



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 446 292

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01) A61K 38/04 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 29.02.2008 E 08726313 (3) (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 15.01.2014 EP 2120987
- (54) Título: Tratamiento del accidente cerebrovascular y otras enfermedades sin inhibir los canales de calcio de tipo N
- (30) Prioridad:

02.03.2007 US 904507 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 07.03.2014

(73) Titular/es:

NONO INC. (100.0%) 88 Strath Avenue Toronto ON M8X 1R5, CA

(72) Inventor/es:

BELMARES, MICHAEL P.; GARMAN, JONATHAN DAVID; LU. PETER S.: SALTER, MICHAEL W. y TYMIANSKI, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

DESCRIPCIÓN

Tratamiento del accidente cerebrovascular y otras enfermedades sin inhibir los canales de calcio de tipo N

Antecedentes de la invención

5

10

15

20

25

40

45

50

55

Se prevé que el accidente cerebrovascular afectará a más de 600.000 personas al año en los Estados Unidos. En un informe de 1999, más de 167.000 personas murieron a causa de apoplejía, con una mortalidad total de 278.000. En 1998, se pagaron 3,6 millardos solo a los beneficiarios de Medicare que fueron dados de alta de los hospitales de corta estancia, sin incluir la atención a largo plazo para >1.000.000 personas, que al parecer tienen limitaciones funcionales o dificultad con las actividades de la vida diaria como resultado de un accidente cerebrovascular (Heart and Stroke Stadistical Update, American Heart Association, 2002). No se ha aprobado ningún agente terapéutico que reduzca el daño cerebral resultante de accidente cerebrovascular a través de la protección directa de la muerte de las neuronas.

El accidente cerebrovascular se caracteriza por la muerte de las células neuronales en zonas de isquemia, hemorragia cerebral y/o trauma. La muerte celular se desencadena por la sobreexcitación con glutamato de las neuronas, lo que lleva a un aumento de Ca² intracelular y a un aumento del óxido nítrico debido a un aumento en la actividad de la nNOS (óxido nítrico sintasa neuronal).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC) y media la neurotransmisión a través de la mayoría de las sinapsis excitadoras. Tres clases de receptores de canales de iones regulados por glutamato (N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) y kainato) transducen la señal postsináptica. De estos, los receptores de NMDA (NMDAR) son responsables de una parte significativa de la excitotoxicidad del glutamato. Los receptores de NMDA son complejos que tiene una subunidad NR1 y una o más subunidades NR2 (2A, 2B, 2C o 2D) (véase, p. ej., McDain, C. y Caner, M. (1994) Physiol. Rev. 74:723-760), y con menos frecuencia, una subunidad NR3 (Chatterton et al. (2002) Nature 415:793-798). Se ha demostrado que las subunidades NR1 se unen glicina, mientras que las subunidades NR2 se unen a glutamato. Se requiere la unión tanto a Glicina como a glutamato para abrir el canal iónico y permitir la entrada de calcio en la célula. Las cuatro subunidades del receptor NR2 parecen determinar la farmacología y las propiedades de los receptores de NMDA, con contribuciones adicionales de corte y empalme alternativo de la subunidad NR1 (Kornau et al. (1995) Science 269:1737-40). Mientras las subunidades NR1 y NR2A se expresan de forma ubicua en el cerebro, la expresión NR2B se limita al cerebro anterior, NR2C al cerebelo, y NR2D es rara en comparación con los otros tipos.

Debido al papel clave de los receptores de NMDA en la respuesta de excitotoxicidad, estos han sido considerados como dianas para agentes terapéuticos. Se han desarrollado compuestos que se dirigen al canal iónico (cetamina, la fenciclidina, PCP, MK801, amantadina), al canal exterior (magnesio), al sitio de unión a glicina de las subunidades NR1, al sitio de unión a glutamato de las subunidades NR2, y a sitios específicos de las subunidades NR2 (Zinc-NR2A; Ifenprodilo, traxoprodilo-NR2B). Entre éstos, los antagonistas no selectivos del receptor de NMDA han sido los agentes más neuroprotectores en modelos animales de accidente cerebrovascular. Sin embargo, las pruebas clínicas con estos fármacos en el accidente cerebrovascular y la lesión cerebral traumática han fracasado hasta ahora, en general, como resultado de graves efectos secundarios tales como alucinaciones e incluso coma.

Se ha informado de que la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) se acopla a los NMDAR en las rutas que median la excitotoxicidad y la lesión cerebral isquémica (Aarts et al., Science 298, 846-850 (2002)). Este acoplamiento se vio interrumpido por la transducción de las neuronas con péptidos del extremo C-terminal de NMDAR 2B que se unen a PSD-95 fusionada a un péptido de internalización tat convencional. Este tratamiento atenuó la señalización de NMDAR aguas abajo sin inhibir la actividad de NMDAR, protegió las neuronas corticales cultivadas de insultos excitotóxicos y redujo el volumen de infarto cerebral en ratas sometidas a isquemia cerebral focal transitoria.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un péptido quimérico aislado en donde el péptido quimérico comprende un péptido activo que inhibe la unión de PSD-95 a un receptor de NMDA y un péptido de internalización que promueve la absorción del péptido quimérico en las células y tiene una capacidad reducida para unirse a un canal de calcio de tipo N con respecto al péptido tat YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1), y en donde el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende [T/S] X [V/L] (SEQ ID NO: 14), opcionalmente, [E/D/N/Q] - [S/T] - [D/E/Q/N] - [V/L] (SEQ ID NO: 5) y el péptido de internalización tiene una secuencia de aminoácidos que comprende XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), en donde X es un aminoácido distinto de Y o nada . Opcionalmente, X es F (SEQ ID NO: 135). Opcionalmente, X es nada (SEQ ID NO: 136). Opcionalmente, el péptido de internalización consiste en GRKKRRQRRRP (SEC ID NO: 3). Opcionalmente, el péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en GRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 4).

Opcionalmente, el péptido activo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de ESDV (SEQ ID NO: 6), ESEV (SEQ ID NO: 7), ETDV (SEQ ID NO: 8), ETEV (SEC ID NO: 9), DTDV (SEQ ID NO: 10), DTEV (SEQ ID NO: 11). Opcionalmente, el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende

KLSSIESDV (SEQ ID NO: 12). Opcionalmente, el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende KLSSIETDV (SEQ ID NO: 13). Opcionalmente, el péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 19) o FGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID NO: 16). Opcionalmente, el péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 19) o FGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID NO: 16).

La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un péptido quimérico aislado como se ha descrito anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

La invención se puede utilizar en el tratamiento de los efectos dañinos del accidente cerebrovascular en un paciente que tiene o está en riesgo de tener un accidente cerebrovascular u otra lesión en el SNC, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un péptido quimérico o peptidomimético del mismo. El péptido quimérico comprende un péptido activo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende T/SXV/L (SEQ ID NO: 14) y un péptido de internalización que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), en donde X es un aminoácido distinto de Y. Opcionalmente, X es F (SEQ ID NO: 135). Opcionalmente, X es nada (SEQ ID NO: 136). Opcionalmente, el péptido de internalización consiste en GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 15). Opcionalmente, el péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende GRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 4). Opcionalmente, el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende [E/D/N/Q] - [S/T] - [D/E/Q/N] - [V/L) (SEC ID NO: 5). Opcionalmente, el péptido activo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de ESDV (SEQ ID NO: 6), ESEV (SEQ ID NO: 7), ETDV (SEQ ID NO: 8), ETEV (SEC ID NO: 9), DTDV (SEQ ID NO: 10), DTEV (SEQ ID NO: 11). Opcionalmente, el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende KLSSIESDV (SEQ ID NO: 12). Opcionalmente, el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende KLSSIETDV (SEQ ID NO: 13). Opcionalmente, el péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 19) o FGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID NO: 16). Opcionalmente, el péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 19) o FGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID NO: 16). Opcionalmente, la dosificación eficaz es una dosis única de 0,05 a 500 mg, opcionalmente de 0,1 a 100 mg, 0,5 a 50 mg, o 1-20 mg del péptido o peptidomimético. Opcionalmente, el paciente tiene un accidente cerebrovascular isquémico. Opcionalmente, el paciente tiene un accidente cerebrovascular hemorrágico.

Opcionalmente, el paciente tiene una susceptibilidad por encima de la normal a los efectos secundarios mediados por los canales de calcio de tipo N. Opcionalmente, el paciente tiene una presión arterial normal o por debajo de la normal. La invención proporciona adicionalmente un método de evaluación de los efectos secundarios potenciales de un péptido de internalización. El método implica proporcionar un péptido de internalización que promueve la absorción de un péptido activo que inhibe la unión de PSD-95 a un receptor de NMDA en una célula, y determinar la unión del péptido de internalización a un canal de calcio de tipo N. Siendo el grado de unión un indicador de los efectos secundarios potenciales en el uso clínico del péptido de internalización. Opcionalmente, el péptido de internalización se proporciona mediante el escrutinio de un péptido de ensayo para determinar si el péptido de ensayo promueve la absorción del péptido activo.

La invención proporciona adicionalmente un agente quimérico aislado que comprende un agente activo y un péptido de internalización que promueve la absorción del agente quimérico en las células. El péptido de internalización es una variante del péptido tat YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1) que tiene una capacidad reducida para unirse a un canal de calcio de tipo N con respecto al péptido TAT. Opcionalmente, el agente activo es un agente activo mostrado en la Tabla 5. Opcionalmente, el péptido de internalización tiene una secuencia de aminoácidos que comprende XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), en donde X es un aminoácido distinto de Y, o nada. Opcionalmente, X es F (SEQ ID NO: 135). Opcionalmente, X es nada (SEQ ID NO: 136). Opcionalmente, el péptido de internalización consiste en GRKKRRQRRP (SEC ID NO: 3). Opcionalmente, el agente quimérico tiene una kD mayor de 10 nM para un canal de calcio de tipo N.

La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un agente quimérico aislado como se ha descrito anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona adicionalmente un péptido de internalización que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), en donde X es F.

La invención se refiere adicionalmente al agente activo mostrado en la Tabla 5 conectado en la presente memoria al péptido variante de tat del SEQ ID NO: 2, en donde X es un aminoácido distinto de Y, o nada para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente que tiene una susceptibilidad por encima de la normal a los efectos secundarios mediados por los canales de calcio de tipo N.

El documento WO 03/076561 (Artemis Pharmaceuticals GmbH) describe una proteína de fusión que comprende un dominio de ADN recombinasa de sitio específico tal como una recombinasa Cre, y un dominio que contiene una señal de localización nuclear modificada específica. La proteína de fusión puede comprender adicionalmente un dominio de transducción de proteína tal como el FGF hidrófobo y el péptido tat alcalino. La señal de localización nuclear específica sola, o junto con el dominio de transducción de proteína - se describe por promover la absorción

celular de la recombinasa. La proteína de fusión se describe como una herramienta para la manipulación genética eficaz de los genomas de mamífero. Se describen adicionalmente secuencias de ADN que codifican dicha proteína de fusión; los métodos para producir dicha proteína de fusión y su uso como un agente para inducir el redireccionamiento génico en un organismo vivo o en células cultivadas. En el documento no se describe la interacción entre el péptido de internalización tat y los canales de calcio de tipo N.

El documento WO 2005/035562 (Sumitomo Pharmaceuticals Co. Ltd.) describe un agente que promueve el crecimiento de células, en particular, células madre embrionarias y células madre somáticas. Mediante el uso de una proteína de fusión o una conjugación química que se caracteriza por que contiene un dominio de transferencia de proteína y la proteína ERas, se puede promover la proliferación de células, en particular, células madre embrionarias y células madre somáticas. Este promotor del crecimiento celular se puede preparar de forma reversible y, por lo tanto, es clínicamente aplicable a un alto nivel en comparación con el método de transferencia génica. De nuevo, no se describe la interacción entre el péptido de internalización tat y los canales de calcio de tipo N.

Breve descripción de los dibujos

5

10

Figuras 1A, B, C: Resultados de un estudio de unión al receptor/inhibición que evalúa la capacidad del péptido YGRKKRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 17) para inhibir la unión de diferentes ligandos radiomarcados a receptores celulares.

Figura 2: Efecto de la aplicación de los diversos péptidos sobre la amplitud de las corrientes de calcio de tipo N (superior) o las corrientes de la célula completa (inferior) en las DRG.

Las Fig. 3A y 3B muestran (A) El efecto de Tat-NR2B9c y F-Tat-NR2B9c sobre el volumen de infarto cerebral en ratas tratadas 1h después de la aparición de la isquemia permanente utilizando el modelo de oclusión de los vasos de la pía madre (10 ratas/grupo), y (B) las secciones seriadas de cerebro de una rata representante de cada grupo teñidas con cloruro de trifenil-tetrazolio (TTC).

Figura 4: Determinación de la CI₅₀ para algunos de los péptidos para las corrientes de calcio tipo N en las neuronas DRG

- Figuras 5A y 5B: Selectividad de Tat-NR2B9c para las corrientes de calcio tipo N sobre corrientes de tipo L en las neuronas DRG. La Figura 5A muestra el efecto de Tat-NR2B9c (100 μM) y ω-conotoxina (1 μM) en la corriente de calcio en neuronas DGR cultivadas. La Figura 5B muestra la inhibición por nifedipina de la corriente de calcio en DRG en presencia de Tat-NR2B9c (100 μM intracelular).
- Figura 6: Carencia de la dependencia de uso de la inhibición de corrientes de calcio de tipo N por Tat-NR2B9c. Las corrientes se registraron en una neurona DRG representativa por la diferente frecuencia (0,07, 10, 20, 50 Hz). Se aplicó Tat-NR2B9c (100 μM) como se indica. Las corrientes mostraron un fuerte deterioro dependiente de la frecuencia, y el aumento de la frecuencia no aumentó el efecto de inhibición de Tat-NR2B9c.
 - Figura 7: Carencia de inhibición dependiente del voltaje por Tat-NR2B9c de corrientes de calcio de tipo N. Relaciones IV de la corriente de Ca^{2^+} en neuronas DRG cultivadas. Se aplicó Tat-NR2B9c (10, 100 μ M) en presencia o ausencia de nifedipina 10 pM. Las corrientes se indujeron utilizando etapas de fijación de voltaje de 50 ms de -40 a +50 mV a partir del potencial de mantenimiento de -60 mV.

Figura 8: Evaluación de la neuroprotección observada utilizando secuencias C-terminales alternativas en el modelo de oclusión de la pía madre de isquemia permanente en ratas.

Descripción detallada de la invención

40 I. Definiciones

35

45

50

Un "péptido quimérico" significa un péptido que tiene dos péptidos componentes no asociados naturalmente entre sí unidos entre ellos como una proteína de fusión o por medio de un enlace químico.

Un "polipéptido de fusión" se refiere a un polipéptido compuesto, es decir, una secuencia de aminoácidos contigua única, formada por dos (o más) polipéptidos heterólogos diferentes, que normalmente no están fusionados entre sí en una única secuencia de aminoácidos.

El término "dominio PDZ" se refiere a un dominio de proteína modular de aproximadamente 90 aminoácidos, caracterizado por una identidad de secuencia significativa (por ejemplo, al menos 60%) con la proteína sináptica del cerebro PSD-95, la proteína de unión septada de Drosophila Discos Grandes (DLG), y la proteína de unión estrecha epitelial ZO1 (ZO1). Los dominios PDZ también son conocidos como repeticiones de homología de Discos Grandes ("DHRS") y repeticiones GLGF. Los dominios PDZ parecen generalmente mantener una secuencia consenso central (Doyle, DA, 1996, Cell 85: 1067-1076). Las proteínas que contienen el dominio PDZ ilustrativas y las secuencias del dominio PDZ se describen en la Solicitud de los Estados Unidos Núm. 10/714.537, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

El término "proteína PL" o "proteína del ligando PDZ " se refiere a una proteína de origen natural que forma un complejo molecular con un dominio PDZ, o a una proteína cuyo extremo carboxi, cuando es expresado por separado de la proteína completa (p. ej., como un fragmento peptídico de 3-25 residuos, p. ej., 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 14 o 16 residuos), forma tal complejo molecular. El complejo molecular se puede observar *in vitro* utilizando el "análisis de A" o "análisis de G" descritos, por ejemplo, en la Solicitud de los Estados Unidos Núm. 10/714.537, o *in vivo*.

5

30

35

40

45

50

El término "receptor de NMDA", o "NMDAR", se refiere a una proteína asociada a la membrana que se sabe que interactúa con NMDA. El término incluye de este modo las diversas formas de subunidades que se describen en la Sección Antecedentes. Tales receptores pueden ser humanos o no humanos (p. ej., ratón, rata, conejo, mono).

Un "motivo PL" se refiere a la secuencia de aminoácidos del extremo C de una proteína PL (p. ej., los 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 20 o 25 residuos contiguos C-terminales) ("secuencia PL C-terminal") o a una secuencia interna que se sabe que se une al dominio PDZ ("secuencia PL interna").

Un "péptido PL" es un péptido que comprende o que consiste en, o se basa de otra manera en, un motivo PL que se une específicamente a un dominio PDZ.

Los términos "aislado" o "purificado" significan que la especie objeto (p. ej., un péptido) se ha purificada de los 15 contaminantes que se encuentran presentes en una muestra, tal como una muestra obtenida a partir de fuentes naturales que contienen la especie objeto. Si una especie objeto se aísla o purifica, ésta es la especie macromolecular predominante (p. ej., polipéptido) presente en la muestra (es decir, sobre una base molar ésta es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente la especie objeto comprende al menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición aislada, purificada o sustancialmente pura 20 comprende más de 80 a 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Lo más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta la homogeneidad esencial (es decir, las especies contaminantes no pueden ser detectadas en la composición mediante métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular. El término aislado o purificado no necesariamente excluye la presencia de otros componentes destinados a actuar combinados con una especie 25 aislada. Por ejemplo, un péptido de internalización puede ser descrito como aislado a pesar de que está ligado a un péptido activo.

