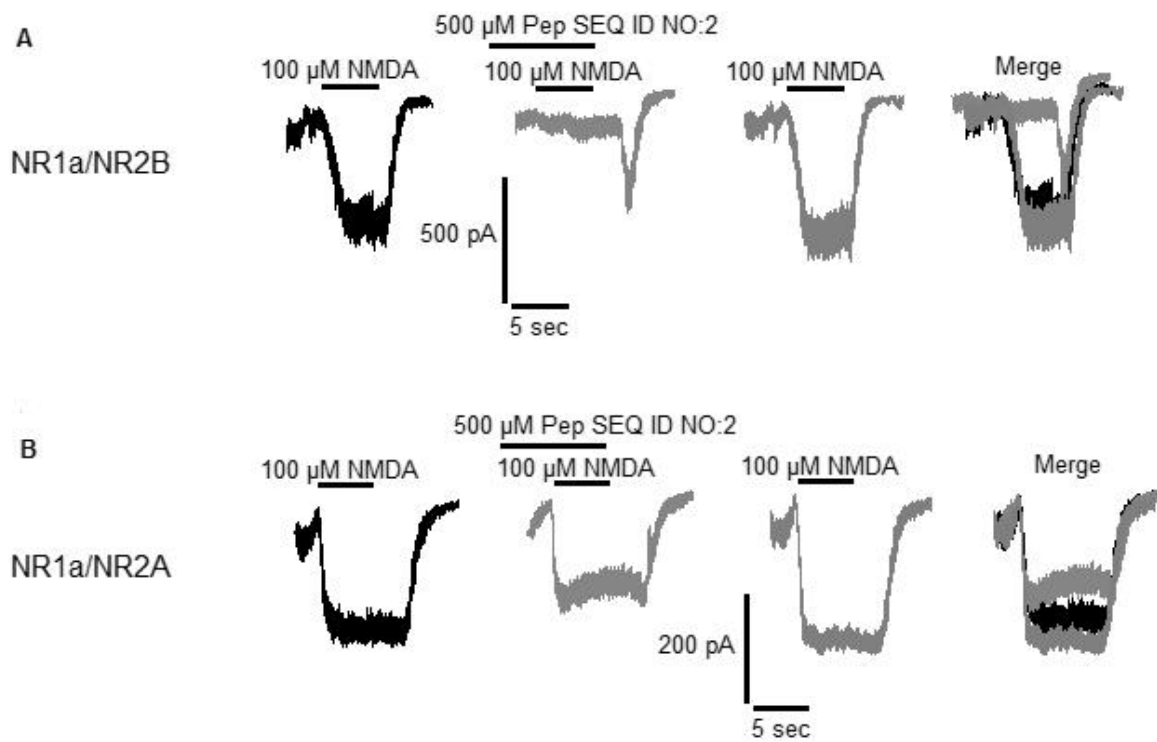
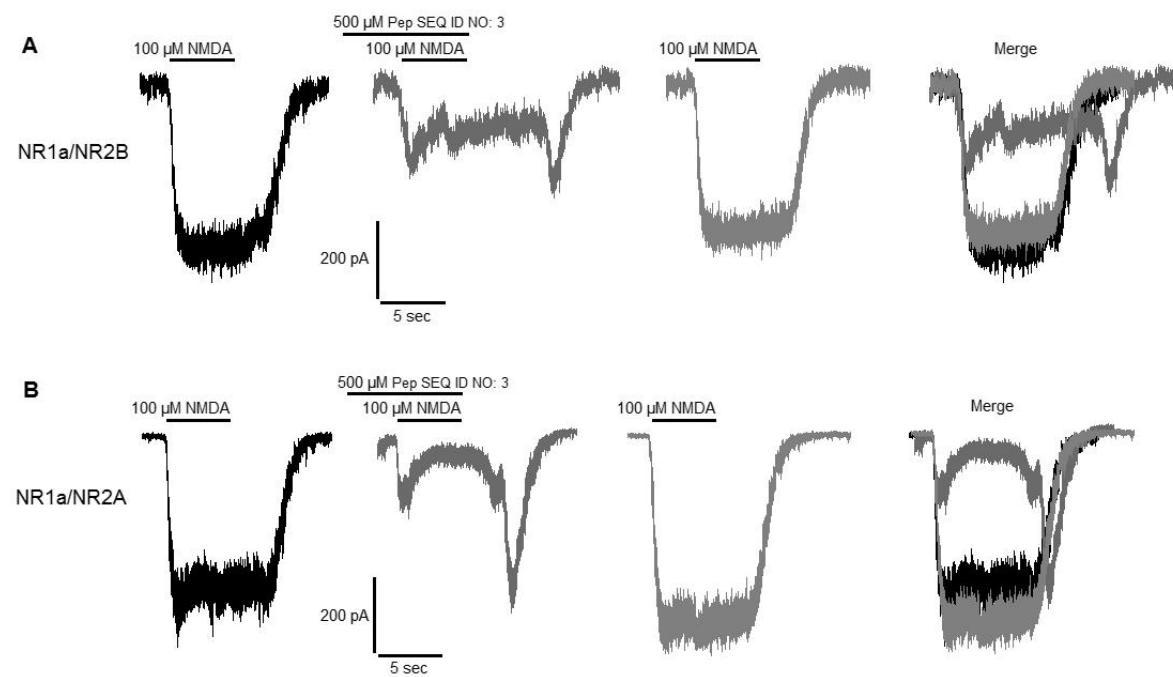


Figura 5



Reivindicaciones

Se reclama:

1. Dos péptidos moduladores del receptor NMDA caracterizados por ser antagonista del receptor NMDA y estar conformados por 17 aminoácidos.
2. Uno de los péptidos acorde a la reivindicación 1 caracterizado por presentar la secuencia SEQ ID NO:2 (1975,03 Da) y presentar selectividad hacia la subunidad GluN2B del receptor NMDA.
3. Uno de los péptidos acorde a la reivindicación 1 caracterizado por presentar la secuencia SEQ ID NO:3 (1981,99 Da) y presentar selectividad hacia las subunidades GluN2B y GluN2A del receptor NMDA.
4. Dos péptidos de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizados por que el C-terminal de cada péptido no está amidado.
5. Dos péptidos de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizado por que los aminoácidos que los conforman presentan configuración tipo L.

Lista de secuencias de los péptidos presentados en esta invención

Información General

- Numero de secuencias: 3

I. Información para secuencia SEQ ID NO: 1

- a) Longitud: 17
- b) Tipo: aminoácidos
- c) Cadena: solo una cadena
- d) Topología: lineal
- e) Tipo de molécula: péptido
- f) Secuencia: GEYyLQyNQyLIRyKSN-NH₂

Gly-Glu-Gla-Gla-Leu-Gln-Gla-Asn-Gln-Gla-Leu-Ile-Arg-Gla-Lys-Ser-Asn-NH₂

5

10

15

II. Información para secuencia SEQ ID NO: 2

- a) Longitud: 17
- b) Tipo: aminoácidos
- c) Cadena: solo una cadena
- d) Topología: lineal
- e) Tipo de molécula: péptido
- f) Secuencia: GEDDLQDNQDLIRDKSN

Gly-Glu-Asp-Asp-Leu-Gln-Asp-Asn-Gln-Asp-Leu-Ile-Arg-Asp-Lys-Ser-Asn

5

10

15

III. Información para secuencia SEQ ID NO: 3

- a) Longitud: 17
- b) Tipo: aminoácidos
- c) Cadena: solo una cadena
- d) Topología: lineal
- e) Tipo de molécula: péptido
- f) Secuencia: GEDDYQDAQDLIRDKSN

Gly-Glu-Asp-Asp-Tyr-Gln-Asp-Ala-Gln-Asp-Leu-Ile-Arg-Asp-Lys-Ser-Asn

5

10

15

Bogotá, 30 de agosto de 2018

Director
JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Dirección de Nuevas Creaciones
Delegatura para la Propiedad Industrial
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Carrera 13 No. 27-00

Asunto: 15131006

Respuesta al Oficio 6670 de 2018, notificado en fecha 31 de mayo de 2018.
Solicitud de Patente de Invención denominada **“PEPTIDOS SINTÉTICOS
MODULADORES DEL RECEPTOR NMDA”**

Solicitante: Universidad Nacional de Colombia

Respetado Director:

Por medio del presente, me permito dar respuesta al requerimiento de fondo realizado mediante el Oficio 6670 de 2018 respecto a la solicitud de Patente de Invención titulada, **“PEPTIDOS SINTÉTICOS MODULADORES DEL RECEPTOR NMDA”**, radicada bajo el número **15131006**, en los siguientes términos:

1. De la solicitud de patente

Reivindicaciones (Art. 30 D 486, Art. 22 PCT)

En primer lugar, en el Oficio No. 6670, se sostiene que *“la reivindicación 10 carece de sustento porque menciona que el extremo C-terminal de los péptidos está amidado, sin embargo, en el capítulo descriptivo se indica expresamente que el extremo C-terminal de los péptidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 no está amidado”*.

Para dar respuesta al requerimiento la reivindicación 10 ha sido eliminada del capítulo reivindicatorio, dado que el propósito de la invención consiste en la generación de secuencias de péptidos basados en la toxina Conantoquina G, la cual es un péptido que tiene el extremo C terminal amidado, por lo que se diseñaron secuencias de péptidos

con el extremo C terminal no amidado y en consecuencia la invención presentada ante la SIC se limita a secuencias de péptidos (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3) sin amidar. Lo anterior, se encuentra suficientemente sustentado en el capítulo descriptivo de la solicitud originalmente presentada, en la sección referente al resumen de la invención en el folio 5, párrafo 7, líneas 1-2.

En segundo término, en el Oficio objeto de respuesta se hace referencia a que las *“reivindicaciones 11 y 12 mencionan que los aminoácidos que conforman los péptidos presentan configuración tipo L o configuración tipo D, respectivamente, lo cual no se menciona en el capítulo descriptivo”*.

Para otorgar respuesta al requerimiento, aun cuando se realizó la incorporación al capítulo descriptivo de la materia que especifica el tipo de configuración de los aminoácidos que constituyen la estructura primaria de los péptidos en estudio (párrafo segundo, línea 2, pág 13); las reivindicación 11 se ha modificado, tal y como se constata en el nuevo capítulo reivindicatorio anexo a este oficio en la reivindicación 5 y la reivindicación 12 se ha eliminado de la presente solicitud.

Descripción (Art. 28 y 29 D 486)

Dentro de las observaciones al capítulo descriptivo de la solicitud de patente, se menciona la *falta de suficiencia en la divulgación de la invención, ya que no se especifican las configuraciones tipo “L” o “D” que presentan los aminoácidos que conforman los péptidos, objeto de la invención*.

Tal y como se señaló en forma precedente, aunque la especificación respecto al tipo de configuración de los aminoácidos se excluyó del capítulo reivindicatorio, en aras de otorgar respuesta a la observación realizada al capítulo descriptivo se indicó que los péptidos de la invención solamente presentan la configuración tipo “L”, por lo que se pormenorizó tal explicación en el nuevo capítulo descriptivo anexo a este oficio, dado que en el campo de la biología molecular el hecho de contar con isómeros del tipo D o L, es fundamental en la diferenciación de los efectos biológicos que los péptidos presenten, en el caso que nos ocupa por ser péptidos sintetizados la única configuración que tendrían sería “L”, la cual permite la interacción específica con el receptor NMDA, lo cual produce el efecto biológico de la modulación de calcio al interior de la neurona. Dicho efecto no fuese posible si los péptidos presentaran la configuración tipo “D”.