Un "peptidomimético" se refiere a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de un péptido que consiste en aminoácidos naturales. El peptidomimético puede contener análogos no naturales, totalmente sintéticos de aminoácidos, o puede ser una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos pacialmente naturales y análogos aminoácidos parcialmente no naturales. El peptidomimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales, siempre y cuando tales sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o actividad inhibidora o de unión del mimético. Las composiciones de miméticos de polipéptídos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son típicamente de tres grupos estructurales: a) grupos de conexión de residuos distintos de las conexiones de enlace amida natural ("enlace peptídico"); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos de origen natural, o c) residuos que inducen mimetismo estructural secundario, es decir, inducen o estabilizan una estructura secundaria, p. ej., un giro beta, un giro gamma, una lámina beta, una conformación en hélice alfa, y similares. En un peptidomimético de un péptido quimérico que comprende un péptido activo y un péptido de internalización, ya sea el radical activo ya sea radical de internalización o ambos pueden ser un peptidomimético.

El término "unión específica" se refiere a la unión entre dos moléculas, por ejemplo, un ligando y un receptor, caracterizada por la capacidad de una molécula (ligando) para asociarse con otra molécula específica (receptor) incluso en presencia de muchas otras diversas moléculas, es decir, para mostrar una unión preferente de una molécula por otra en una mezcla heterogénea de moléculas. La unión específica de un ligando a un receptor también se pone evidencia por la unión reducida de un ligando marcado de forma detectable al receptor en presencia de ligando no marcado en exceso (esto es, análisis de unión competitiva).

La excitotoxicidad es el proceso patológico por el cual las neuronas resultan dañadas y destruidas por la activación excesiva de los receptores para el neurotransmisor excitador glutamato, por ejemplo los receptores de NMDA, tales como NMDAR 2B.

Un péptido de internalización tat convencional comprende la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1).

Una variante del péptido de internalización tat tiene al menos un aminoácido suprimido, sustituido, o insertado internamente con respecto a un péptido tat convencional.

55 Se utiliza un agente activo para describir un compuesto que tiene o puede tener una actividad farmacológica. Los agentes incluyen compuestos que son fármacos conocidos, compuestos para los que se ha identificado una actividad farmacológica pero que están sometidos a una evaluación terapéutica adicional, y compuestos que son miembros de colecciones y bibliotecas que tienen que ser escrutados para determinar su actividad farmacológica.

Un péptido activo es un agente activo que es un péptido. Un agente quimérico activo comprende un agente activo conectado a un péptido de internalización.

Una actividad "farmacológica" significa que un agente activo muestra una actividad en un sistema de escrutinio que indica que el agente activo es o puede ser útil en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad. El sistema de escrutinio puede ser in vitro, celular, animal o humano. Se pueden describir agentes que tienen actividad farmacológica a pesar de que puede ser necesario un ensayo adicional para establecer la utilidad profiláctica o terapéutica real en el tratamiento de una enfermedad.

Estadísticamente significativo hace referencia a un valor de p que es <0,05, preferentemente <0,01 y lo más preferiblemente <0,001.

10 II. General

5

15

25

30

35

La invención proporciona péptidos quiméricos y peptidomiméticos de los mismos útiles para reducir los efectos perjudiciales de los accidentes cerebrovasculares y otras afecciones neurológicas mediadas al menos en parte por la excitotoxicidad de NMDAR. Los péptidos quiméricos tienen al menos dos componentes. El primer componente es un péptido activo que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o se basa en el motivo PL de una subunidad del Receptor 2 de NMDA (p. ej., número de acceso GenBank 4099612 para NMDA NR2B) (es decir, un péptido PL). Aunque no es necesaria una comprensión de mecanismo para poner en práctica la invención, se cree que tal péptido actúa al menos en parte por medio de la inhibición de la interacción entre los NMDAR con la proteína de densidad postsináptica 95 (es decir, inhibidores de PSD-95).

Los péptidos activos también pueden inhibir las interacciones entre PSD-95 y nNOS y otros receptores de glutamato (por ejemplo, receptores de kainita o receptores AMPA). A diferencia de los antagonistas de glutamato que han fracasado previamente en pruebas clínicas, tales péptidos pueden alterar la señalización neurotóxica durante la isquemia sin incurrir en las consecuencias negativas de la pérdida de otras funciones de los NMDAR. El segundo componente del péptido quimérico es un péptido de internalización que representa una variante del péptido tat convencional fusionado a péptidos NMDAR 2B en el trabajo anterior.

El uso de un péptido tat variante se basa en parte en los resultados descritos en la presente solicitud de que un péptido tat convencional, concretamente cuando se une a un péptido NMDAR KLSSIESDV (SEQ ID NO: 12), se une a los canales de calcio de tipo N e inhibe su actividad. Los canales de calcio de tipo N localizados sobre los terminales nerviosos presinápticos regulan la liberación de neurotransmisores, incluyendo la de las terminaciones espinales de los nocioceptores aferentes primarios. Los efectos farmacológicos de la unión a los canales de tipo N han sido bien caracterizados en relación con el fármaco ziconotida (o Prialt, una forma sintética del precursor del péptido de caracol cono omega-conotoxina M-VII-A). La unión a canales de calcio de tipo N se ha asociado con numerosas actividades, algunas o todas los cuales pueden ser no deseables en pacientes con accidente cerebrovascular. Estas actividades incluyen analgesia mucho más fuerte que la inducida por la morfina, hipotensión, disminución de los niveles de conciencia, depresión, deterioro cognitivo, alucinación, elevación de los niveles de creatina quinasa, y retención de orina (véanse, p. ej., Brose et al., Clin J Pain 13: 256-259, (1997); Mathur et al., Semin Anesthesia Perioperative Med Pain 19: 67-75, 2000, Staats et al., JAMA 291: 63-70, 2004, McGuire et al., J Cardiovasc Pharmacol 30: 400-403, 1997. La clínica Mayo enumera los siguientes efectos secundarios observados después del tratamiento con Prialt, que es altamente selectivo para los canales de calcio de tipo N.

Tabla 1

Gravedad	Incidencia	Fenotipos
Grave	Común	Ver, escuchar o sentir cosas que no están allí; pensamientos de suicidio.
	Menos común	Dolor en el pecho; escalofríos; confusión; convulsiones; tos; orina de color oscuro; mareos; somnolencia; desmayos; ritmo cardíaco acelerado; fiebre; malestar general; vahídos leves; espasmos musculares o espasmos de todas las extremidades; rigidez muscular; respiración rápida y superficial; falta de aliento; estornudos; dolor de garganta; rigidez en el cuello o la espalda; opresión en el pecho; dificultad para respirar; dificultad para concentrarse; dificultad para dormir; cansancio o debilidad inusuales; sibilancias.

40

(continuación)

Gravedad	Incidencia	Fenotipos
	Sobredosis	Disminución de la conciencia o la capacidad de respuesta; somnolencia severa; temblores y andar inestable; temblor u otros problemas con el control o coordinación muscular; movimientos oculares incontrolados; inestabilidad.
Moderado	Común	Ardor; cambio en la marcha y el equilibrio; torpeza o inestabilidad; confusión; sensación de hormigueo; diarrea; mareos; tono muscular excesivo, tensión muscular u opresión; miedo; sensación de movimiento constante de uno mismo o de su entorno; fiebre; dolor de cabeza; picor; falta o pérdida de fuerza; vahídos leves; pérdida de apetito; náuseas; nerviosismo; entumecimiento; problemas con el lenguaje o el habla; sensación de movimiento; temblor; u otros problemas con el control o la coordinación muscular; movimientos oculares incontrolados; retención de orina; vómitos; pérdida de peso.
	Menos común	Acidez o malestar estomacal; dolor de espalda; (post)sabor malo, inusual o desagradable; eructos; dolor de vejiga; orina con sangre o turbia; hematomas; líquido cefalorraquídeo anormal; cambio de gusto; congestión; estreñimiento; timbre o zumbido continuado u otros ruidos inexplicables en los oídos; lloro; disminución de la conciencia o la capacidad de respuesta; deshidratación; despersonalización; depresión; dificultad, ardor o dolor al orinar; dificultad de movimiento; dificultad para ver de noche; visión doble; boca seca; piel seca; sequedad o dolor de garganta; disforia; euforia; desmayo; pulso cardiaco rápido o irregular; sensación de que los demás pueden escuchar sus pensamientos, le están observando, o pueden controlar su comportamiento; necesidad frecuente de orinar; pérdida de la audición; acidez gástrica; ronquera; hostilidad; mayor sensibilidad de los ojos a la luz del sol; aumento de la sensibilidad al dolor o al tacto; indigestión; pérdida de control de la vejiga; pérdida de memoria o problemas con la memoria; trastornos pulmonares; dolor de cuello; dolor nervioso; dolor en las articulaciones; piel pálida; latidos en los oídos; rapidez para reaccionar o reaccionar de forma exagerada emocionalmente; cambio rápido de humor; zonas de la piel enrojecidas, escamosas, hinchadas o desprendidas; enrojecimiento o dolor en la zona del catéter; goteo nasal; rigidez muscular severa; insomnio; pulso cardiaco lento o rápido; molestia, alteración o dolor de estómago; sudoración; hinchazón o enrojecimiento en las articulaciones; glándulas del cuello sensibles, hinchadas; dificultad para tragar; sangrado o magulladuras inusuales; cansancio o debilidad inusuales; cambios en la voz; calor en la piel; debilidad o pesadez en las piernas.

Los presentes péptidos quiméricos y peptidomiméticos han reducido o eliminado la unión a y la inhibición de los canales de calcio de tipo N en comparación con Tat-NR2B9c y por lo tanto evitan el gran número de efectos secundarios observados con los inhibidores altamente específicos del canal de calcio de tipo N, incluyendo los efectos secundarios psiquiátricos graves. La reducción en los efectos secundarios da como resultado un incremento del índice terapéutico para el tratamiento de seres humanos de los presentes péptidos quiméricos y peptidomiméticos con respecto a Tat-NR2B9c.

Los autores de la presente invención han encontrado adicionalmente que la unión a los canales de calcio de tipo N se puede evitar mediante el uso de variantes de la secuencia tat convencional. La combinación de una variante tat y un péptido activo basado en o que incluye el extremo C de NMDAR 2B u otro subtipo permite el tratamiento de los accidentes cerebrovasculares con efectos secundarios reducidos debido a la inhibición de los canales de calcio de tipo N.

III. Péptidos activos

5

15

20

Los péptidos activos útiles en la invención inhiben la interacción entre los dominios PDZ 1 y 2 de la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) (secuencia de aminoácidos humana proporcionada por Stathakism, Genomics 44 (1):71-82 (1997)) y la secuencia PL C-terminal de una o más subunidades del receptor 2 de NMDA incluyendo la subunidad NR2B del receptor de N-metil-D-aspartato neuronal (Mandich et al., Genomics 22, 216-8 (1994)). NMDAR2B tiene el ID GenBank 4099612, un FNGSSNGHVYEKLSSIESDV de 20 aminoácidos C-terminal (SEQ ID NO: 24) y un motivo ESDV de PL (SEC ID NO: 6). Los péptidos activos inhiben preferentemente las formas humanas de PSD-95 y los receptores de NMDAR humanos. Sin embargo, la inhibición también se puede mostrar a partir de variantes de especie de las proteínas. Una lista de los receptores de NMDA y de glutamato que se pueden utilizar aparece a continuación:

Tabla 2: Receptores de NMDA con secuencias PL

Nombre	Núm. GI o Acc	Secuencia C-terminal de 20 unidades	Secuencia C-terminal de 4 unidades	PL?	ID PL interna
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEC ID NO: 39)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEC ID NO: 39)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEC ID NO: 39)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEC ID NO: 39)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEC ID NO: 39)	X	AA216
NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:26)	HRES (SEC ID NO: 40)		
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:26)	HRES (SEC ID NO: 40)		
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISSLES EV (SEQ ID NO:27)	ESEV (SEC ID NO: 7)	X	AA 180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:24)	ESDV (SEC ID NO: 6)	X	AA34.1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEYQRTSRT CES (SEQ ID NO:28)	(ECT SEC ID NO: 41)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:24)	ESDV (SEC ID NO: 6)	X	
NMDAR2A	558748	LNSCSNRRVYKKMPSIE SDV (SEQ ID NO:29)	ESDV (<u>SEC ID</u> NO: 6)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGSAHFSSLE SEV (SEQ ID NO:30)	ESEV (SEC ID NO: 7)	Х	
Receptor de glutamato Delta 2	AF009014	QPTPTLGLNLGNDPDRGTSI (SEQ ID NO: 31)	GTSI (SEC ID NO: 42)	X	
Receptor de glutamato 1	128953	MQSIPCMSHSSGMPLGATGL (SEQ ID NO: 32)	ATGL (SEQ ID NO: 43)	Х	
Receptor de glutamato 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIESVKI (SEQ ID NO: 33)	SVKI (SEQ ID NO: 44)	X	
Receptor de	AF167332	QNYATYREGYNVYGTESVKI (SEQ	SVKI (SEQ ID NO: 44)	Х	

Nombre	Núm. GI o Acc	Secuencia C-terminal de 20 unidades	Secuencia C-terminal de 4 unidades	PL?	ID PL interna
glutamato 3		ID NO: 34)			
Receptor de glutamato 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASDLP (SEQ ID NO: 35)	PLSD (SEC ID NO: 45)		
Receptor de glutamato 5	U16125	SFTSILTCHQRRTQRKETVA (SEQ ID NO: 36)	ETVA (SEQ ID NO: 46)	X	
Receptor de glutamato 6	U16126	EVINMHTFNDRRLPGKETMA (SEQ ID NO: 37)	ETMA (SEQ ID NO: 47)	X	
Receptor de glutamato 7	U 16127	RRLPGKDSMACSTSLAPVFP (SEQ ID NO: 38)	PVFP (SEQ ID NO: 48)		-

La evidencia del papel de los diferentes subtipos de receptor de NMDA en la excitotoxicidad es proporcionada, por ejemplo, por Lynch, J. Pharm. Exp. Therapeutics 300, 717-723 (2002); Kemp, Nature Neurosci. suplemento, Vol. 5 (2002). Algunos péptidos activos inhiben las interacciones entre PSD-95 y múltiples subunidades de NMDAR. En tales casos, el uso del péptido no requiere necesariamente una comprensión de las contribuciones respectivas de los diferentes NMDAR a la excitotoxicidad. Otros péptidos activos son específicos para un solo NMDAR.

Los péptidos activos incluyen o se basan en un motivo PL del extremo C de cualquiera de las subunidades anteriores y tienen una secuencia de aminoácidos que comprende [S/T]-X-[V/L] (SEQ ID NO: 14). Esta secuencia aparece preferiblemente en el extremo C de los péptidos de la invención. Los péptidos preferidos tienen una secuencia de aminoácidos que comprende [E/D/N/Q] - [S/T] - [D/E/Q/N] - [V/L] (SEQ ID NO: 5) en su extremo C. Los péptidos ilustrativos comprenden: ESDV (SEQ ID NO: 6), ESEV (SEC ID NO:. 7), ETDV (SEQ ID NO: 8), ETEV (SEQ ID NO: 9), DTDV (SEQ ID NO: 10), y DTEV (SEC ID NO: 11) como aminoácidos C-terminales. Dos péptidos particularmente preferidos son KLSSIESDV (SEQ ID NO: 12), y KLSSIETDV (SEQ ID NO: 13). Los péptidos de la invención sin un péptido de internalización tienen por lo general 3-25 aminoácidos, longitudes de péptidos (también sin un péptido de internalización) de 5-10 aminoácidos, y particularmente se prefieren 9 aminoácidos. En algunos de tales péptidos activos, todos los aminoácidos son del extremo C de un receptor de NMDA.

Otros péptidos activos incluyen el dominio PDZ 1 y/o 2 de PSD-95 o un subfragmento de cualquiera de éstos que inhibe las interacciones entre PSD-95 y un receptor de NMDA, tal como NMDA 2B. Tales péptidos activos comprenden al menos 50, 60, 70, 80 o 90 aminoácidos del dominio PDZ 1 y/o del dominio PDZ 2 de PSD-95, que aparecen dentro de aproximadamente los aminoácidos 65-248 de PSD-95 proporcionado por Stathakism, Genomics 44(1):71-82 (1997) (Secuencia humana) o NP_031890.1, GI: 6681195 (secuencia de ratón) o las correspondientes regiones de otras variantes de especies.

III. Péptidos de internalización

10

15

20

25

30

35

40

Cualquiera de los péptidos activos de la invención puede estar conectado, preferiblemente en su extremo N, a un péptido de internalización que facilita la translocación a través de la membrana plasmática de una célula. Los péptidos de internalización comprenden una variante de una secuencia tat convencional YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1). Aunque la práctica de la invención no depende de la comprensión del mecanismo, se cree que tanto la capacidad de atravesar las membranas como la unión a los canales de calcio de tipo N son conferidas por la existencia inusualmente alta de residuos de carga positiva Y, R y K en el péptido. Los péptidos variantes para uso en la invención deben conservar la capacidad para facilitar la captación en las células, pero tienen una capacidad reducida para unirse a los canales de calcio de tipo N. Algunos péptidos de internalización adecuados comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), en la que X es un aminoácido distinto de Y (p. ej., cualquiera de los otros 19 aminoácidos naturales) o nada (en cuyo caso G es un residuo Nterminal libre). Una variante de tat preferida tiene el residuo Y N-terminal sustituido por F. De este modo, se prefiere una variante de tat que comprende o que consiste en FGRKKRRQRRR (SEC ID NO: 49). Otro péptido de internalización tat variante preferido consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 50). Si los residuos adicionales que flanquean XGRKKRRQRRR (SEC ID NO: 2) están presentes (al lado del péptido activo) los residuos pueden ser, por ejemplo, aminoácidos naturales que flanquean este segmento de una proteína tat, aminoácidos espaciadores o conectores de una clase utilizada típicamente para unir dos dominios de péptidos, p. ej., Gly (Ser)₄ (SEQ ID NO: 134), TGEKP (SEQ ID NO: 51), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 52), o LRQRDGERP (SEQ ID NO: 53) (véanse, p. ej., Tang et al. (1996), J. Biol., Chem. 271, 15682-15686; Hennecke et al. (1998), Protein Eng. 11, 405-410)), o puede ser cualquier otro aminoácido que no reduzca de forma detectable la capacidad de conferir la absorción de la

variante sin los residuos flanqueantes y no aumente significativamente la inhibición los canales de calcio de tipo N con respecto a la variante sin los residuos flanqueantes. Preferiblemente, el número de aminoácidos flanqueantes distintos de un péptido activo no excede de diez a cada lado de XGRKKRRQRRR (SEC ID NO: 2). Preferiblemente, están presente aminoácidos no flanqueantes, y el péptido de internalización está ligado en su extremo C directamente a un péptido activo.

5

10

15

20

Otros péptidos de internalización de la invención que se pueden utilizar para permitir la absorción de cualquiera de los péptidos activos de la invención para la inhibición de las interacciones con PSD-95 sin inhibir los canales de calcio de tipo N incluyen los presentados en la siguiente Tabla 3. Se recomienda escrutar estos péptidos de internalización para confirmar la absorción deseada y la falta de inhibición de los canales de calcio de tipo N, como se describe en los Ejemplos.

Los datos presentados en los ejemplos demuestran que la mutación del residuo de tirosina N-terminal (Y) de Tat-NR2B9c a fenilalanina (F) es suficiente para anular la inhibición del canal de calcio de tipo N sin reducir la capacidad del resto del péptido para localizar el sitio de acción de este fármaco en el cerebro y reducir el daño después del accidente cerebrovascular inducido en modelos animales de isquemia permanente. Adicionalmente, los experimentos demuestran que TAT solo (YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1)) es suficiente para inducir la inhibición observada del canal de calcio de tipo N, y que los diferentes péptidos añadidos al extremo C tienen solo un efecto leve sobre la inhibición cuando están anclados a Tat. Por lo tanto, es probable que el cambio o la eliminación de la tirosina en el extremo N de la secuencia de Tat sean importantes para la reducción de la unión. La mutación de residuos de aminoácidos alcalinos próximos a esta tirosina también puede dar como resultado una reducción de la unión a y la inhibición de los canales de calcio de tipo N. En la presente memoria se pronostica que las secuencias ilustrativas de la siguiente tabla mantienen la capacidad de transporte sin inhibir los canales de calcio de tipo N y de este modo permiten un mayor índice terapéutico para el tratamiento del accidente cerebrovascular o el trauma neurológico.

Tabla 3

X-FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (F-TatNR2B9c)	SEQ ID NOS: 19, 77, 78, 79
X-GKKKKKQKKKKLSSIESDV	SEC ID NO: 54, 80, 81, 82
X-RKKRRQRRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 55, 83, 84, 85
X-GAKKRRQRRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 56, 86, 87, 88
X-AKKRRQRRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 57, 89, 90, 91
X-GRKARRQRRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 58, 92, 93, 94
X-RKARRQRRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 59, 95, 96, 97
X-GRKKARQRRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 60, 98, 99, 100
X-RKKARQRRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 61, 101, 102, 103
X-GRKKRRQARRKLSSIESDV	SEC ID NO: 62, 104, 105, 106
X-RKKRRQARRKLSSIESDV	SEC ID NO: 63, 107, 108, 109
X-GRKKRRQRARKLSSIESDV	SEC ID NO: 64, 110, 111, 112
X-RKKRRQRARKLSSIESDV	SEC ID NO: 65, 113, 114, 115
X-RRPRRPRRPRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 66, 116, 117, 118
X-RRARRARRKLSSIESDV	SEC ID NO: 67, 119, 120, 121
X-RRARRARRKLSSIESDV	SEC ID NO: 68, 122, 123, 124

X-RRPRRPRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 69, 125, 126, 127
X-RRPRRPRRKLSSIESDV	SEC ID NO: 70, 128, 129, 130
X-RRARRARKLSSIESDV	SEC ID NO: 71, 131, 132, 133

X puede representar un extremo amino libre, una molécula de biotina u otro radical de protección terminal incluyendo, pero no limitado a, H, acetilo, benzoilo, grupo alquilo (alifático), piroglutamato, grupo alquilo con un grupo cicloalquilo en el extremo, biotina con espaciador de alquilo, (5,6)-FAM. El acoplamiento químico del grupo de protección terminal al péptido N-terminal puede ser por medio de la química de amidas, la química de sulfamidas, la química de alquilación. Además, X también puede ser un aminoácido distinto de tirosina.

Los péptidos de internalización están conectados normalmente a péptidos activos como péptidos de fusión, pero también pueden estar unidos por un enlace químico. El acoplamiento de los dos constituyentes se puede realizar a través de un agente de acoplamiento o conjugación. Se encuentran disponibles en el mercado multitud de tales agentes y son revisados por S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991). Algunos ejemplos de los reactivos de entrecruzamiento incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenilen)bismaleimida; N,N'-etilen-bis-(yodoacetamida) u otro de tales reactivos que tiene puentes de metileno de 6 a 11 carbonos (que son relativamente específicos para los grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno (que forma enlaces irreversibles con grupos amino y tirosina). Otros reactivos de entrecruzamiento incluyen p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona (que forma entrecruzamiento irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimidato de dimetilo (que es específico para grupos amino); cloruro de fenol-1,4-disulfonilo (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobenzidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

- Péptidos tales como los que se acaban de describir pueden ser derivatizados opcionalmente (p. ej., acetilados, fosforilados y/o glicosilados) para mejorar la afinidad de unión del inhibidor, para mejorar la capacidad del inhibidor para ser transportados a través de una membrana celular o para mejorar la estabilidad. Como ejemplo específico, para los inhibidores en los que el tercer residuo desde el extremo C es S o T, este residuo puede ser fosforilado antes del uso del péptido.
- Los péptidos de la invención, opcionalmente fusionados a los dominios de internalización, se pueden sintetizar mediante síntesis en fase sólida o métodos recombinantes. Los peptidomiméticos pueden ser sintetizados utilizando una variedad de procedimientos y metodologías descritos en la bibliografía científica y de patentes, p. ej., Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9:205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:114-119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267:220-234.

V Canales de calcio de tipo N

5

10

15

35

Los canales de calcio de tipo N son complejos hetero-oligoméricos que consisten en subunidades α_{1B} (Cav2.2), β -, y $\alpha_{2\delta}$ y a veces subunidades γ . La subunidad α_{1B} forma el canal principal y está codificada por un solo gen. Existen cuatro genes de subunidades $\alpha_2\delta$ ($\alpha_{2\delta}$ -1- $\alpha_2\delta$ -4) (Snutch et al., Molecular properties of voltage-gated calcium channels. En: Voltage-gated calcium (Zamponi G, ed), págs. 61-94. Nueva York: Landes Bioscience, 2005. Catterall, Biochemical Studies of Ca2+ Channels. En: Voltage-Gated Calcium (Zamponi G, ed), págs. 48-60. Nueva York: Landes Bioscience, 2005). Existe una estrecha conservación de los canales de calcio de tipo N a través de especies. Por lo tanto se pueden escrutar las variantes de tat para determinar la carencia de unión utilizando canales de calcio de tipo N de seres humanos o de otras especies, tales como ratas.

40 La subunidad α_{1B} del canal de calcio de tipo N es descrita por Williams et al., 1992 (Science 257 (5068), 389-395 (1992), Núm. Acc. Genbank Q00975 Especie: Homo Sapiens) y Coppola et al., 1994 (FEBS Lett. 338 (1), 1-5 (1994), Núm. Acc. Genbank 055017, Especie: Mus Musculus) y Dubel et al., 1992 (Proc. Natl. Acad. Sci. US.A. 89 (11), 5058-5062 (1992) Núm. Acc. Genbank Q02294, Especie: Rattus norvegicus), que incluyen variantes de empalme y fragmentos de las mismas que tienen una actividad de los canales de calcio similar a la proteína intacta es preferida para el escrutinio. También se pueden utilizar Las variantes alélicas y las variantes de especie que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias anteriores. Opcionalmente, la subunidad α_{1B} se puede utilizar combinada con una subunidad alfa2(AE)/delta, beta1-4, y/o gamma.

VI. Métodos de escrutinio

10

45

50

55

1. Medición de la unión a canales de calcio de tipo N

Se pueden escrutar los péptidos de internalización para determinar la unión a canales de calcio de tipo N por medio de un análisis de unión competitiva utilizando un péptido marcado que sabe que se une a tales canales (p. ej., ziconotida). El canal de calcio de tipo N se puede proporcionar en una forma purificada o expresado naturalmente o recombinantemente a partir de células. Si se proporciona en forma purificada, el canal de calcio de tipo N se puede inmovilizar sobre cuentas o en un pocillo de microtitulación. La cantidad de marca unida al canal de calcio después de la incubación con el péptido marcado y el péptido de internalización a prueba es inversamente proporcional a la capacidad del péptido de internalización a prueba para unirse al canal de calcio. El análisis se puede realizar sobre una base de alto rendimiento en los pocillos de una placa de microtitulación. También se pueden incluir controles positivos y negativos. Un control negativo puede ser un vehículo. Un control positivo puede ser una forma no marcada del péptido que se sabe que se une a los canales de calcio de tipo N. Preferiblemente un péptido de internalización tiene una Kd mayor de 10 nM, preferiblemente mayor de 100 nM para un canal de calcio de tipo N.

2. Medición de la inhibición de los canales de calcio de tipo N

15 Los péptidos de internalización y los agentes quiméricos que comprenden un péptido de internalización conectado a un agente activo, tal como un péptido activo se pueden escrutar para determinar su capacidad para inhibir las corrientes iónicas mediadas por los canales de calcio de tipo N. La inhibición significa una reducción estadísticamente significativa en la corriente iónica medida transportada por los canales de calcio de tipo N. Esta reducción debe ser mayor que una reducción de 20% de la corriente medida, preferiblemente una reducción mayor de 30%, y más preferiblemente de reducción mayor de 40%. La inhibición se puede determinar llevando a cabo 20 registros de pinzamiento zonal de células completas en las neuronas ganglionares de la raíz dorsal, en donde se expresan las corrientes de calcio de tipo N. Los cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRG) se prepararon a partir de ratones Swiss a los 13-14 días de gestación. En resumen, los DRG se diseccionaron y se sometieron a digestión con tripsina durante 20 min a 37°C, se disociaron mecánicamente y se cultivaron en placa sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina. Se hiceron crecer en MEM libre de suero (Neurobasal MEM, B-27 - Gibco Invitrogen 25 Corporation, Carlsbad, CA). Después de 3-5 días, se añadió una solución FUDR 10 µM para inhibir la proliferación alial. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ humidificada y se alimentaron dos veces por semana. El registro de células completas se llevó a cabo a la temperatura ambiente 10-14 días después del cultivo en placa. Registros Electrofisiológicos: Se llevan a cabo registros de células completas con un amplificador 30 Axopatch-1B (Axon Instruments, Foster City, CA) en el modo de fijación de voltaje. Los electrodos de registro, con resistencias de 3-5 $M\Omega$, se construyen a partir de vidrio de borosilicato de paredes delgadas (1,5 mm de diámetro; World Precision Instruments, Sarasota, FL) utilizando un extractor de dos etapas (PP83; Narishige, Tokio, Japón). Los datos se digitalizan, se filtran (2 kHz) y, se adquieren en línea a través de los programas de ordenador pClamp 9 (Axon Instruments). Las pipetas se cargan con una disolución que contiene (mM): CsCl 110, MgCl2 3, EGTA 10, HEPES 10, MgATP 3, GTP 0,6. El pH se ajusta a 7,2 con CsOH. La disolución de baño contiene (mM): CaCl2 1, 35 BaCl2 10, HEPES 10, TEA-Cl 160, Glucosa 10, TTX 0,0002 a pH (NaOH) 7,4. Se inducen corrientes de células completas utilizando pulsos despolarizantes de 40 ms a +20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV, aplicados cada 15 s. Para someter a ensayo la inhibición dependiente del uso, se inducen corrientes utilizando pulsos despolarizantes de 10 ms a +20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV, aplicados cada 40 0,02 s (50 Hz), 0,05 s (20 Hz), 0,1 (10 Hz) o 15 s (0,07 Hz), respectivamente.

3. Medición de la actividad de internalización

Las variantes del péptido de internalización tat se pueden someter a ensayo para determina la actividad de transporte en un animal. Los péptidos de internalización se pueden someter a ensayo solos o cuando están ligados a un agente activo, tal como un péptido activo, por ejemplo, KLSSIESDV (SEQ ID NO: 12). El péptido de internalización, opcionalmente unido a un agente activo, tal como un péptido, se marca, preferiblemente con una marca fluorescente, tal como cloruro de dansilo. A continuación el péptido de internalización se inyecta periféricamente en un animal, tal como un ratón. Es adecuada la inyección intraperitoneal o intravenosa, por ejemplo. Aproximadamente una hora después de la inyección, los ratones se sacrifican, se perfunden con solución de fijación (paraformaldehído al 3%, glutaraldehído al 0,25%, sacarosa al 10%, 10 U/ml de heparina en solución salina). A continuación se retiran los cerebros, se congelan y se seccionan. Las secciones se analizaron para determinar la fluorescencia utilizando un microscopio confocal. La actividad de internalización se determina a partir de la fluorescencia, opcionalmente con respecto a controles positivos y negativos. Un control positivo adecuado es el péptido tat patrón conectado al mismo péptido activo (si estuviera presente) que el péptido de internalización a prueba. Un control negativo adecuado es un péptido activo marcado fluorescentemente que no está unido a un péptido de internalización. También se puede utilizar como control negativo un vehículo no marcado.

Se pueden llevar a cabo experimentos similares en cultivos de células para someter a ensayo las variantes de tat (véase el documento US20030050243). Un péptido tat variante marcado con fluorescencia, opcionalmente unido a un péptido activo se aplica a un cultivo de neuronas corticales. Se determina la absorción utilizando microscopía de fluorescencia durante varios minutos después de la aplicación. Se puede determinar el aumento de absorción con

respecto a los controles positivos y negativos como se describe para los experimentos sobre la absorción en animales.

4. Medición de la actividad en el tratamiento del accidente cerebrovascular

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Se puede someter a ensayo la actividad de los péptidos quiméricos que comprenden un péptido de internalización unido a un péptido activo (o un peptidomimético de semejante péptido quimérico) en diferentes modelos animales de accidente cerebrovascular. En uno de tales modelos, ratas macho adultas Sprague-Dawley se someten a la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (MCAO) durante 90 minutos mediante el método de sutura intraluminal (36,37). Los animales se mantienen en ayunas durante la noche y se les invecta sulfato de atropina (0,5 mg/kg IP). Después de 10 minutos se induce la anestesia. Las ratas se intuban oralmente, se someten a ventilación mecánica, y se paralizan con el bromuro de pancuronio (0,6 mg/kg IV). La temperatura corporal se mantiene a 36,5-37,5°C con una lámpara de calentamiento. Se utilizan catéteres de polietileno en la arteria y la vena femoral para registrar continuamente la presión arterial y para tomar muestras de sangre para las mediciones de gases y pH. La MCAO transitoria se logra durante 90 min mediante la introducción de una sutura de nylon de monofilamento 3-0 recubierta con poli-L-lisina (Harvard Apparatus) en el círculo de Willis a través de la arteria carótida interna, ocluyendo de manera eficaz la arteria cerebral media. Esto produce un infarto extenso que abarca la corteza cerebral y los ganglios basales. Los animales se tratan o bien con un péptido quimérico a prueba o bien con un control negativo o positivo. El tratamiento puede ser antes o hasta una hora después de la inducción de la isquemia. Un control negativo puede ser vehículo. Un control positivo puede ser el péptido Tat-NR2B9c, YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 17), que se había demostrado previamente que era eficaz. El péptido quimérico se libera por medio de una sola invección intravenosa de bolo 45 min antes de la MCAO (3 nmoles/q). Después de la administración de los compuestos a los animales, se determinan el volumen de infarto y/o el índice de discapacidad. Los volúmenes de infarto se determinan por lo general 24 horas después del tratamiento, pero se pueden determinar en un momento posterior, tal como 3,7,14 o 60 días. El índice de discapacidad se puede controlar a través del tiempo, p. ej., a las 2 horas después del tratamiento, 24 horas después del tratamiento, una semana y un mes después del tratamiento. Los péptidos quiméricos que muestran una reducción estadísticamente significativa en el volumen de infarto y/o el índice de discapacidad con respecto a los animales de control no tratados con los compuestos se identifican por tener una actividad útil para poner en práctica los métodos de la invención.

Se pueden realizar experimentos similares en animales sometidos a isquemia permanente. La isquemia permanente del vaso de la pía madre de la arteria cerebral media se puede llevar a cabo como describen Forder et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 288: H-1989 H 1996 (2005). En resumen, se canula la ECA derecha con tubo de polietileno PE 10. El cráneo se expone a través de una incisión en la línea media, y se realiza una ventana craneal de 6 a 8 mm sobre la corteza somatosensorial derecha (2 mm caudal y 5 mm lateral al bregma). Las arterias de la pia madre se visualizan mediante la inyección de bolos pequeños (10-20 µl) del colorante vital azul violeta patente (10 mmol/l, Sigma) en solución salina normal, en la ECA. Las mismas tres ramas de la MCA arteriolares de la pia madre se cauterizan eléctricamente y las inyecciones de colorante se repiten para asegurar la interrupción del flujo a través de las arteriolas cauterizadas. A continuación se cierra la incisión y el animal se devuelve a su jaula y se le deja acceso libre a alimento y agua. Este modelo de isquemia permanente produce un pequeño infarto altamente reproducible limitado a la corteza subyacente en las arterias de la pia madre terminales coaguladas.