2. Unidad de invención

El examinador aduce que la solicitud carece de unidad de invención ya que en la materia reivindicada se presentaban dos grupos inventivos diferentes, definidos en el requerimiento de la siguiente manera:

- **Grupo 1: (Reivindicaciones 1 a 6 (total) y 9 a 12 (Parcial))** Un péptido de 17 aminoácidos, caracterizado por tener la secuencia SEQ ID NO: 2 y ser antagonista del receptor NMDA, donde el antagonismo es selectivo hacia la subunidad GluN2B del receptor NMDA. Un péptido caracterizado por tener la secuencia SEQ ID NO: 3 y ser antagonista del receptor NMDA, donde el antagonismo es selectivo hacia la subunidad GluN2B y GluN2A del receptor NMDA.
- **Grupo 2: (Reivindicaciones 7 y 8 (Total) y 9 a 12 (Parcial))** Un péptido caracterizado por tener la secuencia SEQ ID NO: 4 y ser agonista del receptor NMDA.

Para solventar la falta de unidad de invención indicada por el examinador de la SIC, se presenta un nuevo pliego reivindicatorio donde se incluyen las reivindicaciones relacionadas con las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 en las que se reclaman péptidos antagonistas del receptor NMDA.

La materia y reivindicaciones relacionadas con la SEQ ID NO: 4, que corresponde a un péptido agonista del receptor NMDA, será materia de una solicitud divisional.

Con esta modificación, la afectación presentada por el examinador con respecto a la falta de novedad del concepto común inventivo de la solicitud presentada originalmente, queda solventada ya que se contaría con dos tipos de péptidos (moduladores antagonistas y moduladores agonistas del receptor NMDA) con funciones biológicas diferentes y con estructuras primarias diferentes acorde a la prueba de comparación de estructuras realizada, la cual corresponde a un alineamiento múltiple (ver figura 1).

A partir de los resultados obtenidos en la prueba de alineamiento múltiple es posible establecer que los tres péptidos incluidos en la solicitud son diferentes entre sí ya que los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 presentaron un porcentaje de similitud del 88,24%; los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 2 presentaron un porcentaje de similitud del 25,00% y los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 3 presentaron un porcentaje de similitud del 25,00%.

Adicionalmente se observa que la diferencia entre la similitud de los péptidos agonistas y antagonistas es bastante amplia, por lo que no es posible establecer una comparación entre la estructura primaria de los mismos. En atención a lo anterior, se estimó presentar el péptido modulador agonista en una solicitud divisional.

Por otra parte, teniendo en cuenta el estado del arte más cercano a la solicitud y que fue identificado por el examinador como el documento D1 que corresponde al documento patente US5830998, es posible identificar las siguientes ventajas tecnológicas de la solicitud con respecto a las del estado del arte más cercano:

- El efecto presentado en la invención de la solicitud es antagonista reversible debido a que la interacción con el péptido no daña la funcionalidad del receptor, por lo que continúa habiendo un proceso de modulación.
- En la tabla 1 de la columna 26 del documento D1, se presentan las secuencias de los péptidos derivados de la Conantoquina G, clase I y II, siendo estos últimos los más similares a los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 de la solicitud; sin embargo, difieren en la sustitución de Gla (g) por Asp (D), ya que dicha sustitución solamente se presenta en los péptidos de la solicitud y no se encuentra en los compuestos propuestos en la tabla 1 de la anterioridad D1.

3. Examen de Patentabilidad (Art. 14 D486)

Nivel Inventivo (Art. 18 D486)

Según el examen presentado en el oficio No. 6670, *las reivindicaciones 1 a 3 de la presente invención carecen de nivel inventivo toda vez que la SEQ ID NO: 2 tiene un porcentaje de similitud del 70.59% con la SEQ ID NO: 5 presentada en D1 y de acuerdo con D2 los residuos de ácido gamma carboxiglutámico de las posiciones 7, 10 y 14 no son importantes en la unión del péptido al receptor de NMDA.*

En relación a las objeciones sobre la actividad inventiva se manifiesta lo siguiente:

Dentro del cuestionamiento del nivel inventivo de la solicitud el examinador de la SIC presenta el siguiente argumento: “(...) *No se evidencia un efecto técnico asociado al hecho de que el péptido contenga ácido aspártico en las posiciones 3, 4, 7, 10 y 14, puesto que, tanto el péptido de la solicitud como el péptido divulgado en D1 actúan como antagonistas del receptor NMDA a concentraciones altas (Col. 20, líneas 52 a 59) y el péptido divulgado en D1 presenta un valor de IC50 de 8.5 μ M (Col. 27, Tabla II), que es menor al reportado para el péptido de la solicitud (IC50 de 113 μ M)*”.

En relación con lo anterior, los inventores aclaran que el ensayo divulgado en D1 Col. 20, líneas 52 a 59, demuestra que se presenta un efecto antagonista irreversible por el hecho de bloquear el funcionamiento del receptor NMDA, (Col 20, líneas 60 a 63); por el contrario, el efecto presentado en la invención de la solicitud es antagonista reversible debido a que la interacción con el péptido no daña la funcionalidad del receptor, por lo que continúa habiendo un proceso de modulación.

De acuerdo con el ensayo divulgado en D1 en el cual se obtuvo un valor de IC50 de 8,5 μ M, se aclara que las condiciones de éste ensayo difieren del realizado por los inventores principalmente en dos aspectos: *en primer lugar*, los péptidos presentados en la solicitud han sido diseñados de manera racional apoyados en herramientas computacionales y *segundo*, estos péptidos se han evaluado experimentalmente por medio de pruebas que determinan directamente su funcionalidad sobre células de cultivo primario y sobre líneas celulares que expresan el receptor NMDA.

Los dos aspectos anteriormente mencionados son muy relevantes, así el diseño computacional permitió evaluar muchas más posibilidades de las expresadas en D1, obteniendo como resultado que los péptidos propuestos podrían generar una mejor interacción con el receptor. Por su parte, el método experimental para evaluar la funcionalidad de los péptidos presentados en esta invención difiere del presentado en D1, porque en D1 la evaluación es realizada por electrofisiología con un cultivo primario de neuronas hipocampales y se hace la medición de las corrientes evocadas por célula, dándonos una medida directa del comportamiento del receptor generada por los péptidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. Los inventores explican que en este caso, el IC50 determina la cantidad de cada uno de los péptidos que inhibe en un 50% el funcionamiento normal del receptor, es decir que permite el ingreso de la mitad de los iones Ca^{++} respecto a condiciones normales, lo que claramente muestra un resultado real sobre el funcionamiento del receptor y el efecto sobre las células afectadas, por lo tanto, con las medidas electrofisiológicas se evidencia como es afectado el receptor directamente en un sistema *in vitro* como es una neurona derivada de hipocampo. El método presentado por D1 evalúa la interacción con una preparación de membranas y una molécula ([3H]MK-801) marcada con un isótopo (Párrafo 17, líneas 5 a 9), la unión se mide por el desplazamiento que puede generar el péptido; de esta forma el valor presentado de IC50 indica la concentración del péptido que logra desplazar el 50% de las moléculas marcadas de la preparación de membranas donde está el receptor. La marcación lleva a que la técnica de partida tenga una mayor sensibilidad y por lo tanto un menor valor reportado, pero en ningún caso se está midiendo la funcionalidad del receptor, solo una interacción directa proteína vs péptido con una preparación de membranas.

En D1 se evalúa el desplazamiento de una molécula marcada radiactivamente por cada uno de los péptidos y el valor de IC50 hallado indica la concentración del péptido que logra desplazar el 50% de las moléculas marcadas del receptor. Sin embargo, en D1 no se está midiendo el efecto sobre la funcionalidad del receptor. En el caso de la invención, el IC50 determina la cantidad de cada uno de nuestros péptidos que inhibe en un 50% el funcionamiento normal de receptor, es decir permite el ingreso de la mitad de los iones Ca^{+2} respecto a condiciones normales, lo que claramente muestra un resultado real sobre el funcionamiento del receptor y el efecto sobre las células afectadas.

En consecuencia, los dos métodos no son comparables porque no arrojan la misma información ni tampoco permiten alcanzar las mismas conclusiones. Las modificaciones puntuales en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 difieren de tal manera en el efecto que se reporta en el estado del arte, llegando a ser agonistas y antagonistas del receptor NMDA. Las mutaciones puntuales de esta invención producen un efecto reversible que modula el receptor, con una energía de interacción que hace que sean más específicos para alcanzar la modulación. La interacción reversible es una gran ventaja ya que se permite el correcto funcionamiento del receptor, luego de la

Patrimonio
de todos
los colombianos

eliminación de la interacción con los péptidos y de esta forma se eliminan los efectos secundarios que pueden causar la muerte neuronal.

El examen también plantea lo siguiente: *“Sin embargo, el desarrollo de péptidos antagonistas del receptor NMDA alternativos ya se encuentra divulgado el documento D2, que se refiere a variantes de la conantokina G en los cuales se realizan varias sustituciones de los residuos de ácido gamma carboxiglutámico por alanina o por ácido glutámico (Pág. 258, Tabla1) y donde se evidencia que los residuos de ácido gamma carboxiglutámico de las posiciones 7, 10 y 14 no son importantes en la unión del péptido al receptor de NMDA (Pág. 260, col. izq. líneas 10 y 11, col. der., líneas 1 a 4, Pág. 261, Col. izq., líneas 7 a 9)”*.

Según el ensayo divulgado en D2 en el cual los residuos Gla7, Gla10 y Gla14 no mostraron efectos significativos en la inhibición del receptor NMDA, realizando sustituciones por alanina (Pág. 260, col. izq. líneas 10 y 11, col. der., líneas 1 a 4, líneas 1 a 4, Pág. 261, Col. izq., líneas 7 a 9)” o ácido glutámico (pág. 261, párrafo 2, líneas 10 a 13), no es motivo para desvirtuar que una sustitución conservativa por ácido aspártico en las posiciones 7, 10 y 14 no presenten efecto alguno. En las proteínas se constatan modificaciones conservativas y esto lleva también a que su función cambie; además, esto genera lo que en bioquímica llamamos la diversidad funcional.

Por otra parte, solo unos pocos residuos van a interactuar con el receptor NMDA y esta interacción se da por la estructura que tiene el péptido a un nivel tridimensional, es decir la secuencia completa que adquiere un plegamiento que es funcional. El péptido SEQ ID NO: 2 une la subunidad GluN2B formando 7 puentes de hidrógeno con aminoácidos (His 486, Ser 690, Asp 732, Tyr 762) del receptor y para ello la contribución es hecha por los residuos de Asp de las posiciones 4 y 7; no necesariamente tienen que ser los de las posiciones 10 y 14.