La arteria cerebral media izquierda puede ser ocluida por medio del método de sutura intraluminal descrito por Longa, Stroke 20, 84-91 (1989). En resumen, la arteria carótida común izquierda (CCA) se expone a través de una incisión de la línea media del cuello y se diseca sin de los nervios circundantes y la fascia, desde su bifurcación a la base del cráneo. Las ramas de la arteria occipital de la arteria carótida externa (ECA) se aislan a continuación, y estas ramas se disecan y se coagulan. La ECA se diseca adicionalmente de manera distal y se coagula junto con las ramas de las arterias lingual terminal y maxilar, que después se dividen. La arteria carótida interna (ICA) se aísla y separa del nervio vago adyacente, y la arteria pterigopalatina se liga cerca a su origen. Se redondea la punta de una longitud de 4 cm de una sutura de nylon de monofilamento 3-0 (Harvard Apparatus) quemándola para lograr un diámetro de la punta de 0,33-0,36 mm y una longitud de la punta de 0,5-0,6 mm y se recubre con poli-L-lisina (Belayev et al., 1996). La sutura se introduce a través de la CCA y se hace avanzar dentro de la ICA y de allí al círculo de Willis (aproximadamente 18-20mm desde la bifurcación de la carótida), ocluyendo eficazmente la arteria cerebral media. La sutura de seda en torno a la CCA se ajusta alrededor de la sutura de nailon intraluminal para asegurarla y ocluir de forma permanente la arteria cerebral media.

5. Escrutinio basado en células de péptidos activos

Opcionalmente, los péptidos activos o los peptidomiméticos de los mismos también se pueden escrutar para determinar la capacidad de inhibir las interacciones entre PSD-95 y NMDAR 2B utilizando los análisis descritos, por ejemplo, en el documento US 20050059597. Los péptidos útiles típicamente tienen valores de CI50 de menos de 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 0,1 μ M o 0,01 μ M en semejante análisis. Los péptidos preferidos tienen típicamente un valor de CI50 entre 0,001-1 μ M, y más preferiblemente 0,05-0,5 o 0,05 a 0,1 mM.

VI. Accidente cerebrovascular y afecciones relacionadas

Un accidente cerebrovascular es una afección resultante del deterioro del flujo sanguíneo en el SNC sin importar la causa. Las causas potenciales incluyen embolia, hemorragia y trombosis. Algunas células neuronales mueren inmediatamente como resultado del deterioro del flujo sanguíneo. Estas células liberan sus moléculas componentes incluyendo el glutamato, que a su vez activa los receptores de NMDA, que elevan los niveles de calcio intracelulares, y los niveles de enzimas intracelulares que conducen a una mayor muerte celular neuronal (cascada de la excitotoxicidad). La muerte de tejido del SNC se conoce como infarto. El volumen del infarto (es decir, el volumen de células neuronales muertas resultantes de accidentes cerebrovasculares en el cerebro) se puede utilizar como un indicador de la magnitud de los daños patológicos que resultan de un accidente cerebrovascular. El efecto sintomático depende tanto del volumen del infarto como de en qué lugar del cerebro está localizado. El índice de discapacidad se puede utilizar como una medida del daño sintomático, tal como la escala de valoración de accidentes cerebrovasculares de Rankin (Rankin, Scott J Med; 2:200-15 (1957)) y el índice de Barthel. La escala de Rankin se basa en la evaluación directa de las condiciones globales de un paciente de la siguiente manera.

Tabla 4

0	No hay síntomas en absoluto				
1	Sin discapacidad significativa a pesar de los síntomas; capaz de llevar a cabo todas las tareas y actividades habituales.				
2	Ligera discapacidad; incapaz de llevar a cabo todas las actividades anteriores, pero capaz de cuidar de sí mismo sin ayuda.				
3	Discapacidad moderada que requiere un poco de ayuda, pero capaz de caminar sin ayuda				
4	Discapacidad de moderada a grave, no puede caminar sin ayuda y no puede atender sus propias necesidades corporales sin ayuda.				
5	Discapacidad severa; postrado en cama, incontinencia, y requieren cuidados de enfermería y atención constantes.				

El Índice de Barthel se basa en una serie de preguntas acerca de la capacidad del paciente para llevar a cabo 10 actividades básicas de la vida diaria que da como resultado una puntuación entre 0 y 100, indicando una puntuación menor una mayor discapacidad (Mahoney et al., Maryland State Medical Journal 14:56-61 (1965)).

Alternativamente la gravedad/consecuencias del accidente cerebrovascular se pueden medir mediante la escala de accidentes cerebrovasulares NIH, disponible en la red ninds.nih.gov web/doctors/NIH Stroke Scale Booklet.pdf.

La escala se basa en la capacidad de un paciente para llevar a cabo 11 grupos de funciones que incluyen evaluaciones del nivel de conciencia, las funciones motoras, sensoriales y de lenguaje del paciente.

Un accidente cerebrovascular isquémico se refiere más específicamente a un tipo de accidente cerebrovascular que está causado por el bloqueo del flujo de sangre al cerebro. La afección subyacente de este tipo de bloqueo es muy comúnmente el desarrollo de depósitos grasos que recubren las paredes de los vasos. Esta afección se denomina aterosclerosis. Estos depósitos grasos pueden causar dos tipos de obstrucción. La trombosis cerebral hace referencia a un trombo (coágulo de sangre) que se desarrolla en la parte obstruida del vaso. "Embolia cerebral" hace referencia generalmente a un coágulo de sangre que se forma en otro lugar en el sistema circulatorio, por lo general el corazón y las arterias grandes de la parte superior del pecho y cuello. Una porción del coágulo de sangre se suelta a continuación, entra en el torrente sanguíneo y viaja a través de los vasos sanguíneos del cerebro hasta que llega a vasos demasiado pequeños como para dejarlo pasar. Una segunda causa importante de la embolia es un latido irregular del corazón, conocido como fibrilación arterial. Esto crea condiciones en las que se pueden formar coágulos en el corazón, desprender y viajar hasta el cerebro. Las causas potenciales adicionales del accidente cerebrovascular isquémico son hemorragia, trombosis, disección de una arteria o una vena, paro cardíaco, choque de cualquier causa, incluyendo hemorragia y causas iatrogénicas tales como lesión quirúrgica directa a los vasos sanguíneos del cerebro o vasos que van al cerebro o cirugía cardiaca. El accidente cerebrovascular isquémico representa aproximadamente 83% de todos los casos de accidente cerebrovascular.

Los ataques isquémicos transitorios (TIA) son accidentes cerebrovasculares menores o de advertencia. En un TIA, las condiciones indicativas de un accidente cerebrovascular isquémico están presentes y se desarrollan los signos de advertencia típicos del accidente cerebrovascular. Sin embargo, la obstrucción (coágulo de sangre) se produce durante un período de tiempo corto y tiende a resolverse por sí misma a través de los mecanismos normales.

40

5

10

15

20

25

30

35

El accidente cerebrovascular hemorrágico representa aproximadamente 17% de los casos de accidente cerebrovascular. Éste es el resultado de un vaso debilitado que se rompe y sangra en el cerebro circundante. La sangre se acumula y comprime el tejido cerebral circundante. Los dos tipos generales de accidentes cerebrovasculares hemorrágicos son la hemorragia intracerebral y la hemorragia subaracnoidea. El accidente cerebrovascular hemorrágico es el resultado de la rotura de un vaso sanguíneo debilitado que se rompe. Las posibles causas de la ruptura de un vaso sanguíneo debilitado incluyen una hemorragia hipertensiva, en la que la presión arterial alta causa una ruptura de un vaso sanguíneo u otra causa subyacente de los vasos sanguíneos debilitados, como una malformación vascular cerebral rota incluyendo un aneurisma cerebral, una malformación arteriovenosa (AVM) o una malformación cavernosa. Los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos también pueden surgir de una transformación hemorrágica de un accidente cerebrovascular isquémico que debilita los vasos sanguíneos en el infarto, o una hemorragia a partir de tumores primarios o metastáticos en el SNC que contienen vasos sanguíneos anormalmente débiles. El accidente cerebrovascular hemorrágico también puede deberse a causas iatrogénicas tales como lesión quirúrgica directa en un vaso sanguíneo del cerebro. Un aneurisma es una dilatación de una zona debilitada de un vaso sanguíneo. Si se deja sin tratar, el aneurisma continúa debilitándose hasta que se rompe y sangra dentro del cerebro. Una malformación arteriovenosa (AVM) es una agrupación de vasos sanguíneos formados anormalmente. Una malformación cavernosa es una anomalía venosa que puede causar una hemorragia de las estructuras venosas debilitadas. Cualquiera de estos vasos puede romperse, causando también una hemorragia en el cerebro. El accidente cerebrovascular hemorrágico puede también resultar de un trauma físico. El accidente cerebrovascular hemorrágico en una parte del cerebro puede provocar un accidente cerebrovascular isquémico en otra a través la escasez de sangre perdida en el accidente cerebrovascular hemorrágico.

Otros varios afecciones neurológicas también pueden causar la muerte neurológica a través de la excitotoxicidad mediada por NDMAR. Estas afecciones incluyen epilepsia, hipoxia, lesión traumática en el sistema nervioso central no asociada con accidente cerebrovascular tal como lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

VII. Métodos de tratamiento

10

15

20

25

30

45

50

60

Los péptidos quiméricos descritos anteriormente o los peptidomiméticos de los mismos se utilizan para tratar a los pacientes con accidente cerebrovascular. El tratamiento se inicia tan pronto como sea posible después del inicio del accidente cerebrovascular. En ocasiones, el tratamiento se puede iniciar en o antes de la aparición del accidente cerebrovascular en pacientes que se sabe que están en alto riesgo. Los factores de riesgo incluyen hipertensión, diabetes, antecedentes familiares, tabaquismo, accidente cerebrovascular previo, y cirugía. Por lo general, el tratamiento se administra primero en el plazo de una a 24 horas después del inicio del accidente cerebrovascular. A menudo, es suficiente una dosis única de péptido quimérico de la invención. Sin embargo, también se pueden administrar múltiples dosis a intervalos de 6-24 horas o mayores.

El uso de péptidos variantes de tat que tienen capacidad reducida para unirse a e inhibir los canales de calcio de tipo N es particularmente útil en pacientes que tienen una susceptibilidad por encima de la normal a los efectos secundarios resultantes de la unión a estos canales. Estos incluyen pacientes que tienen una presión arterial normal (sistólica 120-129 mm Hg y diastólica de 80-84 mm Hg) o por debajo de la normal. La presión arterial por debajo de la normal se puede producir como resultado de la pérdida de sangre contemporáneamente al insulto al SNC (por ejemplo, en un paciente que sufre una lesión traumática en un accidente de coche, o en un paciente que incurre en pérdida de sangre a causa de una caída después del accidente cerebrovascular).

La respuesta del paciente a la administración de un péptido quimérico o peptidomimético de la invención se puede controlar mediante la determinación de volumen del infarto antes y en diferentes momentos después del tratamiento. La isquemia temprana es detectable utilizando la formación de imágenes por difusión de MRI. Las combinaciones de protocolos de MRI, incluyendo imágenes de perfusión, se pueden utilizar para determinar el tejido en riesgo y predecir el volumen del infarto. Los métodos logran preferiblemente una reducción en el volumen de infarto de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 50% con respecto al volumen medio del infarto en una población de pacientes comparables que no reciben tratamiento mediante los métodos de la invención. La respuesta del paciente también se puede medir a partir del índice de discapacidad determinado un día a una semana después del inicio del tratamiento. El paciente muestra preferiblemente una mejora (es decir, menos discapacidad) en índice de discapacidad de al menos 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 50% con respecto al índice de discapacidad medio en una población de pacientes comparables que no reciben tratamiento mediante los métodos de la invención. El paciente preferiblemente puntúa cero o uno en el índice de accidente cerebrovascular de Rankin o más de 75 en el índice de Barthel

VIII. Composiciones farmacéuticas, dosis y rutas de administración

Los péptidos quiméricos o peptidomiméticos de la invención se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se fabrican bajo condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en una forma de dosificación unitaria (es decir, la dosificación para una única administración) que contiene cualquiera de las dosificaciones indicadas anteriormente. Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar por medio de procedimientos de mezcla, disolución, granulación, elaboración de

grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. En particular, los péptidos quiméricos o peptidomiméticos liofilizados de la invención se pueden utilizar en las formulaciones y composiciones que se describen a continuación.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o coadyuvantes fisiológicamente aceptables que faciliten el procesamiento de los péptidos quiméricos o peptidomiméticos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la ruta de administración seleccionada.

La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. Se prefiere la administración intravenosa.

- Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral son preferiblemente estériles y sustancialmente isotónicas. Para los inyectables, los péptidos quiméricos se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o solución salina fisiológica o tampón de acetato (para reducir las molestias en el lugar de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.
- Alternativamente, los péptidos quiméricos o peptidomiméticos pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Para la administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se vaya a traspasar. Esta ruta de administración puede ser utilizada para suministrar los compuestos en la cavidad nasal o para la administración sublingual.

Para la administración oral, los péptidos quiméricos o peptidomiméticos se pueden formular con portadores 20 farmacéuticamente aceptables tales como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente que se vaya a tratar. Para las formulaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, 25 hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, o ácido algínico o una sal de los mismos tal como alginato de sodio. Si se desea, las formas de dosificación sólidas pueden ser recubiertas con azúcar o ser recubiertas con recubrimiento entérico utilizando 30 técnicas convencionales. Para las preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los portadores, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes. Adicionalmente, se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares.

Además de las formulaciones descritas previamente, los péptidos quiméricos o peptidomiméticos también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados poco solubles, por ejemplo, una sal poco soluble.

35

40

45

50

55

Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de liberación farmacéutica. Los liposomas y las emulsiones se pueden utilizar para liberar los péptidos quiméricos. También se pueden emplear ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque normalmente a costa de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos se pueden suministrar utilizando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico.

Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los péptidos quiméricos durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Como los péptidos quiméricos o peptidomiméticos de la invención pueden contener cadenas laterales o extremos cargados, estos se pueden incluir en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente en forma de ácidos o bases libres o en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son aquellas sales que conservan sustancialmente la actividad biológica de las bases libres y que se preparan por reacción con ácidos inorgánicos. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de base libre.

Los péptidos quiméricos o peptidomiméticos se utilizan en una cantidad eficaz para conseguir el objetivo pretendido (p. ej., reducción de efecto del daño del accidente cerebrovascular perjudicial y afecciones relacionadas). Una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de péptido quimérico o peptidomimético suficiente para reducir significativamente el daño resultante del accidente cerebrovascular en una población de pacientes (o modelos animales) tratados con los péptidos quiméricos o peptidomiméticos de la invención con respecto al daño en

una población de control de pacientes con accidente cerebrovascular (o modelos animales) no tratados con los péptidos quiméricos o peptidomiméticos de la invención. La cantidad también se considera terapéuticamente eficaz si un paciente tratado individualmente logra un resultado más favorable que el resultado medio (determinado por el volumen de infarto o índice de discapacidad) en una población de control de pacientes comparables no tratados mediante los métodos de la invención. La cantidad también se considera terapéuticamente eficaz si un paciente tratado individualmente muestra una discapacidad de dos o menos en la escala de Rankin y 75 o más en la escala de Barthel. Una dosificación también se considera terapéuticamente eficaz si una población de pacientes tratados muestra una distribución significativamente mejorada (es decir, menor discapacidad) de las puntuaciones en una escala de discapacidad de una población comparable no tratada, véase Lees et al 1, N Engl J Med 2006; 354:588-600. Un régimen terapéuticamente eficaz significa una combinación de una dosis terapéuticamente eficaz y una frecuencia de administración necesarias para conseguir el objetivo pretendido como se ha descrito anteriormente. Por lo general, es suficiente una sola administración.

Los intervalos de dosificación preferidos incluyen de 0,001 a 20 µmol de péptido quimérico o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente, opcionalmente de 0,03 a 3 mol péptido quimérico por kg de peso corporal del paciente con respecto a los µmol de péptido quimérico por kg de peso corporal del paciente en el plazo de 6 horas desde el accidente cerebrovascular. En algunos métodos, se administran 0,1-20 µmol de péptido quimérico o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente en el plazo de 6 horas. En algunos métodos, se administran 0,1-10 µmol de péptido quimérico o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente en el plazo de 6 horas, más preferiblemente aproximadamente 0,3 µmol de péptido quimérico por kg de peso corporal del paciente en el plazo de 6 horas. En otros casos, el intervalo de dosificación es de 0,005 a 0,5 µmol de péptido quimérico o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente. La dosificación por kg de peso corporal se puede convertir de ratas a seres humanos mediante la división por 6,2 para compensar las diferentes proporciones de área de superficie con respecto a masa. Las dosificaciones se pueden convertir de unidades de moles a gramos multiplicando por el peso molar de un péptido quimérico o peptidomimético. Las dosificaciones adecuadas de los péptidos quiméricos o peptidomiméticos para su uso en seres humanos pueden incluir de 0,001 a 5 mg/kg de peso corporal del paciente, o más preferiblemente de 0,005 a 1 mg/kg de peso corporal del paciente o de 0,05 a 1 mg/kg, o de 0,09 a 0,9 mg/kg. En peso absoluto para un paciente de 75 kg, estas dosificaciones se traducen en 0,075 a 375 mg, 0,375 a 75 mg o 3,75 mg a 75 mg o 6,7 a 67 mg. Redondeando para abarcar variaciones, p. ej., en el peso del paciente, la dosificación se encuentra por lo general entre 0,05 y 500 mg, preferiblemente de 0,1 a 100 mg, de 0,5 a 50 mg, o 1-

La cantidad de péptido quimérico o peptidomiméticos administrado depende del sujeto a tratar, del peso del sujeto, la gravedad de la aflicción, el modo de administración y el juicio del médico que prescribe. La terapia se puede repetir intermitentemente mientras los síntomas son detectables o incluso cuando no son detectables. La terapia se puede proporcionar sola o combinada con otros fármacos.

La dosis terapéuticamente eficaz de los presentes péptidos quiméricos o peptidomiméticos puede proporcionar un beneficio terapéutico sin causar toxicidad sustancial. La toxicidad de los péptidos quiméricos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., mediante la determinación de la DL₅₀ (dosis letal para 50% de la población) o la DL₁₀₀ (dosis letal para 100% de la población). La razón de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Se prefieren los péptidos quiméricos o peptidomiméticos que exhiben altos índices terapéuticos (véase, p. ej., Fingl et al., 1975, En: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Cap. 1, pág. 1).

IX. Métodos de escrutinio

10

15

20

25

30

45

50

55

60

La invención proporciona adicionalmente métodos de escrutinio de otros péptidos de internalización para determinar si tales péptidos se unen a y/o inhiben los canales de calcio de tipo N. Los péptidos de ensayo se pueden evaluar para determinar tal unión o inhibición, ya sea solos o unidos a un agente activo, concretamente a un péptido activo, conocido a veces como péptido de carga. Otros péptidos de internalización que se pueden someter a ensayo incluyen el péptido internalización antenapedia (Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997)) (y variantes del mismo), variantes de Tat, Penetratina, SynB1 y 3, Transportan, Anfipatic, gp41 NLS, polyArg, y otros descritos en las siguientes referencias (Temsamani, Drug Discovery Today, 9 (23):1012-1019, 2004; De Coupade, Biochem J., 390:407-418, 2005; Saalik Bioconjugate Chem. 15: 1246-1253, 2004; Zhao, Medicinal Research Reviews 24(1):1-12, 2004; Deshayes, Celular and Molecular Life Sciences 62:1839-49, 2005) (todas incorporadas como referencia).

X. Unión de variantes de tat a otros agentes activos

Las variantes de tat descritas anteriormente se pueden unir a cualquier otro agente activo para promover la absorción del agente a través de las membranas celulares y/o la barrera hematoencefálica. El uso de un agente de quimérico que comprende o que consiste en una variante de tat y agente activo en un método terapéutico mejora la biodisponibilidad en el sitio en el que se desea con respecto al uso del agente activo solo, y reduce los efectos secundarios a través de la unión a los canales de calcio de tipo N con respecto al uso del agente activo unido a un péptido tat convencional. Las variantes de tat son particularmente útiles para agentes activos con una diana intracelular y/o fármacos neuroactivos que necesitan cruzar la barrera hematoencefálica para ejercer la actividad. Algunos, pero no todos los agentes activos susceptibles de anclaje a variantes de tat son péptidos. El uso de

variantes de tat es particularmente útil para fármacos existentes que tienen una escasa biodisponibilidad, dosificaciones altas o vidas medias cortas.

Algunas pautas para la selección de agentes activos, los métodos para los anclajes y el uso de los mismos son proporcionados por la bibliografía científica y de patentes en relación con los péptidos tat anteriores (véanse, p. ej., los documentos US 6.316.003 y US 5.804.604). Toda la descripción anterior en relación con los péptidos quiméricos que comprende un péptido activo unido a una variante tat para el tratamiento de los accidentes cerebrovasculares y las enfermedades relacionadas se aplica mutatis mutandis a agentes quiméricos que comprenden una variante tat unida a un agente activo.

La siguiente tabla enumera los nombres de los agentes activos (algunos de los cuales son fármacos aprobados), los trastornos cuyo tratamiento es útil, si la enfermedad es aguda o crónica, las rutas de administración de los fármacos (en la medida establecida) y los comentarios sobre los problemas con los medicamentos existentes que pueden ser superados en parte mediante el transporte mejorado a través de membranas conferido por un péptido variante de tat

Los agentes quiméricos que comprenden un péptido variante de tat unido a un agente activo se pueden utilizar a la misma o menor dosificación sobre una base molar que el agente activo solo, y se pueden administrar por la misma ruta que el agente activo solo, y para el tratamiento de la misma o las mismas enfermedades que el agente activo solo. Los métodos preferidos de administración para las descripciones de los productos conjungados de péptido:agente activo son intravenosa, intraarterial, intranasal/inhalación, intramusular, intraperitoneal, sub-lingual, por el recto, y tópica (para trastornos de la dermis o próximos a las células epiteliales).

20 Tabla 5

5

Agentes activos	Enfermedad	Agudo/ cron	Ruta de administración	Comentario	Referencia
Fenobarbital (luminal sódico)	Epilepsia		IV/oral	Dependencia, problemas de tolerancia, interacciones, efectos secundarios, defectos de nacimiento	Motamedi y Meador (2006) Curr Neurol Neurosci Rep, 6 (4): 341-6. Drugs.com
Primidona (Miidona, Misolina)	Epilepsia		Oral	Efectos secundarios, interacciones	Koristkova, et al (2006) Int J Clin Pharmacol Ther, 44 (9): 438-42. Drugs.com
Diazepam (Valium)	Ansiedad		IP/oral	Dependencia, efectos secundarios, interacciones	Beard, et al (2003) Health Technol Assess, 7 (40): iii, ix-x, 1-111. Drugs.com
Dopamina	Parkinson			No puede cruzar la BHE, efectos secundarios	Ahlskog (2001) Neurol Clin, 19 (3): 579-605. Drugs.com
Levodopa	Parkinson			Degradada antes de la BHE, efectos secundarios, vida media = 1,5 hrs	Nyholm (2006) Clin Pharmacokinet, 45 (2): 109- 36. USPTO.gov (patente Núm. 7.160.913)
Apomorfina			IP	Vida media corta	Nyholm (2006) Clin Pharmacokinet 45 (2): 109- 36 Drugs.com
Mesilato de tirilazad (Freedox)	Accidente cerebro-vascular		IP	Baja eficacia, fase III detenida	Hickenbottom y Grotta (1998) Semin Neurol 18 (4): 485-92. Strokecenter.org
Ciclosporina (Gengraf)	Inmuno- supresión		IP	Péptido, vida media 5-18 hr	Kees, et al (2006) Ther Drug Monit, 28 (3): 312-20. Drugs.com

Agentes activos	Enfermedad	Agudo/ cron	Ruta de administración	Comentario	Referencia
Agentes activos	Enfermedad	Agudo/ cron	Ruta de administración	Comentario	Referencia
Vacomicina	Antibiótico		IP	Péptido, baja absorción, vida media 4-6 horas	de Hoog, et al (2004) Clin Pharmacokinet, 43 (7): 417- 40. Drugs.com
Lisinopril (Prinivil)	Hipertensión		IP/oral	Péptido, atraviesa difícilmente la BHE, vida media 12 hr	Tan, et al (2005) Am J Hypertens, 18 (2): 158-64. Drugs.com
Azido- timidina (AZT, zidoridina, Combivir)	Antiviral		Oral	Atraviesa difícilmente la BHE, vida media 0,5-3 hr, toxicología hematológica	Spitzenberger, et al (2006) J Cereb Blood Flow Metab, 25 de Octubre, Publicación electrónica antes de su impresión. Drugs.com
Piracetam	Dolor/- epilepsia			No puede cruzar la BHE	Loscher y Potschka (2002) J Pharmacol Exp Ther, 301 (1): 7-14.US 7.157.421)
Natrecor (péptido BNP)	Síndrome de decompensa- ción Cardio- renal		IV	Eficacia Desconocida	Feldman y Sun (2004) Heart Fail Rev, 9 (3): 203-8. Clinicaltrials.gov
AVR-118 (péptido)	Paliativo del cáncer		Subcutánea	Eficacia desconocida, dosis desconocida	Clinicaltrials.gov
Oxitocina (péptido)	Trastornos del estado de ánimo		IV/IM	Interacciones, dosificación desconocida	Swaab, et al (2005) Ageing Res. Rev, 4 (2): 141-94. Drugs.com
Pravastatina (Pravacol)	MS		Oral	Eficacia desconocida, baja biodisponibilidad	Hatanaka (2000) Clin Pharmacokinet, 39 (6): 397- 412. Clinicaltrials.gov
Remi- fentanilo	Dolor, quemaduras		IV	Vida media, 3.5 min metabolizado por esterasa desconocida	Scott y Perry (2005) Drugs, 65 (13): 1793-1823. Clinicaltrials.gov
Neuro- tensina	Esquizofrenia Parkinson, adicción			Péptido 13AA, degradado fácilmente, no puede cruzar la BHE	Boules, et al., (2006) Peptides, 27 (10): 2523-33.
GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía)	Parkinson	Crónico	Intra- parénquimal	Péptido, no puede cruzar la BHE	Grondin, et al (2003) Prog. Drug Res., 61: 101-23.
Inhibidores de proteasa	VIH		Oral	Todos los inhibidores de proteasa del VIH adolecen de la misma capacidad aguda del VIH para mutar,	-Oldfield y Plosker (2006) Drugs 66 (9): 1275-1299.
-Lopinavir				generando cepas de VIH	

Agentes activos	Enfermedad	Agudo/ cron	Ruta de administración	Comentario	Referencia
-Ritonavir				resistentes a los fármacos	
-Saquinavir					-Porter y Charman (2001) Adv Drug Deliv Rev, 1 de
-Darunavir					octubre, 50 Suppl 1: S127-47.
-Atazanavir					
-Amprenavir					
					- Piacenti (2006) Pharmacotherapy 26 (8): 1111-1133.
Dihidro- ergotamina	Migraña		IV, IM, sub-Q	Las interacciones causan isquemia periférica, vida media de 9 horas	Modi y Lowder (2006) Am Fam Physician 73(1): 72-8.
Sporamax (itaconazol)	Antifúngico		Oral	Eventualmente desarrolla resistencia al fármaco, insuficiencia cardiaca congestiva en algunas poblaciones	Wang y Remold (2006) Cardiol Rev 14(5): 223-6.
Inhibidores de la proteína quinasa C	Infarto de miocardio agudo, accidente cerebro-vascular, isquemia, lesión por reperfusión				Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Núms. 20050267030, 20060148702, 20060293237, 20050215483, 20040204364, 20040009922
AII-7	Cáncer, cáncer de mama	Crónico		Peptidomimético que bloquea el dominio intracelular Erbb2 y aumenta la sensibilidad al taxol	Kunz et al., Mol Cancer Res. 2006; 4(12): 983-98
Péptido CRAMP	Infección por Salmonella			Péptido antimicrobiano intracelular que reduce la replicación Salmonella	Rosenberger, CM. PNAS 24 de febrero 2004 vol. 101 núm. 8 2422-2427
Péptido del canal de sodio	Puede reducir los espasmos musculares (epilepsia, piernas inquietas, Parkinson, etc.)			El péptido correspondiente al segmento intracelular corto entre los dominios transmembrana homólogos III y IV de la subunidad alfa del canal de sodio ralentizó la inactivación	Vassilev, Science (1988) 241: 1658-6
Aptámero KDI1	Bloquea la señalización de EGF - nosible				Buerger. J. Biol Chem., Vol. 278, número 39, 37610-37621, 26 de Septiembre 2003

Agentes activos	Enfermedad	Agudo/ cron	Ruta de administración	Comentario	Referencia
	anticanceroso				Septiembre 2003
ARN/ terapia génica				Se pueden utiliza péptidos transportadores para incorporar los ARN o ARNit/ARNi para el tratamiento	Turner et al (2007) Blood Cells Mol Dis, 38(1): 1-7.

Ejemplo 1: Escrutinio de efectos secundarios de Tat-NR2B9c

Tat-NR2B9c es un péptido quimérico de un péptido tat convencional y KLSSIESDV (SEQ ID NO: 12) que se ha demostrado previamente que es eficaz en un modelo de rata de accidente cerebrovascular. En este ejemplo se escruta el péptido Tat-NR2B9c para determinar su capacidad de inhibir la unión de ligandos conocidos a aproximadamente 70 proteínas receptoras. Los ejemplos de receptores escrutados incluyeron glutamato, histamina H1, canales de potasio, Dopamina D1, canales de calcio (tipo L, tipo N).

Se encontró que Tat-NR2B9c inhibía la unión a dos de tales receptores, un canal de calcio de tipo N y una quimiocina CXCR2 (IL-8RB). El escrutinio se llevó a cabo en forma de un análisis unión competitiva en el que Tat-NR2B9c no marcado a una concentración 10 mM compitió con un ligando marcado con I125 por la unión a su receptor en presencia del ligando no marcado para aumentar la sensibilidad. A 10 mM, Tat-NR2B9c mostró una inhibición de 100% de la unión de la ω -Conotoxina GVIA radiomarcada a canales de Ca de tipo N. Tat-NR2B9c también mostró una inhibición de 80% de IL-8/IL-8RB a la misma concentración. Los resultados se muestran en las Figs. 1A, B, C.

15 Ejemplo 2: Mutagénesis de un péptido Tat convencional

5

10

20

40

45

Al igual que el inhibidor del canal de calcio de tipo N conocido Ziconotida, Tat-NR2B9c contiene numerosas cargas positivas. Las cargas positivas facilitan presumiblemente la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y también pueden contribuir a la unión al canal de calcio de tipo N. La comparación directa de la secuencia muestra cierta similitud en las cargas positiva (R = Arginina, K = Lisina), así como el espaciamiento de estas cargas a lo largo de la cadena principal del péptido (véase el alineamiento de más abajo). Esto cartografía aproximadamente el epítopo de unión del canal de calcio de tipo N Tat-NR2B9c con respecto al epítopo de la región Tat (mostrado en cursiva) y un aminoácido del dominio NMDAR2B.

YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (Tat-NR2B9c) (SEC ID NO: 17)

CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSGKCG (ziconotida) (SEC ID NO: 72)

Los autores de la presente invención plantearon la hipótesis de que la mutación del residuo Y en la posición 1 de Tat-NR2B9c a F podría reducir la unión a los canales de calcio de tipo N sin deteriorar la captación celular del fármaco. Los autores de la presente invención también plantearon la hipótesis de que las modificaciones de un tramo de residuos alcalinos en el péptido tat convencional lograrían un resultado similar. Los péptidos se aplicaron cada uno a 100 µM. Se sometieron a ensayo los siguientes péptidos (la corriente de Ca²+ se muestra como un porcentaje después de cada péptido): 1990 TAT: YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1) (57 +/- 1,6% (n = 5)); 1991 2B9c: KLSSIESDV (SEQ ID NO: 12) (94 +/- 1,7% (n = 5)); 1992 Tat-NR2B9c-AA; YGRKKRRQRRRKLSSIEADA (SEQ ID NO: 18) (74 +/- 2,4% (n = 6)); 1993 F-Tat-NR2B9c: FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 19) (91 +/- 1,6% (n = 5)); 1994 Tat-NR2B9c K a A: YGRKKRRQRRRALSSIESDV (SEQ ID NO: 20) (77 +/- 1,8% (n = 7)); 1995 F-Tat-NR2B9c K a A: FGRKKRRQRRRALSSIESDV (SEQ ID NO: 21) (97 +/- 0,2% (n = 6)); 1976: YGRKKRRQRRRKLSSIESDX (SEQ ID NO: 22) en donde X = norvalina (66 +/- 3,4% (n = 6)); 1977: YGRKKRRQRRRKLSSIESDX (SEQ ID NO: 23) en donde X = L-t-butil-glicina (65 +/- 5,1% (n = 5)); 1987: isómero D de Tat-NR2B9c (82 +/- 2,2% (n = 6)). Tat-NR2B9c (68 +/- 1,7% (n = 7)). Los datos se representaron como media +/-

Los péptidos también se sometieron a ensayo en el siguiente análisis de pinzamiento zonal. Los péptidos de internalización y los péptidos quiméricos se escrutaron para determinar su capacidad para inhibir las corrientes iónicas mediadas por los canales de calcio de tipo N. Esto se llevó a cabo mediante la realización de registros de pinzamiento zonal de células completas en neuronas ganglionares de la raíz dorsal, en las que son expresadas las corrientes de calcio de tipo N. Los cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRG) se prepararon a partir de ratones Swiss a los 13-14 días de gestación. En resumen, los DRG se diseccionaron y se sometieron a digestión con tripsina durante 20 min a 37°C, se disociaron mecánicamente y se sembraron en placa sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina. Se hicieron crecer en MEM libre de suero (Neurobasal MEM, B-27 - Gibco Invitrogen Corporation,

Carlsbad, CA). Después de 3-5 días, se añadió una solución FUDR 10 μM para inhibir la proliferación de la glía. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ humidificada y se alimentaron dos veces por semana. Los registros de las células completas se llevaron a cabo a temperatura ambiente 10-14 días después del cultivo en placa. Registros Electrofisiológicos: los registros de células completas se realizaron con un amplificador Axopatch-1B (Axon Instruments, Foster City, CA) en el modo de fijación de voltaje. Los electrodos de registro, con resistencias de 3-5 MΩ, se construyeron a partir de vidrio de borosilicato de paredes delgadas (1,5 mm de diámetro; World Precision Instruments, Sarasota, FL) utilizando un extractor de dos etapas (PP83; Narishige, Tokio, Japón). Los datos se digitalizaron, se filtraron (2 kHz) y se adquirieron en línea a través de los programas de ordenador pClamp 9 (Axon Instruments). Las pipetas se llenaron con una disolución que contenía (mM): CsCl 110, MgCl2 3, EGTA 10, HEPES 10, MgATP 3, GTP 0,6. El pH se ajustó a 7,2 con CsOH. La disolución de baño contenía (mM): CaCl2 1, BaCl2 10, HEPES 10, TEA-Cl 160, Glucosa 10, TTX 0,0002 a pH (NaOH) 7,4. Se indujeron corrientes de células completas utilizando pulsos despolarizantes de 40 ms a +20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV, aplicados cada 15 s. Para someter a ensayo la inhibición dependiente del uso, se indujeron corrientes utilizando pulsos despolarizantes de 10 ms a 20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV, aplicados cada 0,02 s (50 Hz), 0,05 s (20 Hz), 0,1 s (10 Hz) o 15 s (0,07 Hz), respectivamente.