Así, en esta invención los resultados experimentales soportan fuertemente dicha interacción, porque el péptido SEQ ID NO: 2 mostró un alta selectividad por GluN2B a diferencia de SEQ ID NO: 3. En la invención se presenta que las secuencias propuestas permiten discriminar las subunidades del receptor por unas modificaciones puntuales. Lo anterior, indica que no necesariamente son los residuos de las posiciones 7, 10 y 14 son los que causan la inhibición. Con respecto al péptido SEQ ID NO: 3, las interacciones involucran 9 puentes de hidrógeno, donde el residuo de ácido aspártico en la posición 4 es vital para establecer tres puentes de hidrógeno con aminoácidos del receptor NMDA; esto indica que no tienen que ser los residuos de las posiciones 7, 10 y 14 los que inhiben la actividad del receptor. En la secuencia del péptido SEQ ID NO: 3 hay un residuo de tirosina que contribuye al establecimiento de interacciones hidrofóbicas con aminoácidos hidrofóbicos del receptor. Las diferencias en secuencia de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 cambian las conformaciones de los péptidos y esto genera que las cadenas laterales de los aminoácidos interactúen en una mayor o menor extensión con los

Patrimonio
de todos
los colombianos

aminoácidos del receptor, generando la selectividad que se presenta en esta invención y por lo tanto, el efecto de modulación.

Otro de los argumentos del examinador corresponde a la siguiente afirmación: *“Adicionalmente, se evidencia que los péptidos que comprenden sustituciones de ácido gamma carboxiglutámico por ácido glutámico carecen de la capacidad de formar estructuras de alfa hélice, puesto que tales residuos corresponden a sitios de unión de iones (Ca^{2+} y Mg^{2+}), aunque la presencia de dichos sitios de unión no es un requisito para la neuroactividad de las conantokinas (Pág. 262, col. izq., líneas 12 a 25)”*

En relación con la afirmación anterior, los inventores aclaran que no necesariamente para que un péptido sea funcional debe tener una estructura 100 % helicoidal, lo que está soportado por la evidencia experimental. La Conantoquina G tiene un 70% de plegamiento α -hélice e inhibe en forma irreversible el receptor generando efectos secundarios. Los péptidos de esta invención, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, adoptan una conformación del α -hélice en el 50% de su secuencia por modelamiento y son funcionales como se presenta en esta invención, evaluado las corrientes evocadas del receptor NMDA en neuronas hipocámpales. Las conformaciones de los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 llevan a un incremento en su flexibilidad y por lo tanto contribuyen a la reversibilidad observada y al efecto modulador presentado en esta invención.

Por último, el examinador de la SIC afirma que: *“(…) las sustituciones de ácido glutámico por aspártico corresponden a sustituciones conservativas, por tratarse ambos de residuos ácidos, lo cual se encuentra dentro del quehacer de la persona normalmente versada en la materia”*.

Al respecto los inventores aclaran que los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 han sido diseñados de manera racional con apoyo en herramientas computacionales y los resultados de esta invención tienen un fuerte soporte experimental. Así, el diseño racional permite evaluar *in silico* las interacciones que se dan entre los péptidos y el receptor generando, lo que se llama una energía libre de unión por cada interacción péptido vs receptor; sin embargo dado que el sistema busca el favorecimiento de complejos energéticamente estables se libera más energía de la que se consume, de modo que se esperan resultados de energía libre de unión negativos expresados en kcal/mol, y en el caso de Autodock Vina, estos resultados de energía de unión también corresponden a una medida indirecta de la afinidad del ligando por el receptor.

De tal forma, los péptidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 presentados en esta invención, se soportan en un diseñado estudio bioinformático y posteriormente se han evaluado experimentalmente por medio de pruebas que determinan directamente su funcionalidad sobre células de cultivo primario y sobre líneas celulares que expresan el receptor NMDA. De nuevo se hace énfasis en la relevancia de estos dos aspectos, ya

Patrimonio
de todos
los colombianos

que el primero permitió evaluar computacionalmente muchas más posibilidades de las expresadas en los documentos referenciados como D1 y D2, obteniendo como resultado que los péptidos propuestos podrían generar una mejor interacción con el receptor; para el segundo aspecto que corresponde a las pruebas funcionales, se tiene que los ensayos electrofisiológicos que soportan los resultados obtenidos no han sido usados en los documentos referidos como D1 y D2, lo que hace que seguramente los resultados deban interpretarse de una manera diferente.

En el caso del documento D2, se evalúa el desplazamiento de una molécula ([3H] MK-801) (pág. 259, párrafo 3, líneas 5 a 7) que tiene un isótopo (H3) por cada uno de los péptidos y el valor de IC50 hallado indica la concentración del péptido que logra desplazar el 50% de las moléculas marcadas del receptor, sin embargo, no está midiendo el efecto sobre la funcionalidad del receptor. En esta invención, el IC50 determina la cantidad de cada uno de los péptidos SEQ ID No 2 y SEQ ID No 3 y SEQ ID No 4 que inhibe en un 50% el funcionamiento normal del receptor, es decir, permite el ingreso de la mitad de los iones Ca++ respecto a condiciones normales, lo que claramente muestra un resultado real sobre el funcionamiento del receptor y el efecto sobre las células afectadas.

De acuerdo con lo anterior, las sustituciones conservativas no hacen parte del quehacer de la persona normalmente versada en la materia, ya que la invención que se presenta tiene dos componentes muy fuertes: el diseño y la experimentación y, para llegar a ello, se realizan muchas mutaciones puntuales que dan lugar a un gran conjunto de péptidos. Por otra parte, en la naturaleza hay muchas proteínas que presentan sustituciones conservativas y esto genera lo que se llama la diversidad funcional y por eso hay muchas clases de proteínas globulares con diferentes funciones.

Los inventores expresan que el péptido SEQ ID NO: 4 no tiene ninguna coincidencia como se observa en el estado del arte más cercano.

Por lo anterior y con las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio y en el capítulo descriptivo, se puede decir que el problema técnico que resuelve la presente invención no podría ser resuelto de manera obvia por un técnico medio en la materia, toda vez que ningún documento del estado del arte enseña la combinación de diseño y experimentación con los péptidos relacionados. Adicionalmente, la similitud de 70.59% en un péptido de 17 aminoácidos no le resta *per se* nivel inventivo a las secuencias presentadas. Por tal motivo, el objeto reclamado en la presente invención cumple con lo establecido en el artículo 18 de la Decisión 486.

Agradezco de antemano la atención prestada y la atenta colaboración en las gestiones requeridas.

**Universidad
Nacional
de Colombia**

Cordialmente,



LAURA MARCELA MANZANO JIMÉNEZ

C.C. 1.091.666.812 de Ocaña, Norte de Santander

T.P. No. 248.536 del C.S.J

Universidad Nacional de Colombia

Anexos:

1. Capítulo reivindicatorio modificado
2. Capítulo descriptivo modificado
3. Dibujos

PÉPTIDOS SINTÉTICOS MODULADORES ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NMDA

Campo de la Invención.

La presente invención provee una serie de péptidos moduladores de la actividad del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Específicamente hace referencia a dos péptidos sintéticos antagonistas del influjo iónico a través del receptor NMDA con especificidad hacia las subunidades GluN2B y GluN2A del receptor NMDA en cultivos de neuronas hipocámpales de rata.

Estado del Arte de la invención.

El receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) constituye el principal subtipo de receptores de glutamato y normalmente participa en la transmisión sináptica excitatoria rápida. Estos receptores se expresan ampliamente, y han sido implicados en procesos fisiológicos tales como el desarrollo neuronal, plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje y numerosas condiciones patológicas (Citri y Malenka., 2008). También se ha involucrado al NMDAR, en procesos como el daño isquémico (Hardingham y Bading., 2010), dolor crónico, psicosis, y los principales trastornos degenerativos como el Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Mony *et al.*, 2009a; Traynelis *et al.*, 2010).

Los receptores NMDA se presentan como conjuntos de tetrámeros de dos subunidades GluN1 de unión de glicina y dos subunidades de unión a glutamato, de los cuales hay cuatro tipos (GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D). Ambos tipos de subunidades GluN2A y GluN2B son consideradas como las principales para el funcionamiento de los receptores NMDA en las neuronas del sistema nervioso central (SNC) (Madden, 2002).

La subunidad GluN2 controla una amplia gama de propiedades funcionales de los receptores NMDA, y se expresa diferencialmente en todo el Sistema Nervioso Central (SNC) (Akazawa *et al.*, 1994; Monyer *et al.*, 1994). Cada subunidad del receptor NMDA está compuesta de cuatro dominios, que incluyen el dominio extracelular amino-terminal (ATD), el dominio de unión a ligando extracelular (LBD), el dominio transmembrana (TMD) y el dominio carboxilo-terminal intracelular (CTD) (Sobolevsky *et al.*, 2009).

La activación de los receptores NMDA requiere dos eventos coincidentes: 1) La unión de glutamato y glicina, y 2) la despolarización simultánea de la membrana, que elimina el bloqueo por parte del Mg^{2+} a nivel del poro del canal, dando lugar al influjo de Ca^{2+} . En condiciones fisiológicas, la entrada de Ca^{2+} produce una inhibición parcial de los receptores NMDA a través de una inactivación calcio dependiente, impidiendo así una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular (Krupp *et al.*, 1999). Bajo condiciones patológicas, sin embargo, esa regulación de los receptores NMDA está desactivada, lo que resulta en exceso del influjo de Ca^{2+} a través del receptor NMDA, desencadenando múltiples procesos catabólicos intracelulares, y por lo tanto induciendo muerte neuronal (Lipton., 2006).

Dado el complejo funcionamiento del receptor NMDA en la transmisión sináptica, procesos de memoria y aprendizaje y que está altamente implicado en procesos

patológicos como el daño isquémico, la farmacología en relación a la regulación del receptor se ha centrado en probar antagonistas dirigidos al sitio de unión de glutamato, al sitio de unión de la glicina, al canal y a sitios de regulación alostérica del receptor, todos como agentes neuroprotectores en múltiples ensayos preclínicos, sin embargo estos acercamientos han fallado (Green, 2002; Parsons *et al.*, 2002; Lo *et al.*, 2003; Hoyte *et al.*, 2004; Small y Tauskela, 2005; Wang y Shuaib, 2005; Muir, 2006). En el caso de agentes bloqueadores del canal (aptiganel, Cerestat; CNS 1102), y del sitio de unión a glutamato, los niveles de antagonismo necesarios para generar neuroprotección, afectan la función cardiovascular y alteran la cognición (efectos psicóticos) (Small y Tauskela, 2005; Muir, 2006). Gavestinel (GV150526), dirigido al sitio de unión a glicina, también falló en la neuroprotección deseada (Sacco *et al.*, 2001). Un antagonista selectivo de la subunidad GluN2B CP-101,606 es aparentemente insuficiente para protección del daño isquémico severo (Yurkewicz *et al.*, 2005). En otro tipo de patologías como Alzheimer y Parkinson el agente Memantina ha presentado resultados prometedores dada su baja afinidad y rápida cinética de disociación, características que no presentan los antagonistas clásicos (Kotermanski y Johnson, 2009).

Otro tipo de antagonistas derivados de venenos naturales han sido probados contra el receptor NMDA. Una clase de estos venenos son las Conotoxinas, que son pequeños péptidos producidos por invertebrados marinos del género *Conus*. Estas conotoxinas representan compuestos de naturaleza proteica rígidos y ricos en el aminoácido cisteína (4-6 residuos) en posiciones muy bien definidas, y sintetizados gracias a un complejo mecanismo que permite su gran variabilidad y eficiencia en la parálisis de sus presas, garantizando así el éxito evolutivo de esta especie (Olivera., 1997). Se ha determinado que las conotoxinas se caracterizan por una enorme especificidad, uniéndose a receptores bien definidos de células musculares o nerviosas, donde actúan como antagonistas de los canales iónicos, bloqueando su funcionalidad.

Un tipo de conotoxinas, las Conantoquinas, corresponden a pequeños péptidos (17-27 aminoácidos), pobres en puentes disulfuro a diferencia de las demás conotoxinas, se encuentran en venenos de *Conus geographus*, y presentan una alta afinidad para bloquear el receptor NMDA, con potencial efecto anticonvulsionante y antinociceptivo (Layer *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2008).

Dentro de este grupo se encuentra la Conantoquina-G (CGX-1007) o Con-G, un péptido de 17 aminoácidos (GEyyLQyNQyLIRyKSN-NH₂ (SEQ ID NO: 1)) que se caracteriza por la presencia de cinco residuos del aminoácido modificado ácido gama carboxiglutámico (γ-carboxiglutámico ó Gla), esta toxina presenta antagonismo competitivo y no competitivo por las subunidades del receptor NMDA (Prorok y Castellino, 2007). Los residuos γ-carboxiglutámico permiten la coordinación de iones divalentes (Ca²⁺, principalmente) lo que le confiere forma α-hélice a la Conantoquina-G (Myers *et al.*, 1990).

Varios acercamientos con péptidos análogos de la conantoquina-G, en los que se ha reemplazado parcial y totalmente los residuos γ-carboxiglutámico por alanina y especialmente por glutamato (Lin *et al.*, 1999; Chandler *et al.*, 1993), han permitido

determinar que la actividad antagonista de la conantoquina-G contra los receptores NMDA depende fuertemente de los residuos del amino-terminal, donde los residuos γ -carboxiglutámico tienen un papel estructural y funcional, especialmente los residuos Glu3 y Glu4 (Blandl *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1996; Warder *et al.*, 1998).

Junto con los residuos γ -carboxiglutámico, se ha descrito también que la leucina 5 (Leu 5) de la cononatoquina-G parece ser el determinante molecular que permite que esta toxina presente especificidad con el dominio de unión al ligando (LBD) (residuo Met 739 ubicado en el dominio D2 del LBD) de la subunidad GluN2B del receptor NMDA, generando alta selectividad y antagonismo competitivo por esta subunidad (Donevan y McCabe., 2000; Sheng *et al.*, 2010).

El papel de la conantoquina-G como antagonista sobre los receptores NMDA se ha evaluado en diferentes escenarios, así mismo se ha solicitado numerosas patentes en relación al uso de la conantoquina-G sobre el receptor NMDA. Por ejemplo, la patente CA 2288346 A1 (Saydoff *et al.*, 1998) describe un método en el que el uso de la conantoquina-G (SEQ ID NO: 1) produce analgesia y neuroprotección cuando se administra en mamíferos. Por su parte, la patente US5830998A (Maccecchini, 1998) describe una serie de péptidos a partir de modificaciones en el N y C terminal de la conantoquina-G (SEQ ID NO: 1), además de péptidos con sustituciones internas reemplazando los residuos γ -carboxiglutámico por glutamato y su uso como moduladores alostéricos del receptor NMDA en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central SNC. La patente US6110894A (Maccecchini, 2000) hace uso de los mismos derivados de conantoquina-G descritos anteriormente para tratar la excitotoxicidad producida por la sobre estimulación del receptor NMDA durante eventos de epilepsia. Más recientemente, en la solicitud de patente, CN102167729A (Renzhan-Hong *et al.*, 2011) describen el análogo de conantoquina-G (Glu-por-G) donde se ha reemplazando los residuos γ -carboxiglutámico de la conantoquina-G por glutamato, dicho análogo, presenta un efecto sobre la dependencia psicológica y dependencia física de la morfina; y en comparación con la morfina, el análogo tiene un efecto analgésico más fuerte.

Se ha encontrado que la conantoquina-G tiene efectos neuroprotectores en un evento isquémico y en apoptosis inducida por estaurosporina (Williams *et al.*, 2002). Sin embargo el efecto neuroprotector de la conantoquina-G en un contexto excitotóxico y en particular en la isquemia no ha sido bien establecido. Un estudio en cultivos organotípicos de hipocampo y en células HEK293 donde se expresaron diferentes combinaciones de las subunidades del receptor NMDA (Alex *et al.*, 2011), mostró un efecto neuroprotector de la conantoquina-G en un ambiente excitotóxico. En este estudio la conantoquina presentó un efecto como bloqueador efectivo de las subunidades GluN2B y GluN2A, lo que sugiere que la conantoquina-G es una potente molécula con efecto neuroprotector ante un ambiente excitotóxico y este efecto es mediado a nivel de diferentes subunidades del receptor NMDA, en contraposición a los estudios descritos previamente acerca de la selectividad de la conantoquina-G hacia la subunidad GluN2B.

Datos más recientes han mostrado que la Conantokina-G promueve la neuroprotección relacionada con la integridad neuronal y los cambios en la localización celular de subunidades del receptor NMDA en un modelo de isquemia in vivo (Balsara *et al.*, 2015).

Ahora bien, mientras los modelos pre-clínicos utilizando la Conantokina-G como antagonista del receptor NMDA para tratar el accidente cerebrovascular han tenido éxito, el uso farmacológico no ha sido el esperado (Balsara *et al.*, 2012). En el caso del tratamiento de convulsiones y epilepsia (Barton *et al.*, 2004), la Conantokina-G fue probada con el nombre de CGX-1007 por Cognetix Inc, inicialmente los resultados fueron promisorios en la fase I, sin embargo falló en la fase II de las pruebas clínicas (<http://www.uniprot.org/uniprot/P07231>, 2014).

Debido que a la fecha no hay un tratamiento farmacológico eficaz para regular los procesos involucrados en las patologías dependientes del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA), se hace necesario la búsqueda de nuevos fármacos o farmacoterapia dirigida hacia los diferentes sitios moduladores del receptor NMDA.

Breve Descripción de la invención

La presente invención está relacionada en el campo de los péptidos moduladores de la actividad del receptor NMDA. Específicamente hace referencia a dos péptidos sintéticos antagonistas derivados de la secuencia de la Conantoquina-G.

El primer péptido sintético que se presenta en esta invención tiene la siguiente secuencia GEDDLQDNQDLIRDKSN (SEQ ID NO: 2, presentado en la lista de secuencias), correspondiendo en código de tres letras a la secuencia Gly-Glu-Asp-Asp-Leu-Gln-Asp-Asn-Gln-Asp-Leu-Ile-Arg-Asp-Lys-Ser-Asn ordenado desde el N-terminal al C-terminal. El péptido tiene un peso molecular de 1975.03 g/Mol, es principalmente de naturaleza hidrofílica y de carácter ácido.

El segundo péptido sintético que se presenta en esta invención tiene como secuencia GEDDYQDAQDLIRDKSN (SEQ ID NO: 3, presentado en la lista de secuencias), correspondiendo en código de tres letras a la secuencia Gly-Glu-Asp-Asp-Tyr-Gln-Asp-Ala-Gln-Asp-Leu-Ile-Arg-Asp-Lys-Ser-Asn ordenado desde el N-terminal al C-terminal. El péptido tiene un peso molecular de 1981.99 g/Mol, es principalmente de naturaleza hidrofílica y de carácter ácido.

En esta invención para el péptido que se presenta como SEQ ID NO: 2, se ha reemplazado los cinco residuos del aminoácido modificado γ -carboxiglutámico presentes en la Conantoquina-G (posiciones 3, 4, 7, 10 y 14) por el aminoácido aspartato (Asp) de forma que toda la secuencia SEQ ID NO: 2 contiene aminoácidos estándar. Para el péptido que se presenta como SEQ ID NO: 3, tiene las mismas modificaciones descritas en SEQ ID NO: 2, y adicionalmente se ha sustituido la Leu 5 por Tyr, y Asn 8 por Ala. Así mismo, los residuos C-terminal de cada uno de los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, no están amidados como en la conantoquina-G.

Para determinar el efecto que pudiera tener estos nuevos péptidos tanto SEQ ID NO: 2 como SEQ ID NO: 3, sobre la actividad del receptor NMDA, se realizó una evaluación electrofisiológica para analizar los cambios de corrientes evocadas por el agonista NMDA

y el coagonista Glicina en el receptor NMDA, en ausencia y presencia de los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, cada uno por separado.

La actividad de los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 sobre corrientes evocadas del receptor NMDA fue evaluada mediante la técnica electrofisiológica "Patch Clamp" (Hamill *et al.*, 1981) y en configuración de célula completa (Whole Cell), fijando el voltaje a -70 mV (Voltage Clamp) en un cultivo primario de neuronas hipocampales de embriones E18 de rata Sprague Dawley. Se evaluaron corrientes evocadas del receptor NMDA por aplicación de 100 μ M de NMDA y 10 μ M Glicina, en ausencia y presencia de los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 a concentraciones de 10, 100 y 500 μ M.

El péptido presentado en la secuencia (SEQ ID NO: 2) mostró una reducción de la actividad a nivel de influjo iónico del receptor NMDA de forma dependiente de concentración en cultivos de neuronas hipocampales, así mismo, el efecto del péptido (SEQ ID NO: 2) no alteró la recuperación de la actividad del receptor por nuevas aplicaciones de NMDA/Glicina, estos datos indican un efecto antagonista del péptido (SEQ ID NO: 2) sobre el receptor NMDA. Para determinar la selectividad del péptido (SEQ ID NO: 2) hacia los principales subtipos de subunidades GluN2 del receptor NMDA, se expresó en células HEK293 las subunidades recombinantes del receptor NMDA, GluN1-a/GluN2A y GluN1-a/GluN2B independientemente y se evaluó el efecto de la corriente de entrada de la misma forma que se ha descrito para las neuronas. El péptido (SEQ ID NO: 2) presentó selectividad hacia el complejo GluN1-a/GluN2B sobre GluN1-a/GluN2A, indicando que el péptido de esta invención es selectivo y genera antagonismo hacia la subunidad GluN2B del receptor NMDA, de forma análoga al antagonismo conocido por la Conantoquina-G.

En cuanto al péptido presentado como SEQ ID NO: 3, mostró un antagonismo pero con menor potencia hacia el receptor NMDA de forma dependiente de concentración en cultivos de neuronas hipocampales que el péptido SEQ ID NO: 2. En relación a la selectividad del péptido SEQ ID NO: 3 hacia las subunidades recombinantes del receptor NMDA, se encontró que éste péptido genera antagonismo hacia ambos tipos de subunidades GluN2A y GluN2B, indicando que la Leu 5 y Asn 8, son residuos importantes para discriminar entre subunidades.

Debido a la baja afinidad de los péptidos GEDDLQDNQDLIRDKSN (SEQ ID NO: 2, IC_{50} 201.5 μ M) y GEDDYQDAQDLIRDKSN (SEQ ID NO: 3, IC_{50} 156.3 μ M) en cultivos neuronales, para generar antagonismo del receptor NMDA, comparado con los reportes de afinidad de los antagonistas clásicos del receptor NMDA (Ogden y Traynelis., 2011), incluido la Conantoquina-G (IC_{50} 0.1 μ M, Teichert *et al.*, 2007), los péptidos (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3) pueden representar un interesante potencial farmacológico debido a una alta disociación del receptor NMDA, y evitar los efectos adversos presentados por los antagonistas clásicos del receptor NMDA.