5

10

15

20

25

30

35

50

55

Resultados: Los resultados se presentan en la Figura 2. La porción superior representa las medias +/- e.t.m. de la corriente de calcio en células completas en presencia del péptido indicado normalizado a la corriente de calcio de células completas en las mismas células antes de la aplicación del péptido. La porción inferior de la Fig. 2 muestra los rastros representativos de células enteras a partir de los que se obtuvieron las medias de la porción superior. En resumen, los datos muestran que la porción transportadora de TAT del péptido quimérico es predominantemente responsable de la inhibición de los canales de calcio de tipo N. La mutación de la tirosina N-terminal de Tat-NR2B9c anula casi completamente la capacidad de este péptido quimérico para inhibir los canales de calcio de tipo N. La porción C-terminal de Tat-NR2B9c (KLSSIESDV (SEC ID NO: 12)), F-Tat-Tat NR2B9c o 1994-NR2B9c K a A no mostró ninguna inhibición significativa de actividad de los canales de calcio de tipo N. Los péptidos 1992, 1994 y 1987 mostraron una mejora significativa en la actividad de los canales sobre tat solo aunque todavía mostraron cierta reducción en la cantidad de actividad de los canales de calcio de tipo N. Todos estos péptidos proporcionan una reducción de la unión a los canales de calcio de tipo N sobre Tat convencional solo que indica un mayor índice terapéutico de un fármaco que incluye una de estas secuencias variantes de Tat.

Ejemplo 3: Análisis adicional de la inhibición de las corrientes iónicas mediadas por el canal Ca²⁺ de tipo N por Tat-NR2B9c

Se llevaron a cabo experimentos adicionales como se representa en las Figuras 4-7. Su propósito fue caracterizar adicionalmente la inhibición de las corrientes iónicas mediadas por el canal Ca²⁺ de tipo N por Tat-NR2B9c. Adicionalmente, la Figura 4 caracteriza el grado de inhibición de la corriente de Ca²⁺ por Tat-NR2B9c (YGRKKRRQRRRKLSSIESDV, SEC ID 17) y esto se compara con las otras variantes: 1990 TAT (YGRKKRRQRRR, SEQ ID NO: 1); 1992 Tat-NR2B9c AA (YGRKKRRQRRRKLSSIEADA, SEC ID 18); 1994 Tat-NR2B9c K a A (YGRKKRRQRRRALSSIESDV, SEC ID 20); 1987 D-Tat-NR2B9c (YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (todos D-aminoácidos), SEQ ID); 1976 (YGRKKRRQRRRKLSSIESDX, donde X = norvalina, SEQ ID NO: 22); 1977 (YGRKKRRQRRRKLSSIESDX, donde X = L-t-butil Glicina, la SEQ ID NO: 23).

Cultivo de tejidos: Se prepararon cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRG) a partir de ratones Swiss a los 13-14 días de gestación. En resumen, los DRG se disecados y se sometieron a digestión con tripsina durante 20 min a 37°C, se disociaron mecánicamente y se cultivaron en placa sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina. Se hicieron crecer en MEM libre de suero (Neurobasal MEM, B-27 - Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después de 3-5 días, se añadió una disolución de FUDR 10 µM para inhibir la proliferación de la glía. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ humidificada y se alimentaron dos veces por semana. Los registros de las células completas se llevaron a cabo a temperatura ambiente 10-14 días después del cultivo en placa.

Registros electrofisiológicos: Los registros de células completas se llevaron a cabo con un amplificador Axopatch-1B (Axon Instruments, Foster City, CA) en el modo de fijación de voltaje. Los electrodos de registro, con resistencias de 3-5 M Ω , se construyeron a partir de vidrio de borosilicato de paredes delgadas (1,5 mm de diámetro; World Precision Instruments, Sarasota, FL) utilizando un extractor de dos etapas (PP83; Narishige, Tokio, Japón). Los datos se digitalizaron, se filtraron (2 kHz) y se adquirieron en línea a través de los programas de pClamp 9 (Axon Instruments). Las pipetas se cargaron con una disolución que contenía (mM): CsCl 110, MgCl2 3, EGTA 10, HEPES 10, MgATP 3, GTP 0,6. El pH se ajustó a 7,2 con CsOH. La disolución de baño contenía (mM): CaCl2 1, BaCl2 10, HEPES 10, TEA-Cl 160, Glucosa 10, TTX 0,0002 a pH (NaOH) 7,4. Las corrientes de células completas se indujeron utilizando pulsos despolarizantes de 40 ms a +20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV, aplicados cada 15 s. Para someter a ensayo la inhibición dependiente del uso, las corrientes se indujeron utilizando pulsos despolarizante de 10 ms a +20 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV, aplicado cada 0,02 s (50 Hz), 0,05 s (20 Hz), 0,1 s (10 Hz) o 15 s (0,07 Hz), respectivamente. *Análisis de los datos:* Los datos se representaron como la media +/- e.t.m.

60 La Figura 4 demuestra que concentraciones crecientes de todos los péptidos que contenían una secuencia Tat intacta (YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1)) inhibían significativamente las corrientes Ca²⁺ en neuronas de los

ganglios de la raíz dorsal (que expresan predominantemente canales Ca²⁺ de tipo N). Esto sugiere que la propiedad de inhibición de las corrientes del canal la Ca²⁺ de tipo N reside en la secuencia Tat.

Las Figs. 5A y B demuestran que la inhibición de la corriente de Ca²+ por Tat-NR2B9c es específica para los canales de Ca²+ de tipo N. La ω-conotoxina (1 M), un bloqueador del canal de Ca²+ de tipo N selectivo inhibe la corriente de Ca²+, y o se proporciona ninguna inhibición adicional más por Tat-NR2B9c (100 μM) una vez que los canales de N están bloqueados (Fig. 5A, izquierda). Del mismo modo, no se observa ninguna inhibición adicional de la corriente cuando se añade conotoxina después de la inhibición de la corriente iónica por Tat-NR2B9c (Fig. 5A, derecha). Asimismo, el bloqueador del canal de Ca²+ de tipo L selectivo, la nifedipina, no afecta de manera significativa al tamaño de la corriente de Ca²+ registrada en presencia (intracelular 100 μM), o ausencia de, Tat-NR2B9c como se muestra en la Fig. 5B. La porción izquierda de la Fig. 5B muestra las medias +/- e.t.m. de las corrientes de calcio, mientras que a la derecha se encuentran los rastros representativos de las corrientes de células completas de un solo experimento.

La Figura 6 demuestra que el bloqueo de las corrientes de Ca²⁺ por Tat-NR2B9c no es dependiente de la frecuencia. Se utilizó Tat-NR2B9c 100 μM para someter a ensayo su efecto dependiente del uso. Las corrientes inducidas por pulsos despolarizantes de +20 mV mostraron un fuerte debilitamiento dependiente de la frecuencia. Sin embargo, el aumento de la frecuencia (0,07, 10, 20, 50 Hz) no aumentó el efecto de inhibición de Tat-NR2B9c sobre esta corriente. La figura muestra corrientes de Ca²⁺ registradas en una neurona de DRG representativa a diferentes frecuencias. Estas corrientes tienen una tendencia natural debilitarse después de unos pocos minutos, y el aumento de la frecuencia no tuvo ningún efecto sobre la inhibición de la corriente por Tat-NR2B9c (representativo de n = 4).

- La Figura 7 demuestra que Tat-NR2B9c inhibe la corriente de Ca²⁺ las neuronas de DRG en una manera que es independiente del voltaje, y que esta inhibición es específica para los canales de Ca²⁺ de tipo N, debido a que esta no se ve afectada por la nifedipina, un bloqueador de las canales de Ca²⁺ de tipo L. Las corrientes se indujeron utilizando etapas de fijación de voltaje de 50 ms desde -40 a +50 mV a partir del potencial de mantenimiento de -60 mV
- En conclusión, las Figuras 4-7 muestran que la inhibición de las corrientes de Ca²⁺ por Tat-NR2B92 es específica para los canales de Ca²⁺ de tipo N, y es similar a una propiedad de otros péptidos que portan el radical Tat. Los datos muestran también que esta inhibición es específica para los canales de Ca²⁺ de tipo N, y es independiente de la frecuencia y del voltaje.
 - Ejemplo 3: F-Tat-NR2B9c es igualmente eficaz en un modelo de accidente cerebrovascular
- 30 Se comparó F-Tat-NR2B9c con Tat-NR2B9c a una único dosis de 3 nmol/g de peso en el modelo de isquemia permanente por oclusión de la pía madre de rata descrito anteriormente y adicionalmente en el Ejemplo 4. En ambos casos, el péptido quimérico se administró una hora después de iniciar la isquemia. F-Tat- NR2B9c y Tat-NR2B9c fueron igualmente eficaces en la reducción de tamaño del infarto, como se muestra en la Fig. 3.

Eiemplo 4

35 Propósito:

5

10

15

- 1. Someter a ensayo la eficacia neuroprotectora del péptido Tat-NR2B9c en ratas macho y hembra utilizando el modelo de accidente cerebrovascular oclusión del vaso 3 de la pía madre (P3VO) *in vivo*.
- 2. Averiguar el mecanismo de acción sometiendo a ensayo 6 variaciones del péptido Tat-NR2B9c en ratas macho.

40 Antecedentes:

45

50

El péptido conocido como Tat-NR2B9c ha sido desarrollado y sometido a ensayo previamente en el modelo de MCAO de accidente cerebrovascular en rata. Se ha demostrado que este péptido es neuroprotector como se observa por una reducción del tamaño del infarto. Sin embargo, el modelo MCAO de accidente cerebrovascular da como resultado un gran infarto con amplios déficits neurológicos y acortamiento de la vida. El modelo P3VO de accidente cerebrovascular da como resultado un infarto cortical mucho más pequeño con déficit neurológico mínimo y una duración de vida normal.

Se sometieron a ensayo seis péptidos adicionales que contenían la misma secuencia de aminoácidos que Tat-NR2B9c excepto por los 3 aminoácidos terminales. Mediante la variación de estos aminoácidos y, sometiendo a ensayo a continuación la eficacia neuroprotectora de los péptidos en el modelo P3VO de accidente cerebrovascular, se puede averiguar adicionalmente el mecanismo de acción.

La estructura de aminoácidos de Tat-NR2B9c y los 6 péptidos son los siguientes:

Secuencia:	Nombre:
YGRKKRRQRRRKLSSIESDV	Tat-NR2B9c (SEQ ID NO: 17)
YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	X= 3-fluoro-DL-Valina 1974 (SEQ ID NO: 73)
YGRKKRRQRRRKLSSIETDX	X = norvalina 1975 (SEQ ID NO: 74)
YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	X = norvalina 1976 (SEQ ID NO: 22)
YGRKKRRQRRRKLSSIESDX	X= L-t-butil-glicina 1977 (SEQ ID NO: 23)
YGRKKRRQRRRKLSSIEXDV	X= ácido L-2-amino-3-ureidopropiónico 1978 (SEQ ID NO: 75)
YGRKKRRQRRRKLSSIETAL	1980 (SEQ ID NO: 76)

Métodos:

Animales

15

20

25

30

Se mantuvieron en ayunas ratas Sprague Dawley adultas (10-12 semanas de edad) (machos □ 300 g, hembras - 250 g) (Figura 8) durante 12-18 antes de ser sometidas a oclusión permanente de los vasos de la pia madre de 3 ramas terminales de la Arteria Cerebral Media sobre la Corteza Barril de Bigote (P3VO). Cada uno de los 7 péptidos se sometió a ensayo en ratas macho más un grupo de control con solución salina (n=8 en cada grupo). Se sometieron a ensayo el grupo con péptido Tat-NR2B9c y el de control con solución salina en ratas hembra (n=8 en cada grupo). El investigador fue ciego para el grupo de tratamiento durante el momento de la cirugía hasta el análisis del tamaño del infarto.

Procedimiento general

Las ratas se anestesiaron con 0,5 ml/kg de inyección intramuscular de cetamina (100 mg/kg), acepromazina (2 mg/kg), y xilazina (5 mg/kg), con un suplemento de un tercio de la dosis inicial según fue necesario. Se insertó una sonda de temperatura anal y el animal se colocó sobre una almohadilla de calentamiento mantenida a 37°C. La arteria carótida externa derecha (ECA) se canuló con tubo de polietileno PE 10 para las inyecciones de colorante. El cráneo se expuso por medio de una incisión en la línea media, se rascó para liberarlo de tejido y se desconectó el músculo temporal del cráneo en el lado derecho. Utilizando un microscopio de disección y un taladro dental neumático, se realizó una ventana craneal de 6x4 mm sobre el córtex somatosensorial derecho (2 mm caudal and 5 mm lateral con respecto al bregma) taladrando un rectángulo a través del cráneo levantando la pieza del cráneo mientras se mantiene la dura intacta. Después de haber sido bañado con fluido cefalorraquídeo artificial, se inyectaron pequeños bolos (10 a 20 µL) de colorante vital azul violeta patente (10 mmol/L; Sigma) en solución salina normal, en la arteria carótida externa derecha para demostrar el tránsito a través de los vasos superficiales del córtex. Se seleccionaron tres ramas arteriolares críticas de la MCA entorno al córtex barril y se cauterizaron eléctricamente a través de la dura. Después de las cauterizaciones, se repitieron las inyecciones de bolo y los tránsitos de colorante para asegurarse de que los tránsitos a través de las arteriolas cauterizadas se habían bloqueado. El rectángulo del cráneo se recolocó sobre la ventana y se suturó el cuero cabelludo. Se retiró el catéter de la ECA, se ligó la ECA, y se suturó la parte anterior del cuello. Una hora después del inicio de la oclusión focal, se infundieron, 0,3 ml de fármaco (3 nMol/g de peso corporal) o control de solución salina a través de la vena de la cola a una velocidad de 0.06 ml/min. Cada rata se devolvió a su jaula individual bajo una lámpara de calentamiento para mantener la temperatura corporal hasta que la rata se recuperó completamente. Se suministraron alimento y agua ad libitum.

Recolección de tejido cerebral

Veinticuatro horas después de la cirugía, los animales se volvieron a anestesiar con 1mL de pentobarbital y el cerebro se recogió rápidamente. Se tomó una porción coronal a través de la región del infarto y se incubó en cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 2% durante 15 minutos a 37°C. Las imágenes se escanearon y las porciones de cerebro se almacenaron -80°C.

Análisis

Se midió el tamaño del infarto como un porcentaje del hemisferio de cada rata en el estudio. Después de obtener las mediciones del tamaño del infarto, los animales se separaron en sus respectivos grupos. Las comparaciones se realizaron entre los grupos de tratamiento como las medias ± ET.

5 Resultados:

De los seis péptidos novedosos sometidos a ensayo, Tat-NR2B9c, 1976 y 1977 dieron como resultado una disminución significativa del tamaño de los infartos y 1975 y 1978 presentaron una cierta reducción del tamaño del infarto (Figura 8).

Todas las publicaciones, y archivos de patente citados en esta memoria descriptiva se incorporan como referencia a la presente memoria como si cada publicación individual y patente estuviera específicamente e individualmente indicada para incorporarla como referencia. Los registros de Genbank referenciados mediante identificación de Genbank (GID) o número de acceso, concretamente cualquier secuencia de polipéptido, secuencia de polinucleótido o anotación de la misma, se incorporan como referencia a la presente memoria. Si se ha asociado más de una versión de una secuencia al mismo número de acceso en diferentes momentos, se debe considerar que la referencia a un número de depósito se aplica a la versión existente en la fecha de presentación efectiva que se remonta a una solicitud de prioridad si el depósito también es referenciado en la solicitud de prioridad. Se pueden realizar diferentes cambios y los equivalentes se pueden sustituir sin apartarse del espíritu y del alcance de la invención. A menos que resulte evidente de otro modo a partir del contexto, se puede utilizar cualquier rasgo, etapa o realización combinado con cualquier otro rasgo, etapa o realización.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

25

<110> ArborVita Corporation NoNO, Inc. Belmares, Michael Garman,, David Lu, Peter Salter, Michael Tymianski, Michael