Descripción de las figuras

Figura 1. Corrientes evocadas del receptor NMDA. (A) Corrientes de entrada (*Whole cell*) debido a la aplicación de 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina. Las corrientes de izquierda a derecha fueron obtenidas de la misma neurona. El último gráfico de corriente corresponde al solapamiento (*Merge*) entre la primera estimulación (negro) y la última (gris). Se observa que la magnitud de la corriente se mantiene a medida que se realizan estimulaciones y no se ven cambios significativos en la cinética de desactivación de cada corriente. (B) Inhibición de corrientes evocadas del receptor NMDA usando el antagonista (+)-MK801 en neuronas hipocampales. Los registros de corrientes inducidos por la aplicación de 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina fueron significativamente bloqueados debido a la ocupación y permanencia a nivel del poro del canal por parte de (+)-MK801, indicando que efectivamente las corrientes obtenidas son vía receptor NMDA. (C) Inhibición de las respuestas del receptor NMDA con presencia de la subunidad GluN2B usando 1 μ M de Ro 25-968 durante 10 segundos. Las respuestas fueron evocadas usando 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina durante 5 segundos. 7 neuronas fueron evaluadas. DIV 7-14.

Figura 2. Los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 tienen efecto antagonista sobre corrientes evocadas del receptor NMDA en neuronas hipocampales. Efecto de 10, 100 y 500 μ M del péptido SEQ ID NO: 2 (A) y del péptido SEQ ID NO: 3 (B). Las corrientes evocadas (*whole cell*) del receptor NMDA se obtuvieron con aplicaciones de 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina, se realizaron dos aplicaciones iniciales (1-2, en el eje de las abscisas) de agonista, seguido de cuatro aplicaciones (3-6) del péptido y finalmente dos aplicaciones de NMDA (7-8, recuperación) para evaluar la recuperación después del bloqueo, cada aplicación se realizó después de 4 minutos. Las corrientes fueron normalizadas respecto a la mayor amplitud con 100 μ M NMDA y se tomó como corriente máxima. El control corresponde a aplicaciones de 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina. Entre 6-11 neuronas fueron evaluadas por concentración. C (péptido SEQ ID NO: 2) y D (péptido SEQ ID NO: 3), corresponde al análisis estadístico de los resultados obtenidos en A y B. Hubo diferencias significativas para ambos péptidos en la inhibición de la corriente cuando se usó 100 y 500 μ M. Solo se observó diferencias significativas en la recuperación en la aplicación de 500 μ M en ambos péptidos.

Figura 3. Efecto de los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 sobre corrientes evocadas del receptor NMDA en neuronas hipocampales. (A) 10 μ M de péptido SEQ ID NO: 2. (B) 100 μ M de péptido SEQ ID NO: 2. (C) 500 μ M de péptido SEQ ID NO: 2. En todos los casos se aplicó 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina. Después de cada aplicación del péptido se realizó lavado por perfusión (*washout*) para remover los remanentes de péptido y agonistas y se realizó de nuevo estimulación con NMDA/Glicina. Los trazos en rojo corresponden al bloqueo por el péptido SEQ ID NO: 2. La imagen al final de cada panel corresponde al solapamiento (*Merge*) de las corrientes. (D) Curva dosis-respuesta del péptido SEQ ID NO: 2 sobre las corrientes evocadas del receptor NMDA. (E) 10 μ M de péptido SEQ ID NO: 3. (F) 100 μ M de péptido SEQ ID NO: 3. (G) 500 μ M de SEQ ID NO: 3. (H) Curva dosis-respuesta del péptido SEQ ID NO: 3 sobre las corrientes evocadas del receptor NMDA. Los trazos en verde corresponden al bloqueo por el péptido SEQ ID NO: 3. Para este último péptido se muestran corrientes de células

mantenidas con suero fetal bovino al 2%. 6-11 células fueron evaluadas por cada concentración. Los péptidos fueron evaluados independientemente.

Figura 4. El péptido SEQ ID NO: 2 es selectivo hacia la subunidad GluN2B del receptor NMDA. Inhibición de las corrientes evocadas por 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina en células HEK293 expresando las subunidades NR1a/NR2B (A) y NR1a/NR2A (B) aplicando 500 μ M del péptido SEQ ID NO: 2. Los trazos rojos representan el bloqueo producido por el péptido. Los registros electrofisiológicos se realizaron 24 horas después de la transfección. 3-4 células se evaluaron en cada caso.

Figura 5. Selectividad del péptido SEQ ID NO: 3 hacia subunidades recombinantes del receptor NMDA. Inhibición de las corrientes evocadas por 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina en células HEK293 expresando las subunidades NR1a/NR2B (A) y NR1a/NR2A (B) aplicando 500 μ M del péptido SEQ ID NO: 3. Los trazos verdes representan el bloqueo producido por el péptido. Los registros electrofisiológicos se realizaron 24 horas después de la transfección. 3-4 células se evaluaron en cada caso.

Descripción Detallada de la Invención

Para evaluar el efecto que pudieran tener los péptidos sintéticos presentados en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, sobre la actividad del receptor NMDA, en cultivos de neuronas hipocampales (DIV7-14), se realizó una evaluación electrofisiológica de las corrientes de entrada macroscópicas (corrientes evocadas) del receptor NMDA. Para aislar las corrientes del receptor NMDA se aplicó un tratamiento farmacológico para bloquear la actividad de los receptores AMPA y Kainato, los receptores GABAA, canales de glicina y canales de sodio dependientes de voltaje, como se explica en el apartado de metodología.

Las corrientes evocadas del receptor NMDA se consiguieron mediante la aplicación de 100 μ M de NMDA (Sigma) y 10 μ M de Glicina (Sigma) durante 5 segundos, luego se realizó lavado de los agonistas mediante perfusión con la solución de baño. Dada la desensibilización de corrientes macroscópicas que ocurre en este tipo de canales (Nahum-Levy *et al.*, 2001) se realizaron estimulaciones sucesivas en intervalos de 4 minutos, tiempo necesario para permitir la recuperación de la actividad del canal, lo que permitió registrar corrientes de entrada estables a un potencial fijo de -60 mV que fueron tomadas como control (Figura 1A).

Para comprobar que las respuestas obtenidas eran producto de la estimulación del receptor NMDA, se usó el antagonista selectivo y no competitivo del receptor NMDA, (+)-MK-801 (Dizocilpina, Tocris), éste actúa uniéndose a nivel del poro del canal lo que previene el influjo de Ca^{2+} (Wong *et al.*, 1986). La aplicación de 10 μ M de (+)-MK-801 provocó una disminución de más del 50% de la respuesta obtenida por la estimulación de 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina (Figura 1B). Una segunda aplicación de (+)-MK-801 generó un bloqueo casi total de la respuesta, que en la mayoría de los casos no se

observó recuperación de la corriente después del lavado. Estos resultados indican la presencia de corrientes del receptor NMDA.

Debido a que los péptidos presentados en esta invención corresponden a análogos de Conantoquina-G, y el blanco molecular de ésta es la subunidad GluN2B del receptor NMDA, fue necesario determinar electrofisiológicamente la presencia de la subunidad GluN2B a diferentes días *in vitro*, para esto se usó el compuesto Ro 25-9681, el cual es un bloqueador altamente selectivo dependiente de actividad hacia esa subunidad (Fischer *et al.*, 1997). Sin embargo para conseguir un bloqueo menor al 50% de la respuesta evocada usando 100 μ M de NMDA y 10 μ M de Glicina fue necesario hacer estímulos consecutivos usando 1 μ M de Ro 25-9681 (Figura 1C). El compuesto Ro 25-9681 presenta bloqueo dependiente de actividad y no permite recuperación de la actividad del receptor después del bloqueo. Estas respuestas fueron evaluadas entre DIV 7-14 encontrándose un bloqueo significativo de las respuestas evocadas indicando que hay presencia de la subunidad GluN2B en cultivos *in vitro* tanto jóvenes como maduros (Waxman y Lynch., 2005).

Teniendo en mente que hay presencia de la subunidad GluN2B en las neuronas en los días *in vitro* mencionados se inició a evaluar los péptidos diseñados. Los cambios en la magnitud de las corrientes evocadas por el agonista NMDA y el coagonista Glicina en presencia de los péptidos, indicarían un efecto de los péptidos evaluados.

- Evaluación electrofisiológica de los péptidos.

Para evaluar funcionalmente los péptidos de esta invención mediante Patch Clamp (whole cell), se realizó estimulación de las neuronas con NMDA y Glicina para obtener corrientes de entrada como se mostró en un apartado anterior, seguido de la aplicación de los péptidos a diferentes concentraciones. Se realizaron dos aplicaciones con NMDA/Glicina, y luego cuatro aplicaciones con el péptido en intervalos de 4 minutos y posteriormente otras dos aplicaciones con NMDA/Glicina para ver la recuperación. Los péptidos fueron evaluados por separado.

El péptido SEQ ID NO: 2 es un péptido de 17 aminoácidos principalmente hidrofílico y de carácter ácido. Los stocks del péptido fueron preparados en solución acuosa. El péptido fue adicionado a la solución extracelular o solución de baño usando las mismas condiciones de perfusión que se realizó para las aplicaciones de NMDA. Se probaron diferentes dosis del péptido 10, 100 y 500 μ M y para evaluar si era dependiente de actividad del receptor NMDA, se ajustaron también dosis de 50 y 100 μ M de NMDA.

A una dosis de 10 μ M de péptido SEQ ID NO: 2 no se observó una disminución significativa de la corriente debida a estímulos por 50 μ M de NMDA y en algunos casos los resultados indican que presenta una potenciación de la respuesta algo parecido como sucede con el compuesto Ro 25-9681 a muy bajas dosis (Fischer *et al.*, 1997).

Al aumentar la concentración de NMDA a 100 μ M para ver si había algún cambio en el efecto del péptido SEQ ID NO: 2 a una concentración de 10 μ M, se encontró una

reducción en la corriente cerca del $11 \pm 0.81\%$ ($n=10$). En algunos registros la inhibición fue cerca del 40%, indicando que el péptido SEQ ID NO: 2 podría estar actuando de forma dependiente de la actividad del receptor NMDA. También se observó que en los registros dónde hubo bloqueo del 40%, al parecer el péptido SEQ ID NO: 2 a una concentración de 10 μM no está alterando significativamente la recuperación del receptor después del lavado. Teniendo en cuenta que al usar 100 μM de NMDA hubo bloqueo usando el péptido SEQ ID NO: 2, todas las demás estimulaciones se realizaron usando 100 μM de NMDA.

Cuando se aumentó la dosis del péptido SEQ ID NO: 2 de 10 μM a 100 y 500 μM se observó una reducción en la corriente del receptor NMDA (Figura 2A), de $34.75 \pm 3.77\%$ ($n=7$) y $60.75 \pm 3.42\%$ ($n=11$) respectivamente, tanto en aplicaciones seguidas de lavado y nueva estimulación por NMDA como por aplicaciones sucesivas del péptido, siguiendo la dinámica que se usó con el bloqueador para la subunidad GluN2B. De la figura 2A, se ha seleccionado la aplicación de péptido número 5 (recuadro rojo), que corresponde en su mayoría al máximo bloqueo de la corriente en cada concentración, para mostrar los registros de corriente de la figura 3. Para 500 μM de péptido SEQ ID NO: 2 se observa un cambio en la cinética de cierre del receptor (figura 3C) respecto a las concentraciones más bajas, al parecer hay competencia entre el agonista NMDA y el péptido, esto podría indicar que el péptido SEQ ID NO: 2 podría corresponder a un antagonista competitivo.

Tomando juntos estos datos se puede decir que al aumentar la concentración del péptido SEQ ID NO: 2 se está logrando inhibición de la corriente del receptor NMDA, y que esa inhibición es dependiente de concentración, sin embargo y de acuerdo a los valores de la curva de dosis-respuesta (figura 3D) IC_{50} 201.5 μM , se puede decir que la afinidad del péptido SEQ ID NO: 2 no es alta por la subunidad GluN2B comparado con los antagonistas selectivos para esa subunidad en cultivos de neuronas (Conantoquina-G IC_{50} 0.5 μM , Klein *et al.*, 1999) y en cultivos expresando la subunidad GluN2B recombinante (Ro25-6981 IC_{50} 0.0090 μM , Fischer *et al.*, 1997) y (Conantoquina-G, IC_{50} 0.1 μM , Teichert *et al.*, 2007). Indicando que los residuos γ -carboxiglutámico son importantes para la potencia del bloqueo, pero no necesarios, dado que el péptido SEQ ID NO: 2 al carecer de esos residuos, tiene efecto como agente inhibitorio de la actividad del receptor NMDA en neuronas hipocámpales y algo también importante que se observa en la mayoría de las aplicaciones del péptido SEQ ID NO: 2 es que al parecer no está alterando la recuperación del receptor después del lavado (figura 3), algo que sucede con la mayoría de agentes bloqueadores contra esta subunidad, y que por tal razón no han tenido el éxito farmacológico en el tratamiento de las enfermedades asociadas al funcionamiento del receptor NMDA (Odgen y Traynelis., 2011).

Para el otro péptido SEQ ID NO: 3 propuesto en esta invención, se usó la misma metodología que para el péptido SEQ ID NO: 2 y se evaluaron las mismas concentraciones 10, 100 y 500 μM (figura 2B). Este péptido SEQ ID NO: 3 que presenta dos mutaciones en su contenido aminoacídico respecto al péptido SEQ ID NO: 2, este péptido a una concentración de 500 μM generó una inhibición de las corrientes evocadas de $66.5 \pm 2.10\%$ ($n=6$), del $40 \pm 2.73\%$ ($n=8$) a una concentración de 100 μM y a la más

baja concentración probada (10 μM) el bloqueo o inhibición de la corriente es de $14 \pm 1.35\%$ ($n=7$) (figura 3, E, F y G, respectivamente). Al igual que para el péptido SEQ ID NO: 2, este péptido SEQ ID NO: 3 presenta mayor grado de recuperación después de la estimulación a alta concentración (figura 2B). Como se puede apreciar en la figura 3H, un estimado del IC_{50} para este péptido SEQ ID NO: 3 es de 156.3 μM , indicando que tiene ligeramente mayor afinidad hacia el receptor NMDA que el péptido SEQ ID NO: 2. Esto indicaría que los residuos o aminoácidos que fueron mutados en el péptido SEQ ID NO: 2, Leu 5 y Asn 8 son importantes para la interacción e inhibición de las corrientes evocadas del receptor NMDA.

Expresión de subunidades recombinantes del receptor NMDA

Dado que los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 presentaron un efecto inhibitorio sobre corrientes evocadas del receptor NMDA en cultivos primarios de neuronas hipocámpales, fue necesario determinar si los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 eran selectivos entre los principales subtipos de la subunidad GluN2 del receptor NMDA. Por tanto se realizó la expresión de las subunidades GluN2B (NR1a/NR2B) y GluN2A (NR1a/NR2A) acopladas a la proteína verde fluorescente en células no neuronales HEK293 y se realizó la evaluación funcional electrofisiológica siguiendo la misma metodología descrita que para las neuronas hipocámpales.

Se realizaron aplicaciones de los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 a la máxima concentración probada en los cultivos neuronales, 500 μM . Al realizar una aplicación con 500 μM de péptido SEQ ID NO: 2 sobre las corrientes evocadas de células expresando los receptores recombinantes NR1a/NR2B, se observó un bloqueo casi total de la corriente (figura 4A), en relación a la corriente control. Cuando se evaluó la misma concentración para el recombinante NR1a/NR2A se observó una ligera disminución de la corriente (figura 4B) respecto a lo observado en la inhibición del recombinante NR1a/NR2B. Estos resultados indican una selectividad del péptido SEQ ID NO: 2 hacia la subunidad GluN2B sobre GluN2A.

En cuanto a la selectividad del SEQ ID NO: 3 hacia las subunidades del receptor NMDA, como se observa en la Figura 5, este péptido a una concentración de 500 μM está inhibiendo las dos subunidades por más del 50% de la corriente máxima, pero no bloquea con la misma potencia la subunidad GluN2B como el péptido SEQ ID NO: 2, esto indica que la afinidad y selectividad hacia esa subunidad es menor. Las subunidades GluN2B y GluN2A presentan alto grado de similitud en su secuencia y dada la selectividad del SEQ ID NO: 3 hacia GluN2A, se puede pensar que los aminoácidos mutados están jugando un papel importante en la interacción hacia GluN2A. Sheng *et al.*, 2010, presentó una serie análogos de Conantouinas, donde uno de los péptidos preserva los residuos γ -carboxiglutámico con las mutaciones presentes en el péptido SEQ ID NO: 3, Leu5Tyr y Asn8Ala; Con-G[L5Y/N8A], este péptido presentó inhibición solo por los subtipos de subunidades GluN2B (1a/2B y 1b/2B), en nuestros resultados en contraposición a eso encontramos que el péptido SEQ ID NO: 3 que posee las mutaciones L5Y/N8A, está

generando antagonismo tanto para GluN2B como GluN2A, indicando que los residuos de Asp presente en ese péptido le permiten un mayor rango de selectividad.

Ejemplos de aplicación práctica

Métodos

Diseño de Péptidos.

Los péptidos SEQ ID NO: 2 (GEDDLQDNQDLIRDKSN) y SEQ ID NO: 3 (GEDDYQDAQDLIRDKSN) se diseñaron en el laboratorio BioinfoGrip de la Universidad Nacional de Colombia para interactuar con el dominio de unión al ligando (LBD) de la subunidad GluN2B. El diseño del péptido involucró la inserción de cambios puntuales en la secuencia de la Conantokina G y la evaluación in silico mediante simulaciones de acoplamiento molecular de cada péptido utilizando un modelo estructural de la subunidad GluN2B y el programa AutoDock Vina y el servidor Rosetta FlexPepDock.

Como control, inicialmente se seleccionó un péptido con secuencia aleatoria con la misma longitud (17 a.a.) como es habitual en este tipo de diseño. Sin embargo, este péptido control mostró actividad agonista. Por lo tanto, se seleccionó otro péptido no relacionado (EAR7) como control (TKRSSRAFRE), este péptido se diseñó para interactuar con un sitio intracelular del dominio C-terminal (CTD) de la subunidad GluN2B [22]. EAR16 y EAR18 muestran buena solubilidad en agua (<http://pepcalc.com>) y tienen niveles de hidrofobicidad similares: 19.36 y 19.65, respectivamente (<https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/protein-biología/péptidos-proteínas/custom-peptide-synthesis-services/peptide-analyzing-tool.html>). La permeabilidad se predijo utilizando el programa CellPPD (<http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/index.html>) los resultados corresponden a valores negativos (-0.06, -0.57 y -0.57 para EAR7, EAR16 y EAR18, respectivamente) lo que indica que son péptidos que no permean las membranas. La síntesis de los péptidos fue realizada por un proveedor comercial (Peptide 2.0 en Sterling, VA, EE. UU.). Estos péptidos no muestran modificaciones en sus extremos, el N terminal es una amina libre y el C terminal es un ácido carboxílico libre, el proveedor comercial aseguró la pureza y la masa de cada péptido mediante análisis de HPLC y espectrometría de masas.

Construcción de la estructura tridimensional de los péptidos: para cada péptido se generó un modelo de estructura tridimensional utilizando el software UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), y se refinó la estructura tridimensional en un ambiente hidrofílico utilizando PEPstr (Peptide Tertiary Structure Prediction Server; <http://www.imtech.res.in/raghava/pepstr/>).

Modelo estructural de la subunidad GluN2B: este modelo se obtuvo usando los aminoácidos 1-817 de la secuencia publicada para la subunidad GluN2B (Ensembl ENSRNOP00000011697, Rattus norvegicus). Esta secuencia de aminoácidos incluye los dominios amino terminal (ATD) y de unión a ligando (LBD). El modelo estructural de GluN2B se predijo utilizando el servidor I-TASSER

(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/>), este software utilizó varias estructuras de referencia para determinar el mejor modelo. El mejor resultado o modelo (basado en el C-Score y TM-score) se obtuvo cuando la estructura de referencia fue el receptor inotrópico de glutamato AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) (PDB 3KG2). Esta estructura se ha utilizado previamente para elucidar otras funciones de los receptores de glutamato. El C-score usualmente oscila entre -5 y 2, el valor más positivo es el mejor en relación a la topología del modelo, el modelo GluN2B seleccionado tiene un C-core de 0.01. El TM-score proporciona un valor de la correspondencia estructural entre dos estructuras (GluN2B-template), valores superiores a 0.5 indican que la topología del modelo tiene mayor probabilidad que sea correcta, para el modelo de GluN2B que se tomo como el mejor el valor de TM-score fue de 0.71.

El modelo de GluN2B seleccionado (usando I-TASSER) se evaluó adicionalmente utilizando PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) que proporciona varios parámetros que incluyen el perfil de hidrofobicidad, accesibilidad al solvente, predicción de sitios de unión del ligando. La estructura secundaria del modelo también se evaluó usando gráficas de Ramachandran (Procheck en PDBsum), que proporciona el porcentaje de regiones estructurales que son "favorables", "permitidas" o "no permitidas". Un modelo con buena estereoquímica debería tener cerca del 90% de los residuos en regiones estructuralmente favorables. El modelo seleccionado tiene el 86.7% de los residuos localizados en regiones estructuralmente "favorables" y el 10.9% de los residuos en regiones "permitidas". El modelo tiene una topología estructural comparable a la descrita para otros receptores de glutamato inotrópicos, incluidos los dominios ATD, LDB y transmembrana (TDM). Las configuraciones estructurales de ATD y LBD se componen principalmente de hélices α y permiten la unión de moduladores y agonistas.