30 <120> TRATAMIENTO DEL ACCIDENTE CEREBROVASCULAR Y OTRAS ENFERMEDADES SIN INHIBIR LOS CANALES DE CALCIO DE TIPO N

50 <220> <223> Péptido tat sintético

<210> 2 <211> 11 <212> PRT <213> Artificial

60

```
<220>
      <223> Péptido de internalización sintético
      <220>
 5
      <221> MOD RES
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es cualquier aminoácido distinto de Tyr o ausente
      <400> 2
10
      Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg 1 10
      <210>3
      <211> 11
15
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido de internalización sintético
20
      <400> 3
      Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro
25
      <210>4
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
30
      <220>
      <223> Péptido quimérico sintético
      <400> 4
      Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
35
      Ser Asp Val
      <210> 5
      <211> 4
      <212> PRT
40
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido activo sintético
45
      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa = Glu, Asp, Asn o Gln
50
      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (2)..(2)
      <223> Xaa = Ser o Thr
55
      <220>
      <221> MOD RES
      <222> (3)..(3)
      <223> Xaa = Asp, Glu, Gln o Asn
      <220>
60
      <221> MOD_RES
```

```
<222> (4)..(4)
      <223> Xaa = Val o Leu
      <400> 5
 5
      Xaa Xaa Xaa Xaa
      <210>6
      <211>4
10
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido activo sintético
15
      <400>6
      Glu Ser Asp Val
20
      <210> 7
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
25
      <223> Péptido activo sintético
      <400> 7
      Glu Ser Glu Val
30
      <210>8
      <211>4
      <212> PRT
35
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido activo sintético
40
      <400> 8
      Glu Thr Asp Val
      <210>9
45
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido activo sintético
50
      <400> 9
      Glu Thr Glu Val
55
      <210> 10
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Artificial
60
      <223> Péptido activo sintético
```

```
<400> 10
      Asp Thr Asp Val
 5
      <210> 11
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Artificial
10
      <220>
      <223> Péptido activo sintético
      <400> 11
15
      Asp Thr Glu Val
      <210> 12
      <211>9
20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido activo sintético - 1991 2B9c
25
      <400> 12
      Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val
30
      <210> 13
      <211>9
      <212> PRT
      <213> Artificial
35
      <220>
      <223> Péptido activo sintético
      Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val
40
      <210> 14
      <211>3
      <212> PRT
      <213> Artificial
45
      <220>
      <223> Péptido activo sintético
50
      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es Thr o Ser
55
      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (2)..(2)
      <223> Xaa es cualquier aminoácido
      <220>
60
      <221> MOD_RES
      <222> (3)..(3)
      <223> Xaa es Val o Leu
```

```
<400> 14
      Xaa Xaa Xaa
 5
      <210> 15
      <211> 12
      <212> PRT
      <213> Artificial
10
      <220>
      <223> Péptido de internalización sintético
      <400> 15
15
       Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Gln
      <210> 16
      <211> 20
20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido quimérico sintético
25
      <400> 16
       Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 10 15
       Glu Thr Asp Val
30
      <210> 17
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
35
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <400> 17
       Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile 1 \hspace{1cm} 5 \hspace{1cm} 10 \hspace{1cm} 15
      Glu Ser Asp Val 20
40
      <210> 18
      <211> 20
      <212> PRT
45
      <213> Artificial
      <223> Péptido sintético - 1992 Tat-NR2B9c-AA
50
      <400> 18
       Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile 1 10 15
       Glu Ala Asp Ala
```

```
<210> 19
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <223> Péptido sintético - 1993 F-Tat-NR2B9c
      <400> 19
10
      Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Val
      <210> 20
      <211> 20
15
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <223> Péptido sintético - 1994 Tat-NR2B9c κ to A
20
      <400> 20
      Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Leu Ser Ser Ile
1 10 15
      Glu Ser Asp Val
25
      <210> 21
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
30
      <220>
      <223> Péptido sintético - 1995 F-Tat-NR2B9c κ to A
      <400> 21
      Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Leu Ser Ser Ile
35
      Glu Ser Asp Val
      <210> 22
      <211> 20
40
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <223> Variante de péptido sintético - 1976
45
      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (20)..(20)
      <223> Xaá es Ńva
50
      <400> 22
      Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Xaa
                    20
```

```
<210> 23
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético - 1977
10
      <220>
      <221> MOD RES
      <222> (20)..(20)
      <223> Xaá es L-t-butil-glicina
15
      <400> 23
      Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile 1 5 10 15
      Glu Ser Asp Xaa 20
      <210> 24
20
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
25
      <223> Péptido sintético
      <400> 24
      Phe Asn Gly Ser Ser Asn Gly His Val Tyr Glu Lys Leu Ser Ser Ile 1 5 10 15
      Glu Ser Asp Val
30
      <210> 25
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
35
      <220>
      <223> Péptido sintético – Secuencia 20mer C-terminal
      <400> 25
40
      His Pro Thr Asp Ile Thr Gly Pro Leu Asn Leu Ser Asp Pro Ser Val
      Ser Thr Val Val
      <210> 26
      <211> 20
45
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
50
      <400> 26
```

```
Arg Arg Ala Ile Glu Arg Glu Glu Gly Gln Leu Gln Leu Cys Ser Arg 1 5 10 15
      His Arg Glu Ser
      <210> 27
      <211> 20
 5
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
10
      <400> 27
      Thr Gln Gly Phe Pro Gly Pro Cys Thr Trp Arg Arg Ile Ser Ser Leu
      Glu Ser Glu Val
15
      <210> 28
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
20
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
      <400> 28
      Ala Val Ser Arg Lys Thr Glu Leu Glu Glu Tyr Gln Arg Thr Ser Arg 1 5 10 15
      Thr Cys Glu Ser
25
      <210> 29
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
30
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
      <400> 29
35
      Leu Asn Ser Cys Ser Asn Arg Arg Val Tyr Lys Lys Met Pro Ser Ile
1 10 15
      Glu Ser Asp Val
      <210> 30
      <211> 20
40
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
45
      <400> 30
```

```
Gly Gly Asp Leu Gly Thr Arg Arg Gly Ser Ala His Phe Ser Ser Leu
      Glu Ser Glu Val
      <210> 31
      <211> 20
 5
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
10
      <400> 31
      Gln Pro Thr Pro Thr Leu Gly Leu Asn Leu Gly Asn Asp Pro Asp Arg
      Gly Thr Ser Ile
15
      <210> 32
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
20
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
      <400> 32
25
      Met Gln Ser Ile Pro Cys Met Ser His Ser Ser Gly Met Pro Leu Gly
      Ala Thr Gly Leu
      <210> 33
      <211> 20
      <212> PRT
30
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
35
      <400> 33
      Gln Asn Phe Ala Thr Tyr Lys Glu Gly Tyr Asn Val Tyr Gly Ile Glu
1 10 15
      Ser Val Lys Ile 20
40
      <210> 34
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
45
      <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
      <400> 34
```

```
Gln Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Glu Gly Tyr Asn Val Tyr Gly Thr Glu 1 5 10 15
      Ser Val Lys Ile
     <210> 35
     <211> 20
 5
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
     <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
10
     <400> 35
      His Thr Gly Thr Ala Ile Arg Gln Ser Ser Gly Leu Ala Val Ile Ala
      Ser Asp Leu Pro
15
     <210> 36
     <211> 20
     <212> PRT
     <213> Artificial
20
     <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
     <400> 36
      Ser Phe Thr Ser Ile Leu Thr Cys His Gln Arg Arg Thr Gln Arg Lys
      Glu Thr Val Ala
25
     <210> 37
     <211> 20
     <212> PRT
30
     <213> Artificial
     <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
35
     <400> 37
      Glu Thr Met Ala 20
     <210> 38
40
     <211> 20
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
45
     <223> Péptido sintético - Secuencia 20mer C-terminal
     <400> 38
      Arg Arg Leu Pro Gly Lys Asp Ser Met Ala Cys Ser Thr Ser Leu Ala
                                           10
```

```
Pro Val Phe Pro
      <210>39
      <211>4
 5
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
10
      <400>39
      Ser Thr Val Val
      <210> 40
15
      <211>4
      <212> PRT
      <213> Artificial
20
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
      <400> 40
      His Arg Glu Ser
25
      <210>41
      <211>4
      <212> PRT
30
      <213> Artificial
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
35
      <400> 41
      Thr Cys Glu Ser
      <210> 42
40
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Artificial
45
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
      <400> 42
      Gly Thr Ser Ile
50
      <210> 43
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Artificial
55
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
      <400> 43
60
      Ala Thr Gly Leu
```

```
<210> 44
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Artificial
 5
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
      <400> 44
10
      Ser Val Lys Ile
      <210> 45
      <211> 4
15
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
20
      <400> 45
      Ser Asp Leu Pro
25
      <210>46
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Artificial
30
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
      <400> 46
      Glu Thr Val Ala
35
      <210> 47
      <211> 4
      <212> PRT
40
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
45
      <400> 47
      Glu Thr Met Ala
      <210> 48
50
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
55
      <223> Péptido sintético - Secuencia 4mer C-terminal
      <400> 48
      Pro Val Phe Pro
60
      <210>49
      <211> 11
```

```
<212> PRT
      <213> Artificial
 5
      <223> Péptido variante tat de internalización sintético
      <400> 49
      Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg 1 10
10
      <210> 50
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> Artificial
15
      <223> Péptido variante tat de internalización sintético
      <400> 50
20
      Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
      <210> 51
      <211> 5
      <212> PRT
25
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
30
      <400> 51
      Thr Gly Glu Lys Pro
35
      <210> 52
      <211>8
      <212> PRT
      <213> Artificial
40
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <400> 52
      Gly Gly Arg Arg Gly Gly Ser 1
45
      <210> 53
      <211>9
      <212> PRT
50
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
55
      <400> 53
      Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro 1 5
      <210> 54
60
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
```

```
<220>
      <223> Péptido sintético
      <400> 54
      Gly Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys Lys Leu Ser Ser Ile Glu 1 10 15
      Ser Asp Val
      <210> 55
10
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
15
      <400> 55
      Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 15
      Asp Val
20
      <210> 56
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
25
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <400> 56
30
      Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu 1 5 10 15
      Ser Asp Val
      <210> 57
      <211> 18
35
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
40
      <400> 57
      Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 10 15
      Asp Val
45
      <210> 58
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
50
      <223> Péptido sintético
      <400> 58
```

```
Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
     <210> 59
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
     <220>
10
     <223> Péptido sintético
      <400> 59
      Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 10 15
      Asp Val
15
      <210> 60
      <211> 19
      <212> PRT
     <213> Artificial
20
     <220>
     <223> Péptido sintético
     <400> 60
25
      Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
     <210> 61
      <211> 18
30
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
     <223> Péptido sintético
35
      <400> 61
      Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 5 10 15
      Asp Val
     <210> 62
40
      <211> 19
      <212> PRT
     <213> Artificial
45
     <220>
     <223> Péptido sintético
     <400> 62
```

```
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
      <210> 63
     <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
     <220>
     <223> Péptido sintético
10
      <400> 63
      Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 15
      Asp Val
15
      <210>64
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
20
     <220>
     <223> Péptido sintético
      <400> 64
      Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
25
      <210> 65
      <211> 18
      <212> PRT
30
      <213> Artificial
      <220>
     <223> Péptido sintético
35
      <400>65
      Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 15
      Asp Val
      <210>66
40
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
     <220>
45
     <223> Péptido sintético
      <400>66
      Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15
                                              10
      Glu Ser Asp Val
```

```
<210> 67
      <211> 20
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
     <223> Péptido sintético
10
     <400> 67
      Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile 1 5 10 15
      Glu Ser Asp Val
      <210>68
15
      <211> 19
      <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
20
     <223> Péptido sintético
      <400> 68
      Arg Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
25
      <210> 69
      <211> 19
      <212> PRT
     <213> Artificial
30
     <220>
      <223> Péptido sintético
     <400>69
35
      Arg Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
      <210> 70
      <211> 17
40
     <212> PRT
      <213> Artificial
     <220>
     <223> Péptido sintético
45
      <400> 70
      Arg Arg Pro Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp 1 10 15
      Val
50
     <210>71
      <211> 17
      <212> PRT
```

```
<213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
 5
      <400> 71
      Arg Arg Ala Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp
      Val
      <210> 72
10
      <211> 26
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
15
      <223> Inhibidor del canal de calico tipo N – Ziconotida
      Cys Lys Gly Lys Gly Ala Lys Cys Ser Arg Leu Met Tyr Asp Cys Cys 1 15
      Thr Gly Ser Cys Arg Ser Gly Lys Cys Gly
20
      <210> 73
      <211> 20
      <212> PRT
25
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Variante de péptido sintético1974
      <220>
30
      <221> MOD_RES
      <222> (20)..(20)
      <223> Xaa es 3-fluoro-L-Valina
      <400> 73
35
      Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Xaa
      <210> 74
40
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
45
      <223> Variante de péptido sintético 1975
      <220>
      <221> MOD RES
50
      <222> (20)..(20)
      <223> Xaá es Ńva
      <400> 74
```

```
Glu Thr Asp Xaa
     <210> 75
     <211> 20
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
     <223> Variante de péptido sintético1978
10
     <220>
     <221> MOD RES
     <222> (18)..(18)
     <223> Xaa es ácido L-2-amino-3-ureidopropiónico
15
     <400> 75
     Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
     Glu Xaa Asp Val
20
     <210> 76
     <211> 20
     <212> PRT
     <213> Artificial
     <220>
25
     <223> Variante de péptido sintético 1980
     <400> 76
     Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
30
     Glu Thr Ala Leu
                  20
     <210>77
     <211> 20
     <212> PRT
35
     <213> Artificial
     <220>
     <223> Péptido sintético
40
     <220>
     <221> CARACTERÍSTICA_MISC
     <222> (1)..(1)
     <223> Xaa es un Phe modificado con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
45
     H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
     biotina, (5,6)-FAM
     <400> 77
     Glu Ser Asp Val
50
                  20
     <210> 78
     <211> 21
```

```
<212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
 5
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
10
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 78
      Xaa Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser 1 10 15
      Ile Glu Ser Asp Val
15
      <210> 79
      <211> 21
      <212> PRT
      <213> Artificial
20
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
25
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es Un aminoácido distinto de Tyr
      <400> 79
30
      Xaa Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser 1 10 15
      Ile Glu Ser Asp Val
                     20
      <210>80
      <211> 19
      <212> PRT
35
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
40
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Gly modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
45
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM
      <400> 80
      Xaa Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
50
      <210>81
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
55
```

```
<220>
      <223> Péptido sintético
 5
     <220>
     <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
10
     <400> 81
      Xaa Gly Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Val
15
      <210> 82
      <211> 20
      <212> PRT
     <213> Artificial
20
     <220>
     <223> Péptido sintético
     <220>
     <221> CARACTERÍSTICA MISC
25
     <222> (1)..(1)
     <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
      <400> 82
      Glu Ser Asp Val
30
      <210>83
      <211> 18
      <212> PRT
35
     <213> Artificial
     <220>
     <223> Péptido sintético
40
     <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
     H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
45
     biotina, (5,6)-FAM
      <400> 83
      Xaa Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
      Asp Val
50
      <210> 84
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
55
     <220>
      <223> Péptido sintético
```

```
<220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
 5
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 84
      Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
10
      <210>85
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
15
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
20
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
      <400> 85
25
      Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
                                                 10
      Ser Asp Val
      <210>86
      <211> 19
      <212> PRT
30
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
35
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Gly modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
40
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM
      <400>86
      Xaa Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
45
      <210>87
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
50
      <220>
      <223> Péptido sintético
55
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
```

```
<222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 87
 5
      Xaa Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 15
      Glu Ser Asp Val
      <210>88
      <211> 20
10
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
15
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de tirosina
20
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
25
      <400>88
      Xaa Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile 1 10 15
      Glu Ser Asp Val
30
      <210>89
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
35
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
40
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Ala modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM
45
      <400>89
      Xaa Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 15
      Asp Val
      <210>90
50
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
55
      <223> Péptido sintético
```

```
<220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
 5
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400>90
      Xaa Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
10
      <210> 91
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
15
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
20
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
25
      Xaa Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu 1 5 10 15
      Ser Asp Val
      <210>92
      <211> 19
30
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
35
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
      <223> Xaa es una Gly modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
40
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 92
      Xaa Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
                                                10
      Ser Asp Val
45
      <210>93
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
50
      <220>
      <223> Péptido sintético
55
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
```

```
<222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 93
 5
      Xaa Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 15
      Glu Ser Asp Val
      <210>94
      <211> 20
10
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
15
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
20
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
      <400> 94
      Xaa Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile 1 5 10 15
      Glu Ser Asp Val
25
      <210>95
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
30
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
35
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
40
      <400>95
      Xaa Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 5 10 15
      Asp Val
45
      <210>96
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
50
      <223> Péptido sintético
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
55
      <222> (1)..(1)
```

```
<223> Xaa es piroglutamato
      <400>96
      Xaa Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
 5
      <210>97
      <211> 19
      <212> PRT
10
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
15
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
20
      <400> 97
      Xaa Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
      <210>98
25
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
30
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
35
      <223> Xaa es una Gly modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 98
40
      Xaa Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
      <210>99
      <211> 20
      <212> PRT
45
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
50
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
55
      <400>99
```

```
Xaa Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Val
      <210> 100
 5
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
10
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
15
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
      Xaa Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 10 15
      Glu Ser Asp Val
20
      <210> 101
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
25
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
30
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
35
      <400> 101
      Xaa Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 15
      Asp Val
40
      <210> 102
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
45
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
50
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 102
```

```
Xaa Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 10 15
      Ser Asp Val
      <210> 103
      <211> 19
 5
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
10
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
15
      <400> 103
      Xaa Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu 1 5 10 15 ^{\circ}
      Ser Asp Val
      <210> 104
20
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
25
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
30
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Gly modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 104
35
      Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu 1 10 15
      Ser Asp Val
      <210> 105
40
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
45
      <223> Péptido sintético
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
50
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 105
```

```
Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile 1 5 10 15
      Glu Ser Asp Val
      <210> 106
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
10
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
15
      <400> 106
      Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 10 15
      Glu Ser Asp Val
20
      <210> 107
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
25
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
30
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 107
35
      Xaa Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
      Asp Val
      <210> 108
40
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
45
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
50
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 108
```

```
Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu 1 5 10 15
      Ser Asp Val
      <210> 109
      <211> 19
 5
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
10
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
15
      <400> 109
      Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
20
      <210> 110
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
25
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
30
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Gly modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
35
      <400> 110
      Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
      <210> 111
40
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
45
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
50
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 111
      Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Val
55
```

```
<210> 112
      <211> 20
      <212> PRT
 5
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
10
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
      <400> 112
15
      Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Val
      <210> 113
20
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
25
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
30
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 113
35
      Xaa Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 15
      Asp Val
      <210> 114
      <211> 19
40
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
45
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
50
      <400> 114
      Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
```

55

<210> 115

```
<211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
 5
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
10
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
      <400> 115
      Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
15
      <210> 116
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
20
      <220>
      <223> Péptido sintético
25
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
30
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 116
      Xaa Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Val
35
      <210> 117
      <211> 21
      <212> PRT
      <213> Artificial
40
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <221> CARACTERÍSTICA MISC
45
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 117
50
      Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser
      Ile Glu Ser Asp Val
      <210> 118
      <211> 21
      <212> PRT
55
```

```
<213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
 5
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
10
      <400> 118
      ·Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser 1 10 15
       Ile Glu Ser Asp Val
      <210> 119
15
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
20
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
25
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 119
30
      Xaa Arg Ala Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 15
      Glu Ser Asp Val
      <210> 120
      <211> 21
35
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
40
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
45
      <400> 120
      Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser
      Ile Glu Ser Asp Val
      <210> 121
50
      <211> 21
      <212> PRT
      <213> Artificial
```

```
<220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
 5
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
      <400> 121
10
      Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser 1 10 15
      Ile Glu Ser Asp Val
      <210> 122
      <211> 19
15
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
20
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
25
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 122
      Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
30
      <210> 123
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
35
      <220>
      <223> Péptido sintético
40
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 123
45
      Xaa Arg Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Val
      <210> 124
50
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
```