Simulación de Acoplamiento Molecular (Docking): Las simulaciones de acoplamiento molecular se realizaron con las estructuras tridimensionales obtenidas de los péptidos y de la subunidad GluN2B usando "Autodock Vina" (<http://vina.scripps.edu>). Se generó una grilla (grid box) en el centro del dominio LBD del modelo GluN2B al que se asignaron los correspondientes átomos de hidrógeno y estados de protonación. El Grid Box se configuro con un espaciado de 1 Å, la exhaustividad del cálculo se estableció en 10 y el número de resultados por Docking fue 10 para cada péptido. Los ligandos para el docking fueron cada uno de los péptidos con los cambios puntuales en su secuencia. Como resultados se escogieron las mejores conformaciones y orientaciones, con los valores de energía de unión más bajos (-6,6 kcal / mol y -7,7 kcal / mol para EAR16 y EAR18, respectivamente). Los resultados del docking se visualizaron utilizando la interfaz gráfica de Autodock Tools (v. 1.5.4).

Los resultados del acoplamiento o docking se refinaron con el servidor Rosetta FlexPepDock (<http://flexpepdock.furmanlab.cs.huji.ac.il/index.php>), que optimiza la orientación e interacción péptido-receptor usando el método Monte-Carlo. Con la estructura de inicio, FlexPepDock realizó 200 simulaciones independientes, 100 simulaciones realizadas en alta resolución. Las otras 100 simulaciones incluyeron un paso de pre-optimización a baja resolución, seguido de un método de refinamiento de alta

resolución. Esto dio como resultado 200 modelos para cada péptido, se seleccionó el mejor para cada péptido según el puntaje proporcionado por la función de puntuación de Rosetta (675,461 y 755,051 para EAR16 y EAR18, respectivamente). Las interacciones entre los péptidos y la subunidad GluN2B se determinaron utilizando el software Discovery Studio Visualizer v4.1 (<http://accelrys.com/products/discovery-studio/visualization.html>). Las imágenes de acoplamiento se generaron utilizando UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

Síntesis de péptidos.

Los péptidos presentados como SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, fueron sintetizados comercialmente a partir de aminoácidos tipo L. La casa comercial aseguró una pureza del 95-99% de los péptidos mediante análisis combinado de HPLC-MS. Los péptidos fueron entregados liofilizados y se mantuvieron a -20°C. Antes de las pruebas, los péptidos de acuerdo a su perfil de hidrofobicidad fueron disueltos en agua desionizada y mantenidos a -20°C.

Evaluación funcional de los péptidos.

Cultivo primario de Neuronas Hipocampales a partir de embriones de rata Sprague Dawley de 18 días de gestación E18.

Se realizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales que fueron preparados a partir de embriones de 18 días de rata Sprague Dawley (250-300 g). Todos los animales fueron usados de acuerdo a los lineamientos y en correspondencia con el aval del comité de ética de New York University Langone Medical Center Institutional Animal Care and Use Committee. El procedimiento de extracción y el cultivo se basaron de acuerdo a lo reportado por Longart *et al.*, 2004 y Beaudoin III *et al.*, 2012.

- Extracción de hipocampos

Las ratas fueron sacrificadas mediante inhalación en cámara de CO₂ (~10 min, 15 psi) y posterior dislocación cervical. Se realizó una cesárea para extraer los embriones, que fueron colocados en medio de disección frío (DPBS, 1X, (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, no calcium, no magnesium, Gibco) más 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco)). Se removió el saco embrionario a cada embrión individual y se ubicaron los embriones en una caja de Petri con medio de disección frío. Con ayuda de pinzas se removió la piel que recubre la cabeza y el cráneo, seguidamente, se despejó el cerebro y se extrajo el conjunto cerebro-cerebelo. Cuidadosamente se removió el cerebelo y se colectaron en promedio 10-12 cerebros en medio de disección frío. Posteriormente, se separaron los hemisferios cerebrales y se retiraron las meninges. Una vez retiradas las meninges se pudo apreciar el hipocampo. Usando las pinzas cuidadosamente se removieron los hipocampos de cada hemisferio y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL con 2 mL de medio de disección frío.

- Disociación y cultivo de las células hipocampales

Los hipocampos se lavaron dos veces con 2 mL de medio de disección frío. Para disociar el tejido, se adicionó 300 μ L de tripsina 0.25% (Gibco) al Falcon con los 2 mL de medio de disección con los hipocampos y se llevó a incubadora a 37°C durante 20 minutos con rotación constante. Después de esto se inhibió la tripsina adicionando 5 mL de medio Neurobasal completo (Medio Neurobasal (Gibco) suplementado con 2% de B27 (Gibco), 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco) y 0.5 mM de Glutamax (Gibco)). Se descartó la solución anterior y se realizaron dos lavados, primero con 5 mL y después con 10 mL de medio neurobasal completo. Los hipocampos se disociaron mecánicamente en este volumen final, usando pipetas Pasteur de vidrio cuyas puntas fueron previamente pulidas al fuego para tener 3 tamaños (grande, mediana y pequeña). La disociación consistió en pasar los hipocampos por las puntas de las pipetas Pasteur 10 veces por punta, usando primero la de punta grande, luego la mediana y finalmente con la punta pequeña, hasta que se obtuvo una suspensión celular. Esta suspensión celular se pasó por un filtro (Cell Strainer, 70 μ M, BD Falcon) para separar el tejido no disociado. Se realizó conteo celular y viabilidad usando el método de azul de tripano en un hemocitómetro o cámara de Neubauer, las células se sembraron a una densidad de 60.000-80.000 células por pozo en laminillas circulares de 12 mm para electrofisiología, previo recubrimiento con una mezcla de Poli-D-lisina (37.5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) y Laminina (2.5 μ g/ml, Invitrogen) en placas de 24 pozos. Algunos cultivos de neuronas fueron mantenidos en 500 μ L de medio Neurobasal (Gibco) suplementado con 2% de B27 (Gibco), 1% Penicilina/Estreptomicina y 0.5 mM de Glutamax (Gibco) y en otros cultivos fue reemplazado el B27 por 2% de Suero Fetal Bovino. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C, 95% de humedad, 5% de CO₂ y se realizaron cambios de la mitad del medio cada 3-4 días. Se realizaron registros electrofisiológicos en configuración Whole Cell, Voltage Clamp, como se describe en el apartado de electrofisiología para neuronas mantenidas en B27 entre DIV (días in vitro) 7-20, y para neuronas en suero fetal bovino entre DIV5-15. Entre 4-11 células fueron evaluadas por cada péptido.

Registros Electrofisiológicos.

Se obtuvieron registros electrofisiológicos (Corrientes evocadas del receptor NMDA) de las neuronas hipocampales (diferentes DIV) usando la técnica de Parche de membrana (Patch Clamp) en la configuración de célula completa (whole cell) (Hamill *et al.*, 1981; Sackmann y Neher., 1983), con un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Unión City, CA) y analizados usando el programa Clampfit 10.4 (Axon Instruments, Unión City, CA), manteniendo el potencial de membrana a -60 mV (Voltage clamp) y temperatura ambiente. Las neuronas fueron colocadas en medio extracelular (solución de baño) conteniendo; 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 10 mM D-glucosa, pH 7.4 (Huang *et al.*, 2010).

El magnesio fue omitido para prevenir el bloqueo voltaje dependiente del canal del receptor NMDA (Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984). Igualmente se adicionó a la solución extracelular, 1 μ M Tetrodotoxina (Sigma) para bloquear la actividad de canales de Na⁺ dependientes de voltaje; 20 μ M CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, Sigma) fue adicionado para eliminar la actividad de los receptores glutamatérgicos AMPA

y Kainato; así mismo, se adicionó 50 μ M Bicuculina (Sigma) junto con 100 μ M Picrotoxina (Sigma) para eliminar las corrientes inhibitorias de los receptores GABAA. Y 1 μ M Estricnina para inhibir la actividad de los canales de glicina.

La solución intracelular (micropipeta) contenía; 110 mM Cs-gluconato, 20 mM CsCl, 10 mM Hepes, 10 mM EGTA, 4 mM Mg-ATP, 0.4 mM Na-GTP, pH 7.3 (ajustado con CsOH). Las micropipetas de borosilicato fueron preparadas en un puller P-97 model (Sutter Instruments) y en una micro-forja MF-90 (Narishige), y tuvieron resistencias en la solución extracelular de 1-3 M Ω . Se utilizaron electrodos de Cloruro de plata (AgCl) previamente clorinados. Para llevar a cabo los registros mediante *Whole Cell* primero fue necesario lograr la configuración *Cell attached*. Para ello se realizó un acercamiento de la pipeta a la célula escogida para realizar el registro con ayuda de un micromanipulador. Se mantuvo una presión positiva en el interior de la micropipeta mientras se acercaba a la célula. Al hacer contacto con la membrana, se aplicó una suave succión negativa para permitir que parte de la membrana se invaginara en la pipeta provocando una firme unión entre la membrana y el vidrio. Junto con lo anterior, fue necesario también generar una pequeña depresión en la membrana al empujar la micropipeta ligeramente contra la membrana para lograr eficiencia en el sello del orden de giga ohms (>1G Ω). La ruptura de la membrana para lograr el contacto eléctrico entre la solución de registro ubicada en el interior de la micropipeta con el medio interno de la célula se logró haciendo succión usando una jeringa de 1 mL.

Para obtener respuestas evocadas de los receptores NMDA, estos fueron activados aplicando a las neuronas el agonista NMDA (Sigma) y el coagonista Glicina (Sigma) durante 5 segundos y a diferentes concentraciones mediante un sistema bombas de perfusión (perfusión pénsil). Para comprobar corrientes del receptor NMDA se utilizó el bloqueador MK-801 (Sigma) y para determinar corrientes de la subunidad GluN2B del receptor NMDA, se utilizó el bloqueador específico para esa subunidad, Ro 25-9681 (Sigma).

Expresión de subunidades recombinantes del receptor NMDA

cDNAs codificantes de las subunidades del receptor NMDA de rata GluN1 (NR1a), GluN2A (NR2A) y GluN2B (NR2B), cada uno acoplado a la proteína verde fluorescente GFP y contenidos en los vectores de expresión pcDNA3.1, pcDNA1.1 y pRK5 respectivamente fueron comprados a Addgene (Cambridge, MA). Células HEK293 (Human Embryonic Kidney) fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA) y crecidas en frascos de 25 cm² en medio DMEM high glucose (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum, HI FBS, Invitrogen) y mantenidas a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Una vez alcanzado el 100% de confluencia, 24 horas antes de la transfección, las células fueron sembradas en laminillas circulares para placas de 24 pozos previo recubrimiento con Poli-D-Lisina (50 ug/ml). Las células fueron transfectadas con los cDNAs codificantes de las subunidades del receptor NMDA cada uno por separado, usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en medio Opti-MEM. La relación de transfección fue, NR1a/NR2A 1:3, NR1a/NR2B 1:3. Tres horas después de la transfección se removió la mitad del medio por DMEM completo y las células se

mantuvieron en presencia de 500 μ M de Ketamina para prevenir la excitotoxicidad vía receptor NMDA después de la transfección. 24 horas después de la transfección se realizaron registros electrofisiológicos en configuración Whole Cell, Voltage Clamp, como se describió en el apartado anterior. Se escogieron las células GFP positivas, con un microscopio Olympus acoplado a un sistema de fluorescencia. Entre 3-5 células fueron evaluadas por cada péptido.

Aplicación de los péptidos.

Se evaluaron los péptidos identificados como SEQ No. 2 y SEQ No. 3, cada uno por separado utilizando el sistema de perfusión mencionado anteriormente y liberados al medio extracelular o solución de baño.

Para cada registro electrofisiológico el tiempo de grabación fue 4 minutos. A los 30 segundos de iniciado el registro, se comenzó la aplicación de los péptidos y los agonistas y coagonistas dependiendo el caso. El tiempo de aplicación de cada péptido fue de 10 segundos, iniciando 5 segundos antes de estimular durante 5 segundos con el agonista NMDA y coagonista Glicina. Inmediatamente después se realizó lavado o perfusión con la solución de baño o solución extracelular para remover los péptidos y agonistas. En la mayoría de los casos se colectaron 8 registros por célula, dos registros iniciales como control estimulando con NMDA/Glicina, a continuación 4 registros con la aplicación de los péptidos más NMDA/Glicina y dos registros finales solo con NMDA/Glicina para evaluar la recuperación del canal. Cada registro se realizó a 4 minutos uno del otro.

Todas las respuestas fueron normalizadas de acuerdo a la máxima corriente evocada en ausencia de péptido. El análisis de la amplitud y cinética de las corrientes fue realizado mediante el programa *ClampFit* (pClamp10.4), en algunos casos se evaluó los 5 o 7 primeros segundos después de la estimulación.

Para la representación del curso temporal de las respuestas a lo largo del experimento y el ajuste de las curvas de concentración-respuesta (*dose-response*) de los péptidos se usó el programa *GraphPad Prism V. 5*, calculándose la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), que representa la concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la respuesta máxima causada por el agonista. Los resultados están presentados como la media y el error estándar de la media (mean $\pm$ S.E.M). La significancia estadística fue determinada por una prueba no pareada *t-test* cuando se comparó dos grupos. El método ANOVA Dunnett de una vía se usó cuando se compararon tres o más grupos usando el programa *GraphPad Prism V.5*. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

Referencias

- Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N. 1994. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol.*1;347(1):150-60.
- Alex, A., Saunders G., Dalpe´-Charron, A., Reilly, C., Wilcox, K. 2011. CGX-1007 prevents excitotoxic cell death via actions at multiple types of NMDA receptors. *NeuroToxicology* 32: 392–399.
- Balsara R., Dang A., Donahue D L., Snow T., Castellino FJ. 2015. Conantokin-G Attenuates Detrimental Effects of NMDAR Hyperactivity in an Ischemic Rat Model of Stroke. *PLoS ONE* 10(3):e0122840. doi:10.1371/journal.pone.0122840
- Barton M.E., White H.S., Wilcox K.S. 2004. The effect of CGX-1007 and CI-1041, novel nmda receptor antagonists, on NMDA receptor-mediated EPSCs. *Epilepsy Res.* 59:13–24.
- Beaudoin III, Gerard M J, Lee Seung-Hye, Singh Dipika, Yuan Yang, Ng Yu-Gie, Reichardt Louis F & Arikkath Jyothi. 2012. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature Protocols* 7, 1741–1754.
- Blandl T, Prorok M, Castellino FJ. NMDA-receptor antagonist requirements in conantokin-G. *FEBS Lett.* 1998;435:257–262.
- Cao X, Cui Z, Feng R, Tang YP, Qin Z, Mei B, and Tsien JZ. 2007 Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur J Neurosci* 25:1815–1822.
- Chandler P, Pennington M, Maccacchini ML, Nashed NT, Skolnick P. 1993. Polyamine-like actions of peptides derived from conantokin-G, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist. *J Biol Chem.* Aug 15; 268(23):17173-8.
- Citri A, Malenka RC. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 33(1):18-41.
- Coyle JT and Tsai G. 2004. The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 174:32–38.
- Donevan SD, McCabe RT. 2000. Conantokin G is an NR2B-selective competitive antagonist of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol.* 58(3):614-23.
- Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J.N.C., Mohacsi, E., Heitz, M.P and Kemp, J.A. 1997. Ro 25–6981, a Highly Potent and Selective Blocker of NMethyl-D-aspartate Receptors Containing the NR2B Subunit Characterization in Vitro. *JPET* 283:1285–1292.
- Green, AR.2002. Why do neuroprotective drugs that are so promising in animals fail in the clinic? An industry perspective. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:1030–1034.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakman B, Sigworth FJ.1981. Improved patch clamp technique for high resolution current recording from cell and cell free membrane patches. *Pflügers Arch.*;391:85-100.
- Hardingham GE, Bading H. 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.*11(10):682-96.
- Heresco-Levy U. 2000. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-based treatment approaches in schizophrenia: the first decade. *Int J Neuropsychopharmacol* 3:243– 258.
- Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, and Hill MD. 2004. The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med* 4:131–136.

Klein RC1, Galdzicki Z, Castellino FJ. 1999. Inhibition of NMDA-induced currents by conantokin-G and conantokin-T in cultured embryonic murine hippocampal neurons. *Neuropharmacology*. 38(12):1819-29.

Kotermanski SE and Johnson JW (2009) Mg²⁺ imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *J Neurosci* 29:2774–2779.

Krupp JJ, Vissel B, Thomas CG, Heinemann SF, Westbrook GL. 1999. Interactions of calmodulin and alpha-actinin with the NR1 subunit modulate Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptors. *J Neurosci*. Feb 15;19(4):1165-78.

Labrie V and Roder JC. 2010. The involvement of the NMDA receptor D-serine/ glycine site in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 34:351–372.

Layer RT, Wagstaff JD, White HS. 2004. Conantokins: peptide antagonists of NMDA receptors. *Curr Med Chem*. 11 (23): 3073-3084.

Lin CH, Chan FC, Hwang JK, Lyu PC. 1999. Calcium binding mode of gamma-carboxyglutamic acids in conantokins. *Protein Eng*. Jul;12(7):589-95.

Lipton SA. 2006. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. Feb;5(2):160-70.

Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S, and Grace AA. 2008. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci* 31:234–242.

Lo EH, Dalkara T, and Moskowitz MA. 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4:399–415.

Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A. 2004. Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol* 472:156 –172.

Maccacchini, 1998. Patente US5830998A. Allosteric modulators of the NMDA receptor and their use in the treatment of CNS disorders and enhancement of CNS function.

Maccacchini, 2000. Patente US6110894A. Allosteric modulators of the NMDA receptor and their use in the treatment of CNS disorders and enhancement of CNS function.

Madden, D. 2002. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci*, 3(2):91-101.

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*;309:261–263.

Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P. 2009a. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol* 157:1301–1317.

Monyer H, Burnashev N, DzLaurie DJ, Sakmann B, and Seeburg PH. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529–540.

Muir KW. 2006. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 6:53–60.

Myers RA, McIntosh JM, Imperial J, Williams RW, Oas T, Haack JA, Hernandez JF, Rivier J, Cruz LJ and Olivera BM. 1990. Peptides from *Conus* venoms which affect Ca⁺⁺ entry into neurons. *J Toxicol Toxin Rev* 9: 179-202.

Nahum-Levy R., Lipinski D., Shavit S., Benveniste M. 2001. Desensitization of NMDA receptor channels is modulated by glutamate agonists. *Biophysical Journal*.;80(5):2152–2166.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*;307:462–465.

Ogden KK, Traynelis SF. 2011. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* Dec;32(12):726-33.

Olivera BM. 1997. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell* 8:2101–2109

Parsons CG, Danysz, W and Lodge D. 2002. Introduction to glutamate receptors, their function and pharmacology, in *Ionotropic Glutamate Receptors as Therapeutic Targets* (Danysz W, Lodge D, and Parsons CG eds) pp 1–30, F. P. Graham Publishing Co., Johnson City, TN.

Prorok M and Castellino FJ. 2007. The molecular basis of conantokin antagonism of NMDA receptor function. *Current Drug Targets* 8:633–642.

Renzhan Hong et al., 2011. Patente, CN102167729A. Conotoxin analog Glu-Con-G (Glutamate-Conantokin-G) with morphine-dependent resistance and analgesic effect.

Sacco RL, DeRosa JT, Haley EC Jr, Levin B, Ordonneau P, Phillips SJ, Rundek T, Snipes RG, Thompson JL, and Glycine Antagonist in Neuroprotection Americas Investigators. 2001. Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. *JAMA* 285:1719–1728.

Sackmann, B. and Neher, E. (ed.).1983. Single channel recording. New York. Plenum Press.

Saydoff et al., 1998. Patente CA 2288346 A1. Use of conantokins for producing analgesia or for neuroprotection.

Sheng Zhenyu, Prorok Mary, and. Castellino Francis J. 2010. Specific determinants of conantokins that dictate their selectivity for the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*. Oct 27;170(3):703-10.

Shim SS, Hammonds MD, and Kee BS. 2008. Potentiation of the NMDA receptor in the treatment of schizophrenia: focused on the glycine site. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258:16–27.

Small DL and Tauskela JS. 2005. Glutamate receptor pharmacology: lessons learned from the last decade of stroke trials, in *Glutamate Receptors in Peripheral Tissue: Excitatory Transmission Outside the CNS* (Gill S and Pulido O eds) pp 27–45, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Sobolevsky AI, Rosconi MP, and Gouaux E. 2009. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462:745–756.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, and Tsien JZ. 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63–69.

Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, and Tsien JZ. 2001. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41:779–790.

Teichert RW, Jimenez EC, Twede V, Watkins M, Hollmann M, Bulaj G, and Olivera BM. 2007. Novel conantokins from *Conus parius* venom are specific antagonists of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 282:36905–36913.

Traynelis, Stephen F., Wollmuth., LP., Chris J. McBain, Frank S. Menniti, Katie M. Vance, Kevin K. Ogden, Kasper B. Hansen, Hongjie Yuan, Scott J. Myers, and Ray Dingledine. 2010. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 62:405–496.

Wang CX and Shuaib A. 2005. NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:143–151.

Warder, S. E., Prorok, M., Chen, Z., Li, L., Zhu, Y., Pedersen, L. G., Ni, F., and Castellino, F. J. 1998. The roles of individual gamma-carboxyglutamate residues in the solution structure and cation-dependent properties of conantokin-T. *J. Biol. Chem.* 273, 7512–7522.

Waxman, E and Linch, D. 2005. N-Methyl-D-aspartate Receptor Subtype Mediated Bidirectional Control of p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 280, No. 32, Issue of August 12, pp. 29322–29333.

Williams AJ, Dave JR, Lu XM, Ling G, Tortella FC. 2002. Selective NR2B NMDA receptor antagonists are protective against staurosporine-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol*; 452(1):135–6.

Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL. 1986. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep;83(18):7104-8.

Xiao C, Huang Y, Dong M, Hu J, Hou S, Castellino FJ, Prorok M, Dai Q. 2008. NR2B-selective conantokin peptide inhibitors of the NMDA receptor display enhanced antinociceptive properties compared to non-selective conantokins. *Neuropeptides*.42:601–609.

Yurkewicz L, Weaver J, Bullock MR, and Marshall LF. 2005. The effect of the selective NMDA receptor antagonist traxoprodil in the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 22:1428–1443.

Zhou, L. M., Szendrei, G. I., Fossom, L. H., Maccacchini, M. L., Skolnick, P., and Otvos, L., Jr. 1996. Synthetic analogues of conantokin-G. NMDA antagonists acting through a novel polyamine-coupled site. *J. Neurochem.* 66, 620–628