<223> Péptido sintético

```
<220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
 5
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
      <400> 124
      Xaa Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Val
10
      <210> 125
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Artificial
15
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
20
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
25
      <400> 125
      Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
      Ser Asp Val
      <210> 126
30
      <211> 20
      <212> PRT
      <213> Artificial
35
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
40
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 126
      Xaa Arg Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile 1 \phantom{0} 5 \phantom{0} 10 \phantom{0} 15
      Glu Ser Asp Val
45
      <210> 127
      <211> 20
      <212> PRT
50
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
55
      <220>
```

```
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
      <400> 127
      Xaa Arg Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
      Glu Ser Asp Val
      <210> 128
10
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
15
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
20
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 128
25
      Xaa Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp
      Val
      <210> 129
30
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
35
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
40
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 129
      Xaa Arg Arg Pro Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 15
      Asp Val
45
      <210> 130
      <211> 18
      <212> PRT
      <213> Artificial
50
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
55
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
```

<223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr

```
<400> 130
      Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
      Asp Val
 5
      <210> 131
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> Artificial
10
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
15
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es una Arg modificada con una molécula de biotina u otro resto capador que incluye, pero no se limita a,
      H, acetilo, bezoilo, grupo alquilo (alifático), grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, espaciador alquilo co
      biotina, (5,6)-FAM.
      <400> 131
20
      Xaa Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp
                                                 10
      Val
      <210> 132
      <211> 18
25
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
30
      <223> Péptido sintético
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
35
      <223> Xaa es piroglutamato
      <400> 132
      Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
      Asp Val
40
      <210> 133
      <211> 18
      <212> PRT
45
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
      <220>
50
      <221> CARACTERÍSTICA_MISC
      <222> (1)..(1)
      <223> Xaa es un aminoácido distinto de Tyr
```

<400> 133

```
Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser 1 10 15
      Asp Val
      <210> 134
      <211> 5
 5
      <212> PRT
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido sintético
10
      <400> 134
      Gly Ser Ser Ser Ser
15
      <210> 135
      <211> 11
      <212> PRT
      <213> Artificial
20
      <223> Péptido de internalización sintético
      <400> 135
       Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg 1
25
      <210> 136
      <211> 10
      <212> PRT
30
      <213> Artificial
      <220>
      <223> Péptido de internalización sintético
      <400> 136
35
       Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg 10
```

REIVINDICACIONES

- 1. Un péptido quimérico aislado, en donde el péptido quimérico comprende un péptido activo que inhibe la unión de PSD-95 a un receptor de NMDA y un péptido de internalización que promueve la absorción del péptido quimérico en las células y tiene una capacidad reducida para unirse a un canal de calcio de tipo N con respecto al péptido tat YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1), en donde el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende [T/S]-X[V/L] (SEQ ID NO: 14), opcionalmente, [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID NO: 5) y el péptido de internalización tiene una secuencia de aminoácidos que comprende XGRKKRRQRRR (SEC ID NO: 2), en donde X es un aminoácido distinto de Y o nada.
- 2. El péptido quimérico aislado de la reivindicación 1, en donde X es F (SEQ ID NO: 135).

5

15

40

- 10 3. El péptido quimérico aislado de la reivindicación 1, en donde el péptido de internalización consiste en GRKKRRQRRRP (SEC ID NO: 3).
 - 4. El péptido quimérico aislado de la reivindicación 1, en donde el péptido activo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de ESDV (SEQ ID NO: 6), ESEV (SEQ ID NO: 7), ETDV (SEQ ID NO: 8), ETEV (SEC ID NO: 9), DTDV (SEQ ID NO: 10), DTEV (SEQ ID NO: 11), preferiblemente, KLSSIESDV (SEQ ID NO: 12) o KLSSIETDV (SEQ ID NO: 13).
 - 5. El péptido quimérico aislado de la reivindicación 1, en donde el péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 19) o FGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID NO: 16).
- 6. Una composición farmacéutica que comprende el péptido quimérico aislado de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
 - 7. Un péptido quimérico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en el tratamiento de los efectos dañinos del accidente cerebrovascular en un paciente que tiene o está en riesgo de accidente cerebrovascular u otra lesión en el SNC.
- 8. El péptido quimérico de la reivindicación 7, en donde la dosis eficaz es una única dosis de 0,05 a 500 mg, opcionalmente de 0,1 a 100 mg, 0,5 a 50 mg, o 1-20 mg del péptido.
 - 9. El péptido quimérico de la reivindicación 7, en donde el paciente tiene accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico, una susceptibilidad por encima de la normal a los efectos secundarios mediados por los canales de calcio de tipo N, o el paciente tiene una presión arterial normal o por debajo de la normal.
- 30 10. Un agente quimérico aislado, en donde el agente quimérico comprende un agente activo y un péptido de internalización que promueve la absorción del agente quimérico en las células, en donde el péptido de internalización es una variante del péptido tat YGRKKRQRRR (SEQ ID NO: 1) en el que la Y N-terminal está sustituida por F y que tiene una capacidad reducida para unirse a un canal de calcio de tipo N con respecto al péptido TAT, en donde el agente activo es un agente activo mostrado en la Tabla 5.
- 11. Un péptido de internalización aislado que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), en donde X es F.
 - 12. Un agente activo mostrado en la Tabla 5 que tiene una actividad intracelular eficaz para tratar una enfermedad ligada a un péptido variante de tat que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), en donde X es un aminoácido distinto de Y, o nada y el péptido tat tiene una capacidad reducida para unirse a un canal de calcio de tipo N con respecto al péptido tat YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1) para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente que tiene una susceptibilidad por encima de la normal a los efectos secundarios mediados por los canales de calcio de tipo N.
 - 13. El agente activo de acuerdo con la reivindicación 12 ligado al péptido variante de tat de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el paciente tiene una presión arterial por debajo de la normal.

Figura 1A:

Núm. Ca	et. DIANA	LOTE [®]	SIT.	n=	CONC.	↑% INHIBICIÓN		
							00 -50 0 50 	
200510	Adenosina A ₁	151494	hum	2	10 µМ	-8		
200610	Adenosina A _{2A}	151495	huin	2	10 µM	0		
200720	Adenosina A ₃	151503	hum	2	10 µM	-22		
203500	Adrenérgico &1 No Selectivo	151722	rata	2	10 µM	-19		
203900	Adrenérgico o 2 No Selectivo	151551	rata	2	10 µM	-5	d	
204010	Adrenérgico β1	151527	hum	2	10 µM	8	1	
205000	Anafilatoxina C5a	151609	hum	2	10 µM	15		
210110	Angiotensina AT ₂	151781	hum	2	10 µM	12		
226700	Benzodiazepina, Periférica	151814	rata	2	10 µM	-17		
212610	Bradiquinina B ₂	151530	hum	2	10 µM	-7	1	
214510	Canal de calció de tipo L, Benzodiazepina	151496	rata	2	10 µM	6	ľ	
214600	Canal de calcio de tipo L, dihidropiridina	151497	rata	2	10 µM	5	•	
215000	Canal de calcio de tipo L, fenilalquilamina	151498	rata	2	10 µM	4	ľ	
216000	Canal de calcio de tipo N	151744	rata	2	10 µM	108		
217500	Quimiocina CCR1	151506	hum	2	10 µM	-15	1	
244500	Quimiocina CXCR2 (IL-8Ra)	152328	hum	2	10 µM	77		
218010	Colecistocinina CCK ₁ (CCK _x)	152108	hum	2	10 µM	-11	a]	
219100	Colchicina	151615	rata	2	10 µM	-10	a j	
219500	Dopamina D1	151531	hum	2	10 µM	2	ļı .	
219700	Dopamina D ₂₅	151533	hum	2	10 µM	- 1	ŀ	
224010	Endotelina ET _A	151508	hum	2	10 µM	1	h	
226500	GABA _A , Sitio Agonista	151572	rata	2	10 µM	2	· I	
226600	GABA, Benzodiazepina, Central	152561	rata	2	10 µM	12	•	
226810	GABA, Canal Cloruro, TBOB	151537	rata	2	10 µM	4	ľ	
228510	GABA _A , No Selectivo	151952	rata	2	10 µM	۰	- 1	
228600	GABA _{61A}	151853	hum	2	10 µM	-11	oļ	
228700	GABA 818	151575	hum	2	10 µM	27		
231600	Galanina GAL2	152193	hum	2	10 µM	-22		
232600	Glutamato, AMPA	151576	rata	2	10 µM	-2	ı)	

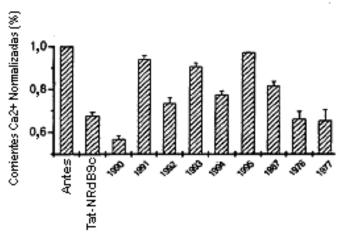
Núm. Cat. DIANA		LOTE	SIT. n= CONC.		†% INHIBICIÓN				
						% J	. 1 1		100
232700	Glutamato, Kainato	151577	rata	2	10 µM	-12			
232810	Glutamato, NMDA, Agonismo	151578	rata	2	10 µM	6		ı	
232910	Glutamato, NMDA, Glicina	151579	rata	2	10 µM	10	l li		
233000	Glutamato, NMDA, Feniloididina	151580	rata	2	10 µM	-21			
234000	Glutamato, NMDA, Poliamina	151619	rata	2	10 µM	28	l		
235010	Glutamato, No Selectivo	152191	rata	2	10 µM	22	Į.		
239000	Glicina, Sensible a Estricnina	151620	rata	2	10 µM	18	- 1		
239610	Histamina H ₁	151538	hum	2	10 µM	2	l		
239710	Histamina H ₂	151539	humi	2	10 µM	٥			
239810	Histamina H ₈	151540	hum	2	10 µM	-28			
239900	Histamina H ₄	151541	hum	2	10 µM	-11			
241000	lmidazolina I ₂ , Central	151581	rata	2	10 µM	-17			
241100	lmidazolina I ₂ , Periferica	152162	rata	2	10 µM	5	l l	ı	
243510	Interleucina IL-1	151547	ratón	2	10 µM	3	l		
243700	Interleucina IL-2	151710	ratón	2	10 µM	6	į.		
244100	Interleucina IL-6	151711	hum	2	10 µM	-10	8		
252610	Muscarínico M ₁	151513	hum	2	10 µM	8	ļ	ı	
252710	Muscarínico M ₂	151514	hum	2	10 µM	4	ļ		
252810	Muscarínico Mg	151515	hum	2	10 µM	-25			
257010	Neuropéptido Y Y ₁	151516	hum	2	10 µM	٥			
257110	Neuropéptido Y Y ₂	151517	hum	2	10 µM	6	ı	ì	
258010	Neurotensina NT ₁	152160	hum	2	10 µM	28			ı
260110	Opiáceoδ (OP1, DOP)	151542	hum	2	10 µM	-4	- 4		
260210	Opiáceo≮(OP2, KOP)	151543	hum	2	10 µM	5	1		
260410	Opiáceoμ(OP3, MOP)	151544	hum	2	10 µM	4	ļ.		
260600	Orfanina ORL ₁	152161	hum	2	10 µM	43			
265800	Canal de Potasio [5K _{CA}]	151632	rata	2	10 µM	17	1		
265900	Canal de Potasio HERG	151518	hum	2	10 µM	7	ļ	l	
271110	Serotonina (5- Hidroxitriptamina) 5-HT _{IA}	151594	hum	2	10 µM	-12			
271650	Serotonina (5- Hidroxitriptamina) 5-HT _{2A}	151502	hum	2	10 µМ	'	1		

Fig. 1B

Núm. Ca	at. DIANA	LOTE	SIT.	n=	CONC.	1% %	INHIBICIÓN	100
271910	Serotonina (5- Hidroxitriptamina) 5-HT3	151598	hum	2	10 µМ	-4		
272100	Serotonina (5- Hidroxitriptamina) 5-HT _{5A}	151601	hum	2	10 µM	-12	•	١
272200	Serotonina (5- Hidroxitriptamina) 5-HT ₄	151602	hum	2	10 µM	-3	1	
279510	Canal de Sodio, Sitio 2	151606	rata	2	10 µM	-2	ı	-1
226400	Transportador, GABA	151536	rata	2	10 µM	6	ı	1
239100	Transportador, Glicina	152079	rata	2	10 µM	-8	ıi .	- 1
287010	Péptido Intestinal Vasoactivo VIP ₁	151520	hum	2	10 µM	-1	1	-
287520	Vasopresina V _{IA}	151649	hum	2	10 µM	3	l l	-1

Fig. 1C

Figura 2:



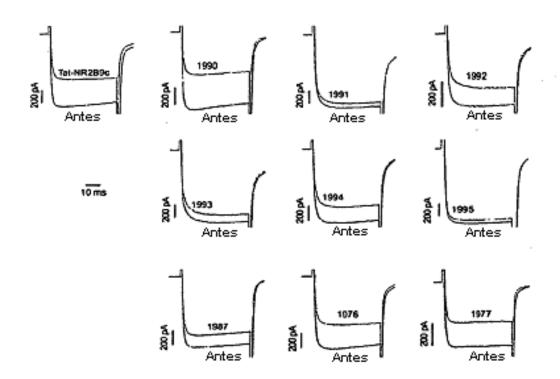


Fig. 3A Infusion con cirugía 3PVO una hora después

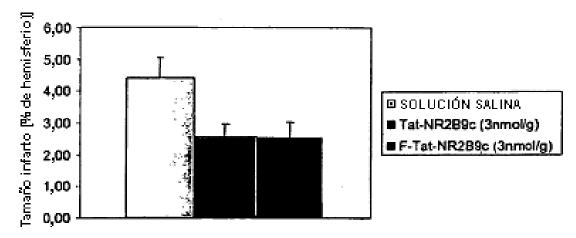
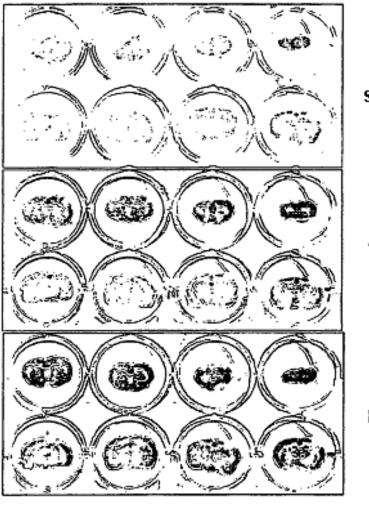


Figura 3B:

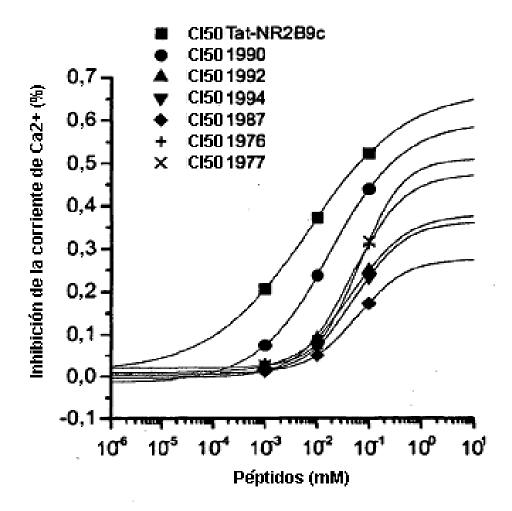


Solución salina

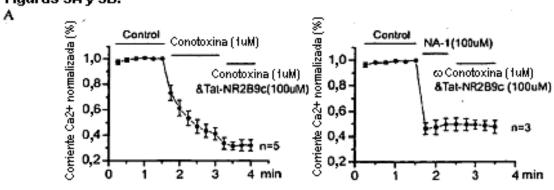
Tat-NR2B9c 3nmol/g

F-Tat-NR2B9c 3nmol/g

Figura 4:



Figuras 5A y 5B:



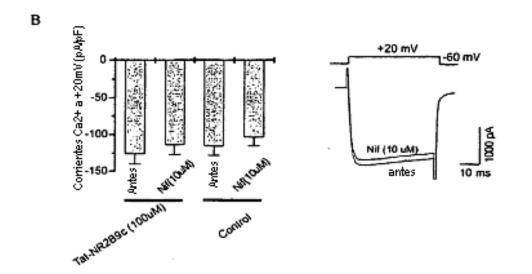


Figura 6:

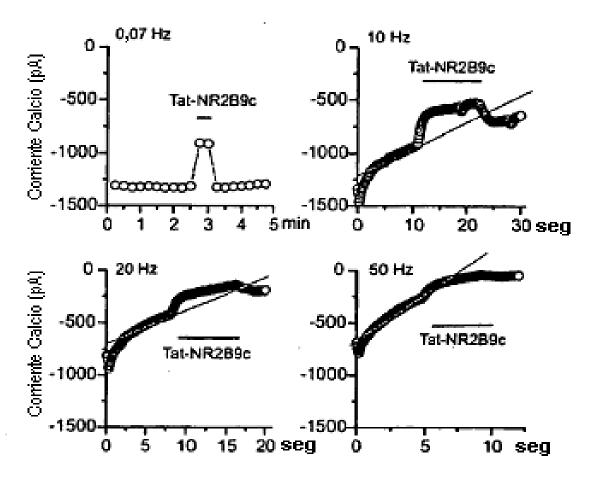


Figura 7:

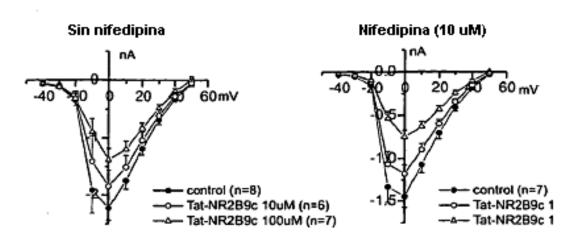


Figura 8:

