

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 306**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2009 E 09747499 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2307035**

54 Título: **Uso de un inhibidor de psd-95 tratamiento para la epilepsia**

30 Prioridad:

16.05.2008 US 54109 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:

**GURD, JAMES;
DYKSTRA, CRYSTAL y
TYMIANSKI, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 446 306 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de un inhibidor de psd-95 tratamiento para la epilepsia

FUNDAMENTO DE LA INVENCION.

5 La epilepsia es un trastorno neurológico caracterizado por las convulsiones recurrentes, no provocadas (Blume et al., *Epilepsia* 2001; 42:1212 - 1218). Estas convulsiones son los signos y/o síntomas transitorios debidos a la actividad neuronal anómala, excesiva o sincrónica en el cerebro (Fisher et al., *Epilepsia* 46 (4): 470-2). La epilepsia no ha de entenderse como un trastorno individual, sino más bien como un grupo de síndromes con síntomas ampliamente divergentes, pero todos ellos implicando episodios de actividad eléctrica anómala en el cerebro. Es uno de los trastornos neurológicos graves más comunes en los Estados Unidos y con frecuencia requiere tratamiento a largo plazo. Cada año 150.000 personas en los Estados Unidos han sido diagnosticadas de epilepsia, con una incidencia acumulada durante toda la vida próxima al 3 % (Hauser et al., *Epilepsia* 1991; 32: 429 - 445; Begley et al., *Epilepsia* 1994; 35: 1230 - 1243). La incidencia es máxima durante el primer año de vida y en las personas de edad avanzada. Id. Del 30 % a 40 % de los pacientes siguen teniendo convulsiones a pesar de usar medicamentos antiepilépticos existentes, bien sea solos o en combinación (Kwan et al., *N. Engl. J. Med.* 2000; 342: 314 - 319). Los pacientes con convulsiones no controladas experimentan una morbilidad y una mortalidad significativas y también se enfrentan al estigma y la discriminación sociales.

20 Los fármacos antiepilépticos conocidos incluyen medicamentos "tradicionales" tales como el fenobarbital, primidona, fenitoína, carbamazepina y valproato, así como nuevos fármacos antiepilépticos que inducen bloqueo de los canales de iones dependiente del voltaje, la mejora de la neurotransmisión inhibitoria, y/o la reducción de la neurotransmisión excitadora. Los ejemplos incluyen el antagonismo de glutamato en los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (por ejemplo felbamato) y receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) (p. ej. felbamato, topiramato) y la inhibición de la reabsorción de ácido γ -aminobutírico (GABA) en neuronas y astrocitos (p. ej. tiagabina).

25 La proteína de densidad postsináptica 95 (PSD- 95) acopla NMDARs a las rutas que median la excitotoxicidad y el daño cerebral isquémico (Aarts et al., *Science* 298, 846 - 850 (2002)). Este acoplamiento se interrumpió por la transducción de las neuronas con péptidos que se unen a dominios modulares en cualquier lado del complejo de interacción PSD-95/NMDAR. Este tratamiento atenuó la señalización aguas abajo de NMDAR sin bloquear la actividad de NMDAR, protegió las neuronas corticales cultivadas de las agresiones excitotóxicas y redujo el volumen del infarto cerebral en ratas sometidas a isquemia cerebral focal transitoria. Este resultado ha dado lugar a la propuesta de usar antagonistas peptídicos de PSD-95/NMDAR para tratar la apoplejía y otras enfermedades mediadas por la excitotoxicidad. No se han observado efectos secundarios significativos en ensayos de fase I de tal antagonista.

35 El documento US 20060148711 discute polipéptidos de fusión en los cuales varios péptidos PL, uno de los cuales es el 9 aminoácidos C-terminal de Tax, están unidos a un resto transportador tat para la inhibición de interacciones PDZ:PL en el tratamiento de varios trastornos neurológicos, uno de los cuales es la epilepsia.

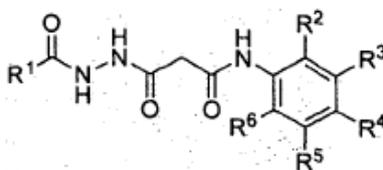
El documento EP1884521 A1 discute proteínas de fusión que incluyen TAT-NR2B9c para el tratamiento de varios trastornos asociados con el daño a las neuronas, uno de los cuales es la epilepsia.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

40 La presente invención proporciona un inhibidor de PSD-95 que bloquea la unión de un ligando de unión de PDZ a un dominio PDZ de PSD-95 para ser usado en el tratamiento de la epilepsia, en donde el inhibidor es administrado al menos aproximadamente una hora después de la terminación de un episodio de epilepsia. La memoria descriptiva también describe métodos de tratamiento o de profilaxis de un paciente que tiene epilepsia, o está en riesgo de desarrollar sus síntomas, que comprende administrar al paciente un régimen efectivo de un agente que inhibe la unión específica de dominios PDZ de PSD - 95 a un ligando de unión de PDZ (también llamado "PL"), p. ej. un receptor de NMDA. Opcionalmente, el agente es un péptido quimérico que comprende un péptido activo que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en 3 a 25 aminoácidos a partir del término C de un receptor de NMDA o un dominio PDZ 1 y/o 2 de un receptor de PSD-95 enlazado a un péptido de internalización. Opcionalmente, el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende [E/D/N/Q] - [S/T] - [D/E/Q/N] - [V/L]. Opcionalmente, el péptido activo comprende una secuencia de aminoácidos carboxilo terminal elegida del grupo que consiste en ESDV (SEQ ID NO: 1), ESEV (SEQ ID NO: 2), ETDV (SEQ ID NO: 3), TEVE (SEQ ID NO: 4), DTDV (SEQ ID NO: 5), DTEV (SEQ ID NO: 6). Opcionalmente, el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende KLSSIEDV (SEQ ID NO: 7). Opcionalmente, el péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende YGRKKRRRQRRLKSSIEDV (SEC ID NO: 8). Opcionalmente, el péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en YGRKKRRRQRRLKSSIEDV (SEC ID NO: 8). Opcionalmente, el péptido activo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende KLSSIESDV (SEQ ID NO: 9). Opcionalmente, el

péptido quimérico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 10). Opcionalmente, la secuencia de aminoácidos consiste en YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 10).

La memoria describe también un método de tratamiento de la epilepsia que comprende la administración de un régimen efectivo de un inhibidor de PSD-95 que bloquea la unión de un ligando de unión de PDZ a un dominio PDZ de PSD-95. Opcionalmente, el dominio PDZ de PSD-95 es dominio PDZ 2 de PSD-95. Como se describe en el presente texto, el inhibidor puede ser administrado al menos aproximadamente una hora después del inicio de un episodio de epilepsia, por ejemplo al menos aproximadamente tres horas después de iniciarse un episodio de epilepsia. Esto puede ser especialmente adecuado cuando el episodio tiene una duración de menos de aproximadamente 10 minutos. De acuerdo con la presente invención, y como se especifica en las reivindicaciones, el inhibidor es administrado al menos aproximadamente una hora después de la finalización de un episodio de epilepsia. Por ejemplo, el inhibidor se administra al menos aproximadamente tres horas después de la finalización de un episodio de epilepsia. Si se desea, el inhibidor se administra no después de aproximadamente 1 semana, p. ej. no después de 1 día, después de la finalización de un episodio de epilepsia. Opcionalmente, el inhibidor es Tat-NR2B9c. Opcionalmente, el inhibidor es F-Tat-NR2B9c. Opcionalmente, el inhibidor tiene la estructura:



Por ejemplo, el inhibidor es 0625-0057. El inicio, la finalización y/o la duración del episodio de epilepsia pueden determinarse usando la electroencefalografía, p. ej. mediante monitorización electroencefalográfica por video (V - EEG).

De acuerdo con la presente invención como se especifica en las reivindicaciones, el agente puede ser administrado al menos una hora después de un episodio de epilepsia (p. ej. una convulsión). El agente puede ser administrado, por ejemplo, al menos aproximadamente tres, cuatro, cinco, seis, ocho, diez, doce, dieciséis o veinticuatro horas después de un episodio de epilepsia. El agente puede también administrarse días después del episodio de epilepsia, por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 o 12 días después de la iniciación. El agente puede también administrarse al menos una semana después del episodio de epilepsia, por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 2 o 3 semanas después del episodio. El inhibidor puede ser administrado después del episodio de epilepsia pero no más tarde de una o más horas, p. ej. no más tarde de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 18 o 24 horas después del episodio. El inhibidor puede ser administrado después del episodio de epilepsia pero no después de uno o más días, p. ej. no después de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 14 días después del episodio. El inhibidor puede ser administrado después del episodio de epilepsia, pero no más tarde de una o más semanas, p. ej. no después de aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5 o 3 semanas después del episodio.

El momento de la administración después de un episodio de epilepsia puede ser medido a partir del momento del inicio del episodio (p. ej. cuando el episodio es breve), o a partir del momento de la conclusión de un episodio (p. ej. cuando una convulsión epiléptica es de una duración más larga), o a partir de cualquier instante en el que se observan signos de actividad epiléptica en el cerebro.

Opcionalmente, el agente no se administra antes o durante un episodio de epilepsia. En otros casos, el agente se puede administrar también durante un episodio de epilepsia, p. ej. una convulsión.

Opcionalmente, el paciente está libre de enfermedades distintas de la epilepsia que requieren tratamiento con el antagonista. Opcionalmente, el paciente está libre de enfermedades distintas de la epilepsia mediadas por excitotoxicidad. Opcionalmente, el paciente está libre de accidente cerebrovascular. Opcionalmente, el paciente está libre de enfermedades mediadas por excitotoxicidad. Opcionalmente, el agente se administra en respuesta a que el paciente ha experimentado un evento que promueve la epilepsia. Opcionalmente, el paciente tiene un episodio de epilepsia aguda.

Opcionalmente, el régimen efectivo se administra respondiendo al diagnóstico de epilepsia en el paciente. Opcionalmente, se administra un segundo régimen efectivo para el tratamiento o que realiza profilaxis de la epilepsia. Opcionalmente, el segundo régimen comprende la administración de un segundo agente. Opcionalmente, el segundo régimen comprende un agente antiepiléptico o una combinación de agentes antiepilépticos.

En algunos procedimientos, el paciente es una persona. Opcionalmente, el agente es administrado por infusión intravenosa o subcutánea. Opcionalmente, el agente es administrado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable como una composición farmacéutica.

El paciente puede ser monitorizado para evaluar los efectos del tratamiento sobre un síntoma y/o signo de la epilepsia. Opcionalmente, el péptido quimérico se administra en una dosis de 0,05 a 500 mg, opcionalmente de 0,1 a 100 mg, de 0,5 a 50 mg, o de 1 a 20 mg.

5 En una realización que entra dentro del alcance de la presente invención como se especifica mediante las reivindicaciones, se proporciona una composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento de los síntomas de epilepsia en un paciente, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente como se define anteriormente. Opcionalmente, la composición farmacéutica lleva una etiqueta que indica la adecuación para tratar o efectuar la profilaxis de los síntomas de la epilepsia.

10 La memoria descriptiva proporciona además el uso de un agente como se definió anteriormente en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la realización de la profilaxis de la epilepsia.

En el presente texto se describen métodos para tratar o llevar a cabo la profilaxis de los síntomas de la epilepsia de un paciente que padece o que está en riesgo de epilepsia, que comprende administrar al paciente un régimen efectivo de un péptido tSXV enlazado a un péptido de internalización.

15 Opcionalmente, el régimen efectivo se administra después del diagnóstico de un síntoma de epilepsia en el paciente para aliviar el síntoma, o detener o inhibir un mayor desarrollo del síntoma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 Figura 1. Disminución de las células neuronales a lo largo del tiempo después de una convulsión epiléptica. (A) Vista de las secciones del cerebro que muestran el número de células teñidas usando anticuerpo NeuN (específico de la neurona) en ratas naïve (no sometidas a experimentación antes) y ratas a 3, 24 y 3 días después de la inducción de convulsiones epilépticas. (B) Evolución cuantitativa en el tiempo de la densidad de células NeuN-positivas después de la terminación de las convulsiones epilépticas (estado epiléptico).

25 Figura 2. (A) Disminución de las células neuronales en varias porciones del hipocampo y en varios momentos después del ataque epiléptico. Para cada región, las columnas de izquierda a derecha indican tanto por ciento de células NeuN-positivas (en comparación con el control) en el control, a las 3 horas, a las 6 horas, a las 12 horas, el día 1, a los 3 días, a los 7 días, a los 14 días y a los 90 días después de un ataque epiléptico. (B) Tiene lugar una pérdida celular rápida y severa en otras regiones del cerebro. Había un total de 4-8 animales en cada grupo.

Figura 3. Patrones temporales de la neurodegeneración al cabo de 60 minutos de estado epiléptico. Los valores se expresan como densidad celular (n° de células/mm³) \pm desviación estándar. Cada grupo tenía al menos 4 animales.

30 Figura 4. (A) Tat- NR2B9c pero no Tat-NR2BAA es neuroprotector en la región CA1 anterior del hipocampo. Cada punto representa un animal individual. Un guión representa una media del grupo. (B) Tat-NR2B9c era neuroprotector cuando se administra después del ataque epiléptico, pero no durante el mismo.

35 Figura 5. Tat-NR2B9c confirió neuroprotección dependiente de la dosis cuando se administró 3 horas después del ataque epiléptico, pero no durante el mismo. Columnas 1 y 2: ficticias (ratas en las que no se indujeron convulsiones epilépticas) y ratas inducidas por convulsiones administradas con solución salina, respectivamente. Las columnas 3, 4, 5 : Tat-NR2B9c administrado 10 minutos después de la iniciación de SE, a una dosis de 0,3 nmol/g, 3 nmol/g y 9 nmol/g, respectivamente. Columna 6: 3 nmol/g de Tat- NR2B9c administrado 3 horas después de la terminación de la SE.

40 Figura 6. Evolución con el tiempo de la pérdida de células neuronales (NeuN-positivas) a lo largo de 1, 3, 7 y 14 días después de la inducción de un estado de crisis epiléptica continua durante 60 minutos en animales que no fueron tratados con Tat-NR2B9c. Se muestra a la izquierda el aumento 400 X de las secciones del cerebro. El gráfico de la columna representa el número total de células NeuN-positivas por campo \pm la desviación estándar en instantes.

45 Figura 7. Evolución con el tiempo de la pérdida de células neuronales (NeuN-positivas) a los 7 días después de la inducción de un estado de convulsión epiléptica continua durante 60 minutos en animales que fueron tratados con Tat-NR2B9c durante el estado epiléptico. Se muestra a la izquierda aumento x 400 de secciones del cerebro. El gráfico de la columna representa el número total de células NeuN-positivas por campo \pm la desviación estándar a diferentes concentraciones de Tat-NR2B9c.

50 Figura 8. Evolución con el tiempo de la pérdida de células neuronales (NeuN-positivas) después de la inducción de ataques epilépticos en ratas, que fueron después tratadas con Tat-NR2B9c tres horas después del ataque epiléptico. Se muestra a la izquierda una vista de las secciones del cerebro inmuno-teñido a bajo aumento. El gráfico de la columna representa el número total de células NeuN-positivas por campo \pm la desviación estándar después de 14 días de recuperación a diferentes concentraciones de Tat-NR2B9c.

Figura 9. Neuroprotección de Tat-NR2B9c cerca del borde subicular de la región CA1. Tat-NR2B9c aumentó el número de células neuronales supervivientes en comparación con los animales tratados con solución salina, mientras que Tat-NR2BAA no lo hizo.

Figura 10. Tat - NR2B9c confiere neuroprotección en la región CA4 mientras que Tat-NR2BAA no lo hace.

5 Figura 11. Cambios volumétricos en el hipocampo y los ventrículos laterales 14 días después de SE en ratas dejadas sin tratar (control) o tratadas a las 3 horas después de SE con Tat-NR2B9c (0,3 nmol/g y 3 nmol/gm), con una comparación paralela de secciones Nissl teñidas.

Figura 12. Tat- NR2B9c reduce el deterioro cognitivo provocado por el estado epiléptico en ratas. A las 8 semanas posteriores a SE, los animales se pusieron en el laberinto en cruz elevado durante 5 minutos y se grabaron en vídeo.

10 Figura 13. Memoria visual-espacial según los ensayos en el laberinto de agua de Morris a las 8 semanas posteriores a SE para detectar el deterioro cognitivo crónico. El tratamiento con Tat-NR2B9c mejora el rendimiento de latencia de escape, especialmente durante los 5 días iniciales de aprendizaje de adquisición.

Figura 14. Mapa del cerebro y varias áreas dentro del cerebro.

DEFINICIONES

15 Un "polipéptido quimérico" se refiere a un polipéptido compuesto, es decir, una secuencia de aminoácidos contigua simple, constituida por dos (o más) polipéptidos heterólogos distintos, 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 (p. ej. al menos el 60 %) con la proteína sináptica del cerebro PSD-95, la proteína de unión septada *Drosophila discs large* (DLG), y la proteína de unión firme epitelial proteína de la zonula occludens-1 (ZOL). Los dominios PDZ son también conocidos como regiones homólogas DLG ("DHRS") y repeticiones GLGF (SEC ID NO: 11). Los dominios PDZ parecen generalmente mantener un núcleo de secuencia de consenso (Doyle, D. A., 1996, Cell 85: 1067-1076). Proteínas que contienen el dominio PDZ ejemplares y secuencias de dominio PDZ se describen en el documento 2006-0148711 A1, que se incorpora al presente texto como referencia en su totalidad.

El término "proteína PL" o "proteína ligando PDZ" se refiere a una proteína de origen natural que forma un complejo molecular con un dominio PDZ, o a una proteína cuyo término carboxi, cuando se expresa separadamente de la proteína de longitud completa (p. ej. como un fragmento de péptido de 3 a 25 restos, p. ej. 3, 4, 5, 8, 10, 12, 14 o 16 restos), forma tal complejo molecular. El complejo molecular se puede observar *in vitro* utilizando el "ensayo A" o "ensayo G" descrito, p. ej., en el documento US 2006-0148711 A1 o *in vivo*.

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

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

Los términos "aislado" o "purificado" significan que la especie objetivo (p. ej. un péptido) ha sido purificada de los contaminantes que están presentes en una muestra, tal como una muestra obtenida de fuentes naturales que contienen la especie objetivo. Si una especie objetivo es aislada o purificada, es la especie macromolecular predominante (p. ej. polipéptido) presente en una muestra (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente la especie objetivo 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 comprende más del 80 al 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en una composición. Lo más preferiblemente, la especie objetivo se purifica hasta homogeneidad esencial (es decir, no pueden ser detectadas especies contaminantes en la composición por métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Un "peptidomimético" se refiere a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de un péptido de la invención. El peptidomimético puede contener análogos de aminoácidos completamente sintéticos, no naturales, o es una molécula quimérica de aminoácidos de péptidos en parte naturales y en parte análogos de aminoácidos no naturales. El peptidomimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales, siempre y cuando tales

sustituciones no alteren tampoco sustancialmente la estructura del mimético y/o la actividad inhibitora o de unión. Composiciones miméticas de polipéptido pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son típicamente de tres grupos estructurales: a) grupos de enlace de restos distintos del enlace amida natural ("enlace peptídico"); b) restos no naturales en vez de restos de aminoácidos de origen natural, o c) restos que inducen mimetismo estructural secundario, es decir, inducir o estabilizar una estructura secundaria, p. ej. un giro beta, giro gamma, lámina beta, conformación de hélice alfa, y similares.

La expresión "unión específica" se refiere a la unión entre dos moléculas, p. ej. 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 moléculas diversas, es decir, para mostrar la unión preferencial de una molécula por otra en una mezcla heterogénea de moléculas. La unión específica de un ligando a un receptor se evidencia también por la unión al receptor reducida de un ligando marcado de forma detectable en presencia de ligando no marcado en exceso (es decir, un ensayo de competición de unión).

Estadísticamente significativo se refiere a un valor de p que es $< 0,05$, preferiblemente $< 0,01$ y lo más preferiblemente $< 0,001$.

"Paciente" se refiere a personas, animales domésticos (p. ej. gatos, perros), animales de granja (p. ej. pollos, vacas, ovejas, caballos, cerdos), y animales de laboratorio (p. ej. ratas, ratones).

El término "anticuerpo" se usa incluyendo anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que se derivan y con otros anticuerpos de unión específica a un antígeno.

El término "agente" se utiliza 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 la actividad farmacológica pero que están sometidos a una evaluación terapéutica posterior, y compuestos que son miembros de colecciones y bibliotecas que se han de cribar en relación con una actividad farmacológica. El término incluye una sustancia química orgánica o inorgánica tal como un péptido, incluyendo anticuerpos, proteínas y moléculas pequeñas (menos de 500 D) y productos naturales.

El término "síntoma" o "síntoma clínico" incluye la evidencia subjetiva de una enfermedad, tal como un aura, según es percibido por el paciente, así como la evidencia objetiva de una enfermedad según es observado por un médico, p. ej. la actividad neurológica epiléptica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. GENERAL

Se ha hecho el sorprendente descubrimiento de que los inhibidores de unión de proteínas PDZ a uno o más PLs son terapéuticos en la epilepsia. Por ejemplo tales inhibidores pueden reducir el daño neuronal causado por la epilepsia. El inhibidor puede ser un inhibidor de la unión de PSD-95 a una PL. En un aspecto, el inhibidor es efectivo para reducir la muerte de las células neuronales que se produce después de un episodio de epilepsia (p. ej. una convulsión).

La invención proporciona un inhibidor de PSD-95 que bloquea la unión de un ligando de unión de PDZ a un dominio PDZ de PSD-95 para su uso en el tratamiento de la epilepsia, en donde el inhibidor es administrado al menos aproximadamente una hora después de la finalización de un episodio de epilepsia. La invención proporciona, como se especifica en las reivindicaciones, agentes útiles para tratar o efectuar la profilaxis de los síntomas de la epilepsia. La invención se basa en parte en resultados descritos en los ejemplos en los que se encontró que un antagonista de PSD-95 que interrumpe la unión específica de PSD-95 a NMDAR 2B reduce la epilepsia en un modelo en rata de este trastorno. La epilepsia se diferencia de otras enfermedades en las que se ha propuesto que serían útiles tales antagonistas en que no se sabe que la epilepsia sea conocida por ser el resultado de la excitotoxicidad. Aunque para la práctica de la invención no se requiere una comprensión del mecanismo, se cree que tales agentes de la invención actúan al menos en parte inhibiendo la interacción entre NMDAR (en particular NR2A, 2B, 2C y D) con proteína 95 de densidad postsináptica (es decir, inhibidores de la PSD-95). Los agentes pueden también inhibir las interacciones entre PSD-95 y nNOS (GenBank NM_008712). Los agentes pueden también inhibir las interacciones de miembros de la familia PSD-95 de SAP 102 (Muller, Neuron 17, 255 - 265 (1996)), SAP97 (GenBank NM_007862), y PSD93 (GenBank NM_0011807), así como proteína TIPL que contiene PDZ (GenBank NM_029564). Otros inhibidores que se pueden usar se describen en las solicitudes de los solicitantes pendientes en común con la presente solicitud de EE.UU. No.12/040.851 (publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° US 2008/0274977 A1) presentada el 29/02/2008, y 60/947883, presentada el 03/07/2007. También puede ser utilizado cualquier combinación o derivado adecuado de los inhibidores mencionados. Aunque

los métodos descritos en el presente texto pueden ser usados para cualquier forma de epilepsia, son particularmente útiles cuando se administran después de un episodio de epilepsia.

II. AGENTES

5 Los agentes incluyen péptidos quiméricos y peptidomiméticos que tienen al menos dos componentes. El primer componente es un péptido activo, que opcionalmente tiene una secuencia de aminoácidos que incluye o se basa en el motivo PL de un receptor de NMDA (es decir, un péptido PL) o dominio PDZ de PSD-95. Los péptidos activos
 10 útiles en la invención inhiben la interacción entre los dominios PDZ 1 y 2 de la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD - 95) (secuencia humana de aminoácidos proporcionada por Stathakism, Genomics 44 (1) :71 - 82 (1997)) y la secuencia de PL C - terminal de una o más subunidades del receptor 2 de NMDA, incluyendo la subunidad NR2B del receptor neuronal de N-metil-D-aspartato (Mandich et al., Genomics 22, 216 - 8 (1994)). NMDAR2B tiene ID 4099612 GenBank, una FNGSSNGHVYKLSIESDV C-terminal de 20 aminoácidos (SEC ID NO: 12) y un motivo PL de ESDV (SEC ID N °: 1). Sin embargo, la inhibición también se puede demostrar a partir de variantes de especie de las proteínas. Se presenta a continuación una lista de receptores de NMDA y de glutamato que se puede utilizar:

TABLA 1: RECEPTORES DE NMDA CON SECUENCIAS DE PL

TABLA 1: RECEPTORES DE NMDA CON SECUENCIAS PL

Nombre	Globo #	Secuencia 20mero C-terminal	Secuencia 4mero C-terminal	PL
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLSDPVSTVV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:14)	X
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLSDPVSTVV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:14)	X
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLSDPVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO:14)	X
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLSDPVSTVV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:14)	X
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLSDPVSTVV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:14)	X
NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID NO:15)	HRES (SEQ ID NO:16)	
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID NO:15)	HRES (SEQ ID NO:16)	
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISSESEV (SEQ ID NO:17)	ESEV (SEQ ID NO:2)	X
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYKLSIESDV (SEQ ID NO:12)	ESDV (SEQ ID NO:1)	X
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEQRTSRTCES (SEQ ID NO:18)	TCES (SEQ ID NO:19)	
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYKLSIESDV (SEQ ID NO:12)	ESDV (SEQ ID NO:1)	X
NMDAR2A	558748	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV (SEQ ID NO:20)	ESDV (SEQ ID NO:1)	X
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGSAAHFSSLESEV (SEQ ID NO:21)	ESEV (SEQ ID NO:2)	X

(continuación)

Nombre	Glo Acc#	Secuencia 20mero C-terminal	Secuencia 4mero C-terminal	PL
receptor delta 2 de glutamato	AF009014	QPTPTLGLNLGNPDRGTSI (SEQ ID NO 22)	GTSI (SEQ ID NO 23)	X
Receptor 1 de glutamato	128953	MQSIPCMSSHSSGMPLGATGL (SEQ ID NO 24)	ATGL (SEQ ID NO 25)	x
Receptor 2 de glutamato	L20814	QNFATYKEGYNVYGIKSVKI (SEQ ID NO 26)	SVKI (SEQ ID NO 27)	X
Receptor 3 de glutamato	AF 167332	QNYATYREGYNVYGTESVKI (SEQ ID NO 28)	SVKI (SEQ ID NO 27)	X
Receptor 4 de glutamato	U16129	HTGTAIRCSSGLAVIASOLP (SEQ ID NO 29)	SDLP (SEQ ID NO 30)	
Receptor 5 de glutamato	U16125	SFTSILTCHQRRTQRKETVA (SEQ ID NO 31)	ETVA (SEQ ID NO 32)	x
Receptor 6 de glutamato	U16126	EVINMHTFNDRRLPGKETMA (SEQ ID NO 33)	ETMA (SEQ ID NO 34)	x
Receptor 7 de glutamato	U16127	RRLPGKDSMACSTSLAPVFP (SEQ ID NO 35)	PVFP (SEQ ID NO 36)	

Algunos péptidos activos inhiben las interacciones entre PSD-95 y subunidades NMDAR múltiples. En tales casos, el uso del péptido no requiere necesariamente la comprensión de las contribuciones respectivas de los diferentes NMDARs a la neurotransmisión excitatoria. Otros péptidos activos son específicos para un NMDA único.

- 5 Los péptidos activos incluyen o se basan en un motivo PL del término C de cualquiera de las subunidades anteriores y tienen una secuencia de aminoácidos que comprende [S/T] - X - [V/L]. Esta secuencia se presenta preferiblemente en el término 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] en su término C. Los péptidos ejemplares comprenden: ESDV (SEC ID NO: 1), ESEV (SEC ID NO: 2), ESTV (SEC ID NO: 37), ETDV (SEC ID NO:3), TEVE (SEC ID NO: 4), DTDV (SEC ID NO: 5), y DTEV (SEC ID NO: 6) como los aminoácidos C-terminales. Dos péptidos particularmente preferidos son KLSSIESDV (SEC ID NO: 9), y KLSSIETDV (SEC ID NO: 7). Los péptidos de la invención sin un péptido de internalización por lo general tienen 3 a 25 aminoácidos, longitudes de péptido (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 término C de un receptor de NMDA.
- 10
- 15 Otros péptidos activos incluyen dominio 1 de PDZ y/o 2 de PSD-95 o un subfragmento de cualquiera de estos 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 1 de PDZ y/o el dominio 2 de PDZ de PSD-95, que se presentan dentro de aproximadamente los aminoácidos 65-248 de PSD-95 proporcionados por Stathakism, Genomics 44 (l) :71 - 82 (1997) (secuencia humana) o NP_031890.1, GL6681195 (secuencia de ratón) o regiones correspondientes de otras variantes de especie.
- 20

Cualquiera de los péptidos de la invención puede enlazarse, preferiblemente en su término N, a un péptido de internalización que facilita la translocación a través de la membrana plasmática de una célula. Los ejemplos de estos péptidos incluyen tat derivado de VIH (Vives et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 16010; Nagahara et al., 1998, Nat. Med. 4:1449), antennapedia de Drosophila (Derossi y col., 1994, J. Biol. Chem. 261: 10444), VP22 del virus del herpes simplex (Elliot y D'Hare, 1997, Cell 88: 223 - 233), regiones determinantes de complementariedad (CDR) 2 y 3 de anticuerpos anti-ADN (Avrameas et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 95: 5601 - 5606), proteína de choque térmico de 70 kDa (Fujihara, 1999, EMBO J. 18: 411 - 419) y transportano (Pooga et al., 1998, FASEB J. 12: 67 - 77). Por ejemplo, se puede utilizar el péptido de internalización de TAT YGRKKRRQRRR del VIH (SEC ID NO: 38). Dos péptidos preferidos que incluyen este péptido de internalización de Tat del VIH y un péptido activo son YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEC ID N °: 8, Tat - NR2B9C_(TDV)), y YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEC ID N °: 10, Tat - NR2B9C_(SDV)).

25

30

También pueden utilizarse variantes de la secuencia tat estándar YGRKKRRQRRR (SEC ID NO: 38). La solicitud 60/904507 pendiente en común con la presente, presentada el 02/03/2007 refiere que el péptido tat estándar se une e inhibe los canales del calcio de tipo N, la cual unión puede conducir a una variedad de efectos secundarios.

Aunque la práctica de la invención no depende de la comprensión de mecanismo, se cree que tanto la capacidad para atravesar las membranas como la unión a los canales de calcio de tat de tipo N son conferidas por la incidencia inusualmente alta de restos cargados positivamente Y, R y K en el péptido. Los péptidos variantes para uso en la invención deben conservar la capacidad para facilitar la absorción en las células, pero han de tener 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 (SEC ID NO: 39), en la que X es un aminoácido distinto de Y. Una variante tat preferida tiene el resto Y N-terminal sustituido con F. Así pues, se prefiere una variante tat que comprende o que consiste en FGRKKRRQRRR (SEC ID NO: 40). Otro péptido de internalización de variante tat preferido consiste en GRKKRRQRRR (SEC ID NO: 41). Si hay presentes restos adicionales que flanquean XGRKKRRQRRR (SEC ID NO: 39) (al lado del péptido activo) los restos pueden ser, p. ej. aminoácidos naturales que flanquean este segmento de una proteína tat, aminoácidos espaciadores o enlazadores de un tipo típicamente usado para unir dos dominios de péptidos, p. ej. Gly (Ser)₄ (SEC ID NO: 42), TGEKP (SEC ID NO: 43), GGRRGGS (SEC ID NO: 44), o LRQRDGERP (SEC ID NO: 45) (véase, p. ej., Tang et al. (1996), J. Biol. Chem. 271, 15682 - 15.686; Hennecke et al. (1998), Protein Eng. 11, 405-410)), o puede ser cualquier otro aminoácido que no reduzca detectablemente la capacidad para conferir la absorción de la variante sin los restos flanqueantes y no aumente de manera significativa la inhibición de los canales de calcio de tipo N con relación a la variante sin los restos flanqueantes. Preferiblemente, el número de aminoácidos flanqueantes distintos de un péptido activo no excede de diez a cada lado de XGRKKRRQRRR (SEC ID NO: 39). Preferiblemente, no hay presentes aminoácidos flanqueantes, y el péptido de internalización está enlazado en su término C directamente a un péptido activo.

Otras variantes de tat que se pueden utilizar para permitir la absorción de cualquiera de los péptidos activos de la invención para la inhibición de las interacciones de PSD-95 sin inhibir los canales de calcio de tipo N incluyen las presentadas en la Tabla 2 que sigue. Se recomienda que estos péptidos de internalización sean cribados para confirmar la absorción deseada y la falta de inhibición de los canales de calcio de tipo N. Se prevé en el presente texto que estas secuencias mantienen la capacidad de transporte sin inhibir los canales de calcio de tipo N y así permiten un mayor índice terapéutico para el tratamiento de la epilepsia.

TABLA 2

X-FGRKKRRQRRRXLSSIESDV (F-TatNR2B9c _(SDV) ; SEQ ID NOS:46-48)
X-GKKKKKQKKKKLSSIESDV (SEQ ID NOS:49-51)
X-RKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:52-54)
X-GAKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:55-57)
X-AKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:58-60)
X-GRKARRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:61-63)
X-RKARRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:64-66)
X-GRKKARQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:67-69)
X-RKKARQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:70-72)
X-GRKKRRQARRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:73-75)
X-RKKRRQARRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:76-78)
X-GRKKRRQRARKLSSIESDV (SEQ ID NOS:79-81)
X-RKKRRQRARKLSSIESDV (SEQ ID NOS:82-84)
X-RRPRRPRRPRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:85-87)
X-RRARRARRARRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:88-90)
X-RRRARRRARRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:91-93)
X-RRRPRRPRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:94-96)
X-RRPRRPRRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:97-99)
X-RRARRARRKLSSIESDV (SEQ ID NOS:100-102)

X puede representar un término amino libre, una molécula de biotina u otro resto casquete incluyendo, pero sibn limitarse a ellos, H, acetilo, benzoílo, un grupo alquilo (alifático), piroglutamato, un grupo alquilo con un grupo cicloalquilo en el extremo, biotina con espaciador de alquilo, o 5,6-carboxifluoresceína (5,6-FAM). El acoplamiento

químico del grupo de terminación o casquete con el péptido N-terminal puede ser a través de una química de amida, química de sulfamida, química de sulfona, química de alquilación. Además, X también puede ser un aminoácido distinto de la tirosina.

5 Los péptidos de internalización están normalmente enlazados con péptidos activos como péptidos de fusión, pero también pueden estar unidos mediante un enlace químico. El acoplamiento de los dos constituyentes puede realizarse a través de un agente de acoplamiento o de conjugación. Muchos de esos agentes están disponibles comercialmente y se revisan en por S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking (Química de la conjugación y entrecruzamiento de proteínas), CRC Press (1991). Algunos ejemplos de reactivos de entrecruzamiento incluyen 3-(2-piridilditio) propionato de J-succinimidilo (SPDP) o N, N' - (1,3-fenilen) bismaleimida; N,N'-etilen-bis-(yodoacetamida) u otro de tales reactivos que tienen de 6 a 11 puentes de carbono metileno (que es relativamente específico para grupos sulfhidrilo), y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (que forma enlaces irreversibles con grupos amino y tirosina). Otros reactivos de reticulación 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); fenol-1,4-disulfonilcloruro (que reacciona principalmente con grupos amino); hexametildiisocianato o diisotiocianato, o azofenil-p-diisocianato (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobenzidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

20 Los péptidos tales como los que se acaban de describir pueden ser opcionalmente derivatizados (p. ej. acetilados, fosforilados y/o glicosilados) para mejorar la afinidad de unión del inhibidor, para mejorar la capacidad del inhibidor para ser transportado a través de la membrana celular, o para mejorar la estabilidad. Como ejemplo específico, para inhibidores en los que el tercer resto del término C es S o T, este resto puede ser fosforilado antes de usar el péptido.

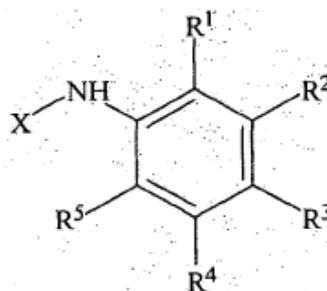
25 Los péptidos de la invención, opcionalmente fusionados con dominios de internalización, pueden ser sintetizados mediante síntesis en fase sólida o métodos recombinantes. Los peptidomiméticos pueden ser sintetizados usando una diversidad de procedimientos y metodologías descritas en la literatura científica y de patentes, p. ej. Organic Syntheses Collective Volumen, Gilman et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 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.

30 Los péptidos de la invención sin un péptido de internalización tienen generalmente de 3 a 25 aminoácidos, longitudes de péptido (también sin un péptido de internalización) de 5 a 10 aminoácidos, y de un modo particular se prefieren 9 aminoácidos.

35 La actividad farmacológica apropiada de los péptidos o peptidomiméticos se puede confirmar, si se desea, usando el modelo animal descrito en el presente texto. Opcionalmente, los péptidos o peptidomiméticos también pueden ser cribados en relación con la capacidad para inhibir las interacciones entre PSD-95 y NMDAR 2B usando ensayos descritos p. ej. en el documento USA 20050059597. Los péptidos útiles tienen típicamente unos valores de IC₅₀ inferiores a 50 μM, 25 μM, 10 μM, 0,1 μM o 0,01 μM en un ensayo tal. Los péptidos preferidos tienen típicamente un valor de IC₅₀ entre 0,001 y 1 μM, y más preferiblemente de 0,05 a 0,5 o de 0,05 a 0,1 μM.

40 Los péptidos tales como los que se acaban de describir, opcionalmente, pueden ser derivatizados (p. ej. acetilados, fosforilados y/o glicosilados) para mejorar la afinidad de unión del inhibidor, para mejorar la capacidad del inhibidor para ser transportado a través de una membrana celular o para mejorar la estabilidad. Como ejemplo específico, para inhibidores en los que el tercer resto del término C es S o T, este resto puede ser fosforilado antes de usar el péptido.

45 Los agentes incluyen también moléculas pequeñas que inhiben las interacciones entre PSD-95 y de NMDAR 2B, y/o otras interacciones descritas anteriormente. Se describen inhibidores de moléculas pequeñas adecuados en la Solicitud Internacional N ° PCT/US2006/062715 pendiente en común con la presente, que fue presentada el 29 de diciembre de 2005. Estas moléculas fueron identificadas mediante cribado in silico de una biblioteca de compuestos en relación con la unión a PSD-95, y la unión de los compuestos ejemplares fue verificada experimentalmente. Los compuestos adecuados incluyen compuestos que tienen la estructura general de P_o-ABCDE, donde D y E son opcionales, y P_o es:

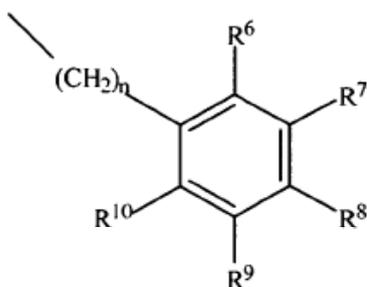


en donde uno de los grupos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , y R^5 es $-COOH$, y en donde el resto de los grupos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , y R^5 se elige entre el grupo que consiste en F , H , OCH_3 y CH_3 y X es $-A-B-C-D-E$, en donde A , B , C , D y E están conectados por medio de enlaces simples y

5 A se elige entre el grupo que consiste en $C = O$, NH , SO_2 y $(CH_2)_m$, en donde

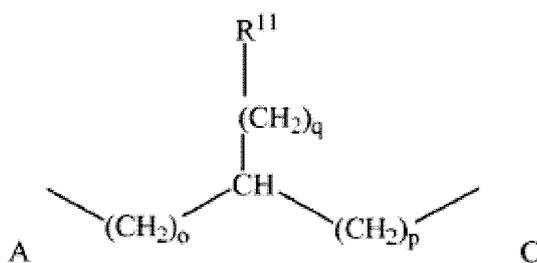
$m = 0, 1, 2, 3, 4$ o 5 ;

B es $-OCH_2-$, $C = O$,



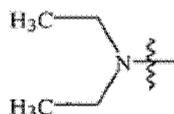
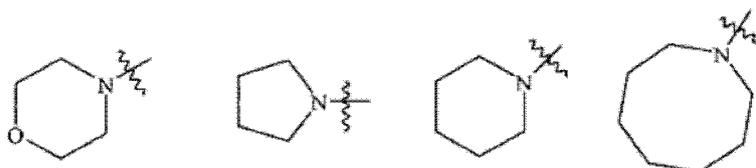
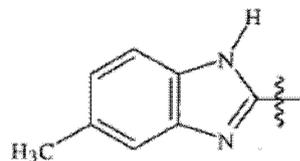
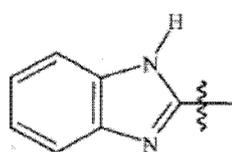
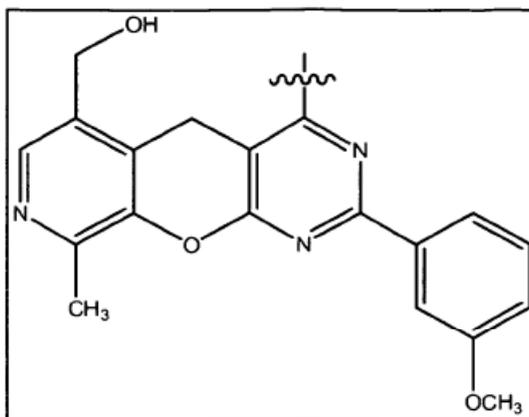
10 en donde uno de los grupos R^6 a R^{10} está unido a $-C-D-E$, y en donde el resto de los grupos R^6 a R^{10} se eligen entre el grupo de H , OH , F , Cl , Br , I , CH_3 , CH_2CH_3 y OCH_3 , y $n = 0$ o 1 , o

un sistema de anillo elegido entre el grupo que consiste en cicloalquilo o heterociclo saturado o insaturado; o



15 en donde o y $p = 0$ o 1 , $q = 0, 1, 2, 3$ o 4 , y R^{11} se elige entre el grupo que consiste en alquilo inferior sustituido o no sustituido, amida, tioéter, fenilo, fenol, indol, imidazol, $NH(NH_2)$ ($N(+)(H_2)$), $COOH$, SH , OH , o H ; C se elige entre el grupo que consiste en $-O-$, $C = O$, NH , $CONH$, S , ftalamida, CH_3 , H , SO_2 y $(CH_2)_r$, donde $r = 0, 1, 2, 3, 4$, o 5 ;

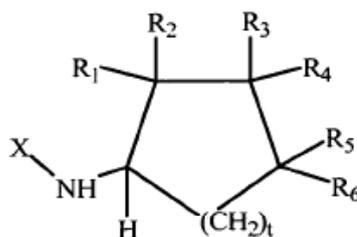
D es opcional y cuando C no es terminal, D se elige entre el grupo que consiste en $-CN-$, $C = O$, NH , S , O , SO_2 , $(CH_2)_s$, en donde $s = 0, 1, 2, 3, 4$ o 5 , y $(CH_2)_t-H$, en donde $t = 0, 1, 2, 3, 4$ o 5 , y



; y

5 E es opcional y cuando D no es terminal, E es ciclohexilo o fenilo, bien sea sustituido con alquilo inferior, alcoxi inferior, cetona, OH, COOH, nitroso, indolina N-sustituada, o un péptido de translocación de la membrana celular, o -
 10 $(\text{CH}_2)_u\text{-(CHR}_{12}\text{R}_{13})$, en donde $u = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16$, o 17 y R_{12} y R_{13} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, ciclohexano, ciclopentano, fenilo, fenilo sustituido, ciclopentadieno; o alquilo inferior ramificado que incluye isopropilo, isobutilo, 1-isopropil-2-metil-butilo, 1-etil-propilo; o -NH-COR¹⁴, en donde R¹⁴ es $(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_v\text{H}$, en donde $v = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16$, o 17 y R_{15} y R_{16} se eligen independientemente entre el grupo que consiste en H, ciclohexano, fenilo, y un péptido de translocación de la membrana celular.

Alternativamente, Po es:

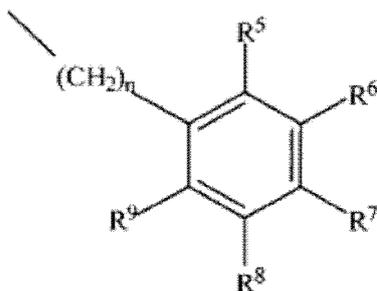


en donde $t = 0, 1$ o 2 , o cualquiera de los grupos R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 o R^6 son COOH , y el resto de los grupos R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 o R^6 se eligen entre el grupo que consiste en $\text{H}, \text{CH}_3, \text{F}$, y OCH_3 , y X es $-\text{A}-\text{B}-\text{C}-\text{D}-\text{E}$, en donde $\text{A}, \text{B}, \text{C}, \text{D}$ y E se conectan por medio de enlaces simples y

A se elige entre el grupo que consiste en $\text{C} = \text{O}, \text{SO}_2, \text{NH}$ y $(\text{CH}_2)_m$, en donde $m = 0, 1, 2, 3, 4$ o 5 ;

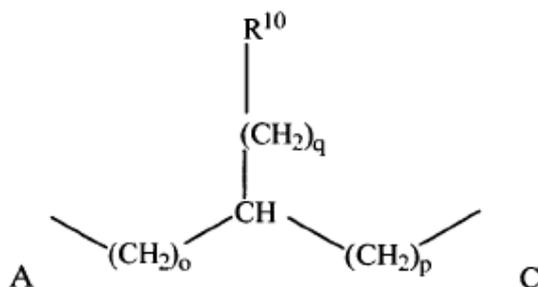
5 B es:

$-\text{OCH}_2-, \text{C} = \text{O}$, o



en donde uno de los grupos R^5 a R^9 está unido a $-\text{C}-\text{D}-\text{E}$, y en donde el resto de los grupos R^5 a R^9 se eligen entre el grupo de $\text{H}, \text{OH}, \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3$ y OCH_3 , y $n = 0$ o 1 ; o

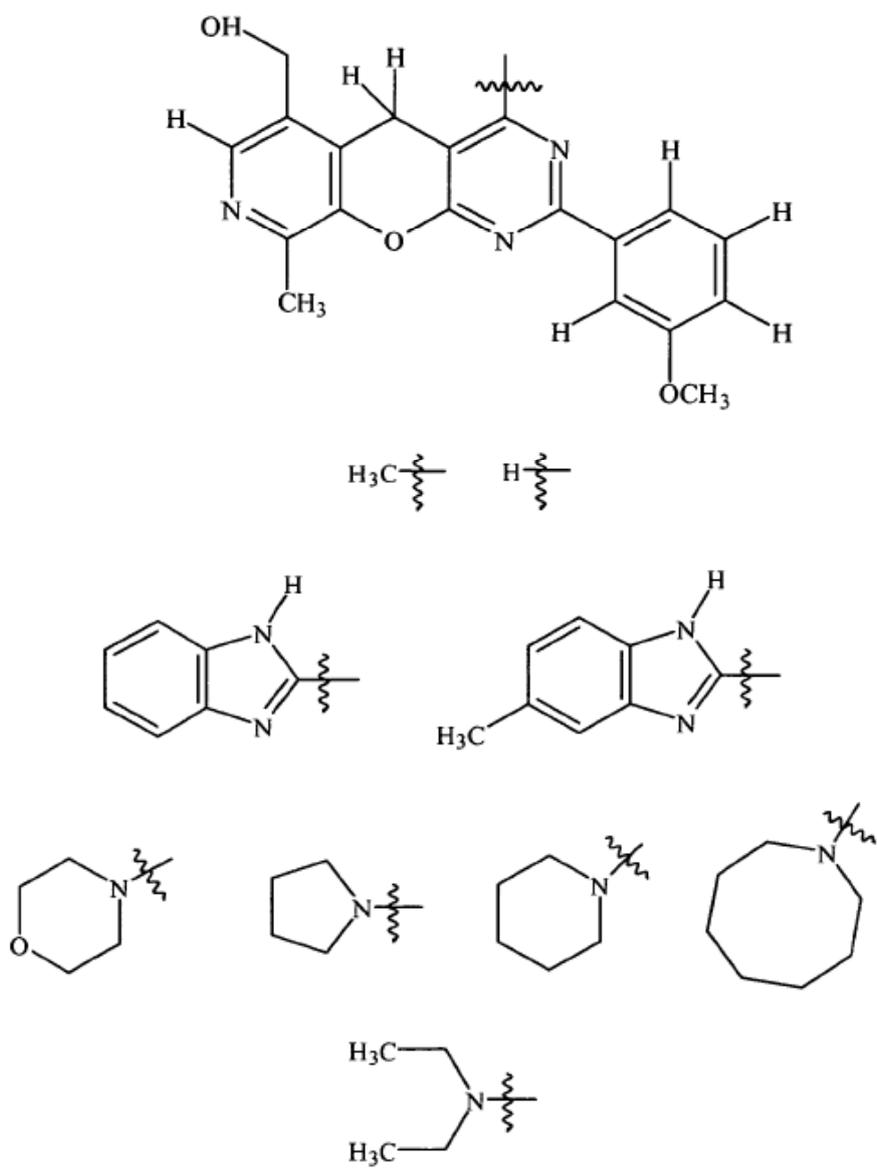
10 un sistema de anillo elegido entre el grupo que consiste en cicloalquilo o heterociclo saturado o insaturado; o



en donde o y $p = 0$ o 1 , y R^{10} se elige entre el grupo que consiste en alquilo sustituido o no sustituido, amida, tioéter, fenilo, fenol, indol, imidazol, $\text{NH}(\text{NH}_2)$ ($\text{N} (+) \text{H}_2$), $\text{COOH}, \text{SH}, \text{OH}$, o H ;

15 C se elige entre el grupo que consiste en $\text{C} = \text{O}, \text{NH}, \text{S}$, ftalamida, $-\text{O}-, \text{CH}_3, \text{H}, \text{SO}_2$ y $(\text{CH}_2)_r$, donde $r = 0, 1, 2, 3, 4$, o 5 ;

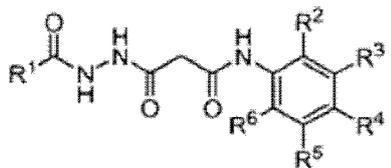
D es opcional y, cuando C no es terminal, D se elige entre el grupo que consiste en $\text{C} = \text{O}, -\text{CN}-, \text{NH}, \text{S}, \text{O}, \text{SO}_2, (\text{CH}_2)_s$, en donde $s = 0, 1, 2, 3, 4$ o 5 , y



; y

5 E es fenilo o ciclohexilo, bien sea sustituido con alquilo inferior, alcoxi inferior, cetona, OH, COOH, nitroso, indolina N-sustituida, o $-(CHR^{11}R^{12})_u$, en donde $u = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,$ o 17 y R^{11} y R^{12} se eligen independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, ciclohexano, ciclopentano, fenilo, fenilo sustituido, ciclopentadieno, o alquilo inferior ramificado incluyendo isopropilo, isobutilo, 1-isopropil-2-metil-butilo, 1-etil-propilo; o $-NH-COR^{11}$, en donde R^{11} es $(CHR^{12}R^{13})_s$, en donde $s = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,$ o 17 y R^{12} y R^{13} se eligen independientemente entre el grupo que consiste en H, ciclohexano, fenilo, y un péptido de translocación de la membrana celular.

10 Algunos compuestos preferidos tienen la siguiente estructura:



en donde R^1 es un miembro elegido entre el grupo que consiste en ciclohexilo sustituido con 0-4 R^7 , fenilo sustituido con 0-4 R^7 , $-(CH_2)_u-(CHR^8R^9)$, un alquilo C_{1-6} ramificado (isopropilo, isobutilo, 1-isopropil-2-metil-butilo, 1-etil-propilo), y $-NH-C(O)-(CR^{10}R^{11})_vH$;

cada R^7 es independientemente un miembro elegido entre el grupo que consiste en alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , $-C(O)R^{12}$, OH, COOH, -NO, indolina N - sustituida y un péptido de translocación de la membrana celular

cada R^8 y R^9 se elige independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, ciclohexano, ciclopentano, fenilo, fenilo sustituido (p. ej. sustituido con grupos halo, alquilo y/o hidroxilo) y ciclopentadieno;

5 cada R^{10} y R^{11} se elige independientemente entre el grupo que consiste en H, ciclohexano, fenilo y un péptido de translocación de la membrana celular;

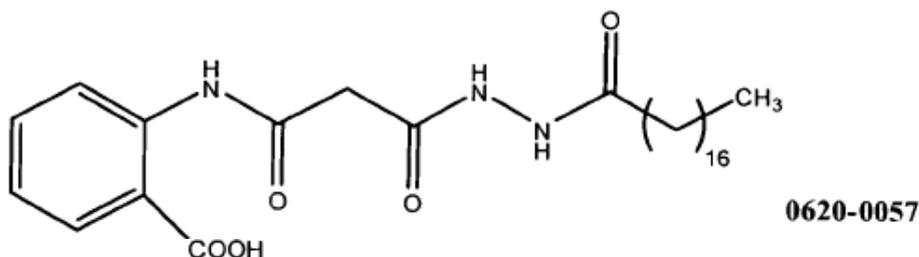
R^{12} es un miembro elegido entre el grupo que consiste en alquilo C_{1-6} y arilo; y

cada uno de los valores u y v son independientemente de 0 a 20;

10 en donde uno de los grupos R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 es -COOH, y en donde el resto de los grupos R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se eligen cada uno de ellos independientemente entre el grupo que consiste en F, H, OCH_3 y CH_3 .

En una realización R^1 es $-(CH_2)_u-(CHR^8R^9)$. En otra realización, R^1 es un miembro del grupo anteriormente definido de sustituyentes R^1 distintos de $-(CH_2)_u-(CHR^8R^9)$.

Un agente preferido tiene la estructura siguiente



15 Pueden ser cribados otros compuestos entre moléculas de origen natural o sintético. Los agentes a someter a cribado también pueden obtenerse a partir de fuentes naturales, tales como, p. ej. microorganismos marinos, algas, plantas, hongos. También se pueden cribar bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos en relación con la unión a PSD-95 y la capacidad para inhibir las interacciones de PSD-95 con los NMDARs y/o las moléculas descritas en la sección I anterior. Se pueden producir bibliotecas combinatorias para muchos tipos de compuestos que pueden ser sintetizados de una manera etapa por etapa. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas N-sustituidas oligómeras y oligocarbamatos. Se pueden construir grandes bibliotecas combinatorias de los compuestos por el método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descrito en Affymax, documento WO 95/12608, Affymax, documento WO 93/06121, Universidad de Columbia, documento WO 94/08051, Pharmacopeia, documento WO 95/35503 y Scripps, documento WO 95/30642. También pueden ser generadas bibliotecas de péptidos por métodos de presentación de fagos. Véase, p. ej. Devlin, documento WO 91/18980. Se pueden utilizar avímeros que constituyen multímeros de dominios A en forma similar a los anticuerpos (Silverman et al. Nat. Biotechnol. 23, 1493 - 4 (2005)). Los compuestos con las propiedades de unión e inhibitoras descritas anteriormente pueden ser cribados además en un modelo animal de epilepsia. Opcionalmente, cualquiera de los compuestos anteriores se mezcla con un excipiente farmacéutico en forma de composición farmacéutica.

III. EPILEPSIA

La epilepsia es un trastorno del sistema nervioso central (SNC) caracterizado por eventos recurrentes, no provocados, de actividad eléctrica descontrolada en el cerebro, generalmente en forma de actividad neuronal excesiva y/o sincrona. La epilepsia es un grupo de síndromes todos los cuales implican la actividad eléctrica anómala episódica en el cerebro. Los episodios epilépticos recurrentes pueden ocurrir desde muy raras veces (p. ej. no durante muchos años) hasta muy frecuentemente (p. ej. varias veces al día). Muchos individuos son asintomáticos entre los episodios. De un modo general, las convulsiones epilépticas son más espontáneas (ocurren sin un desencadenante o causa conocida), súbitas (que ocurren sin indicación previa), de corta duración (duran unos pocos segundos o minutos), y autolimitadas (cesan sin ayuda médica).

40

Síntomas generales de la epilepsia.

Casi cualquier tipo de comportamiento que ocurre repetidamente puede indicar una crisis epiléptica, incluyendo convulsiones, espasmos musculares, pérdida del conocimiento, y sensaciones, emociones y/o comportamiento extraños. Uno cualquiera o más de los siguientes síntomas pueden indicar la epilepsia: mareos, desmayos, confusión, pérdida de memoria, jaqueca, cambios de humor o de nivel de energía, una convulsión con o sin fiebre, períodos de bloqueo o de memoria confusa; hechizos ocasionales en los que se pierde el control de la vejiga o los intestinos, seguidos por una fatiga extrema; episodios de mirada en blanco, breves períodos de no respuesta a preguntas o instrucciones; repentina rigidez o caídas sin una razón aparente; episodios de parpadeo o masticación en momentos inadecuados; comportamiento de aturdimiento; incapacidad para hablar o comunicarse por un corto periodo de tiempo; movimientos repetidos que se ven como fuera de lugar o no naturales; temor, ira o pánico repentinos sin razón alguna; cambios extraños en la forma en las que las cosas se ven, suenan, se huelen o se sienten; tirones musculares de brazos, piernas o cuerpo; y/o grupos de movimientos espasmódicos rápidos en los bebés.

Tipos diferentes de clasificación de las epilepsias.

Las epilepsias pueden ser clasificadas por varios criterios diferentes, incluyendo: (1) la primera causa (o etiología); (2) las manifestaciones observables de las crisis, conocidas como semiología; (3) la localización en el cerebro de la zona en la que se originan las convulsiones; (4) como parte de síndromes médicos discretos identificables, y (5) el evento que desencadena los ataques, si lo hay. El esquema de clasificación de 1981 por la International League Against Epilepsy (Liga Internacional contra la Epilepsia; ILAE) sigue en uso común y se basa en la observación (basándose en los datos clínicos y electrofisiológicos) en lugar de la fisiopatología o anatomía subyacentes. En 1989, la ILAE propuso un esquema de clasificación para las epilepsias y síndromes epilépticos que puede considerarse como un esquema biaxial que tiene la causa en un eje y el alcance de la localización dentro del cerebro en el otro. Desde 1997, la ILAE ha estado trabajando en un nuevo esquema que tiene cinco ejes: fenómeno ictal, tipo de convulsiones, síndrome, etiología y deterioro. Por supuesto, muchos casos de epilepsia se quedan en un grupo "indeterminado" porque sus síntomas no se limitan a los de cualquier clasificación simple.

Clasificaciones basadas en la localización de las crisis epilépticas.

Una crisis epiléptica implica la actividad epiléptica de las neuronas (actividad típicamente excesiva y/o hipersíncrona, y generalmente autolimitada) en el cerebro. La International Classification of Epileptic Seizures (Clasificación Internacional de Ataques Epilépticos) divide de forma amplia las crisis epilépticas en crisis epilépticas focales (también llamadas parciales) y generalizadas. Una crisis parcial es típicamente una crisis cuya semiología inicial indica, o es consistente con ella, la activación inicial de tan sólo una parte de un hemisferio cerebral. Una crisis generalizada es típicamente una crisis cuya semiología inicial indica, o es consistente con ello, más de una mínima participación de ambos hemisferios cerebrales. Una crisis parcial puede propagarse en el cerebro, proceso que se conoce como generalización secundaria.

Las crisis parciales se clasifican además en la medida en la que se ve afectada la consciencia. Si no es afectada, entonces se trata de una crisis parcial simple que implica frecuentemente un área del cerebro relativamente pequeña tales como el lóbulo frontal, temporal, occipital o parietal.

Los síntomas de convulsiones manifestados por un individuo pueden ser indicativos de la parte del cerebro en la que se origina la actividad neuronal anómala subyacente. A título de ejemplo, la retención de la consciencia, combinada opcionalmente con espasmos musculares localizados o en todo el cuerpo, tirones, tics y/o alucinaciones, puede indicar epilepsia focal. Los síntomas MSF del lóbulo temporal pueden incluir: una "sensación epigástrica en aumento" ya o nunca experimentada, un recuerdo retrospectivo de la memoria, una repentina e intensa sensación de miedo o alegría y/o un sabor u olor extraños, cambios repentinos de comportamiento, un comportamiento inusual, agresividad, ira o agitación. La SPS del lóbulo frontal puede estar asociada con movimientos extraños, rigidez o sacudidas que pueden estar localizadas inicialmente en una parte del cuerpo, pero puede extenderse a otras. La SPS del lóbulo parietal puede incluir sensaciones extrañas tales como las sensaciones de entumecimiento u hormigueo, ardor o una sensación de calor y/o la sensación de que una parte del cuerpo es más grande o más pequeña de lo que son en realidad. La SPS del lóbulo occipital puede implicar sensaciones visuales, tales como la distorsión o pérdida de la visión, la percepción de destellos de luz o de formas coloreadas y/o alucinaciones.

Una convulsión parcial compleja (psicomotriz) implica generalmente la alteración del conocimiento (siendo el individuo sólo parcialmente consciente), el deterioro de la capacidad de respuesta y el deterioro de la memoria de la mayor parte o de la totalidad de la convulsión. El CPS del lóbulo temporal se manifiesta frecuentemente por automatismos o mirando de un lado a otro de una manera confusa. Este tipo de CPS dura normalmente aproximadamente 2 a 3 minutos (aproximadamente la duración de una canción en la radio) y luego la persona necesita de 5 a 10 minutos para recuperar totalmente la función normal. En cambio, el CPS del lóbulo frontal suele ser mucho más corto que el CPS del lóbulo temporal, durando habitualmente aproximadamente de 15 a 30 segundos, con frecuencia caracterizado por movimientos límbicos, seguido de una rápida recuperación.

Las convulsiones generalizadas se dividen de acuerdo con el efecto sobre el organismo, pero generalmente implican la pérdida del conocimiento. Esto incluye la ausencia (mal menor o *petit mal*), y las convulsiones mioclónicas, clónicas, tónicas, tónico-clónicas (mal mayor o *grand mal*) y atónicas. Las convulsiones generalizadas se clasifican predominantemente sobre la base de sus manifestaciones motrices.

5 Clasificación basada en la sintomatología:

Una crisis epiléptica puede ir acompañada por un evento motor característico que puede comprender un aumento (positivo) o disminución (negativo) en la contracción muscular para producir un movimiento. Las crisis epilépticas pueden clasificarse en términos de las manifestaciones motrices concomitantes de la manera siguiente:

- 1) Tónica: un aumento mantenido de la contracción muscular que dura entre unos pocos segundos y minutos
- 10 2) Espasmo epiléptico: una súbita flexión, extensión o extensión-flexión mixta de los músculos predominantemente proximales y troncales, que es por regla general más sostenida que un movimiento mioclónico, pero no tan sostenida como una convulsión tónica, es decir, aproximadamente 1 s. Pueden ocurrir formas limitadas: muecas, asentimiento con la cabeza. Frecuentemente ocurren espasmos epilépticos en grupos.
- 15 3) Distónica: contracciones sostenidas tanto de los músculos agonistas como de los antagonistas produciendo movimientos atetoides o de torsión que cuando se prolongan pueden producir posturas anormales.
- 4) Mioclónica: súbita, breve (menos de 100 ms) contracción (o contracciones) única o múltiple involuntaria de los músculos o grupos musculares de topografía variable (axial, extremidad proximal, distal).
- 5) Mioclónica negativa: Interrupción de la actividad muscular tónica durante menos de 500 ms sin evidencia de mioclonía antecedente.
- 20 6) Clónica: mioclonía que es repetitiva regularmente, implica los mismos grupos de músculos, con una frecuencia de aproximadamente 2 - 3 c/s, y es prolongada.
- 7) Tónico-clónica : Una secuencia que consiste en una fase tónica seguida de una fase clónica. Pueden observarse variantes tales como clónica-tónica- clónica.
- 25 8) Convulsiones tónico-clónicas generalizadas (también llamadas convulsiones tónico-clónicas bilaterales, antiguamente convulsión "Gran Mal"): contracción tónica simétrica bilateral luego contracciones clónicas bilaterales de los músculos somáticos asociadas habitualmente con fenómenos autonómicos.
- 9) Atónica: Súbita pérdida o disminución del tono muscular sin un evento mioclónico o tónico precedente evidente que dura de uno a dos segundos o más.

30 Las convulsiones que no se manifiestan por eventos motores evidentes se clasifican algunas veces sobre la base de otros síntomas experimentados. Las convulsiones de "ausencia" son típicamente breves convulsiones en las que el individuo pierde el conocimiento, por ejemplo al ir en blanco y con la mirada fija. Las convulsiones pueden ser muy sutiles y difíciles de observar, ya que puede no haber ningún movimiento obvio. Las ausencias tienden a ser más frecuentes en los niños (hasta cientos de convulsiones por día), pero también pueden ocurrir en adultos. Algunos niños pueden tener cientos de ausencias cada día. Las crisis "atípicas" de ausencia duran más de unos pocos segundos, y pueden implicar algún movimiento del cuerpo, tales como sacudidas de los hombros.

35 Las convulsiones sensoriales incluyen la experiencia perceptiva no causada por estímulos apropiados en el mundo exterior. Un "aura" constituye un fenómeno ictal subjetivo que, en un paciente concreto, puede preceder a un síntoma observable de convulsión. Si es solo, constituye una convulsión sensorial. Un aura autonómica comprende una sensación consistente con la implicación del sistema nervioso autónomo, incluyendo las funciones cardiovascular, gastrointestinal, sudomotriz, vasomotriz y termorreguladora. Una convulsión autonómica comprende típicamente una alteración documentada objetivamente y distinta de la función del sistema nervioso autónomo, que implica por ejemplo las funciones cardiovascular, pupilar, gastrointestinal, sudomotriz, vasomotriz y termorreguladora.

40 Clasificación basada en la etiología

45 Basándose en la causa subyacente, las epilepsias se pueden dividir en los tipos idiopática (es decir, sin causa subyacente aparente), sintomática y criptogénica. La epilepsia criptogénica es la epilepsia sospechosa de tener una causa subyacente específica, que aún no ha sido identificada. La epilepsia sintomática es causada por anomalías estructurales conocidas o daños en el cerebro o por una enfermedad subyacente, como la malformación cerebral

congénita, lesión o traumatismo (en el parto o más adelante), la falta de oxígeno al cerebro causando daños, la infección con daños permanentes, tumor, maraña u ovillo de vasos sanguíneos, derrame cerebral y/o trastorno metabólico.

Estado epiléptico (Status Epilepticus: SE)

5 Aunque muchas crisis epilépticas son poco frecuentes y de corta duración (p. ej. menos de unos pocos minutos), en algunos casos un individuo puede sufrir el estado epiléptico, caracterizado por una convulsión continua que dura más de lo que generalmente lo hacen los ataques epilépticos, por ejemplo al menos aproximadamente 5, 10, o 30 minutos. El estado epiléptico también puede presentarse en forma de dos o más crisis recurrentes entre las cuales el individuo no vuelve a la consciencia de base. La o las crisis pueden ser generalizadas y/o convulsivas; las convulsiones prolongadas con alteración de la consciencia constituye SE convulsivo generalizado (GCSE). Aunque es fácil reconocer un paciente con convulsiones, algunos pacientes que han estado en GCSE pueden pasar a tener actividad motriz mínima o no aparente pero mostrar todavía convulsiones en un electroencefalograma (EEG). Un individuo con SE no convulsivo (NCSE) puede mostrar una amplia variedad de manifestaciones clínicas incluyendo coma, confusión, somnolencia, alteración del afecto, estados de fuga, afasia, síntomas autonómico/vegetativos anómalos, delirios, alucinaciones y paranoia. La NCSE se puede dividir en generalizada (ausencia), focal (parcial compleja), u otra. El "estado epiléptico crepuscular", durante el cual está intacta la excitación con el deterioro de la atención, puede representar la superposición clínica entre NCSE generalizada y focal. La SE parcial sencilla se indica generalmente por convulsiones focales prolongadas, tal como sacudidas de las manos aisladas, asociadas a la consciencia intacta.

20 Otros trastornos epilépticos comunes.

Algunos de los trastornos epilépticos más comunes y condiciones relacionadas con los mismos que pueden ser tratados por los agentes y métodos descritos en la presente invención incluyen uno o más de los siguientes: convulsiones neonatales familiares benignas; encefalopatía mioclónica temprana; síndrome de Ohtahara; convulsiones parciales migratorias de la lactancia; síndrome de West; epilepsia mioclónica benigna en la lactancia; convulsiones infantiles familiares y no familiares benignas; síndrome de Dravet; síndrome HH; estatus mioclónico en encefalopatías no progresivas; epilepsia benigna de la infancia con picos centrotemporales; epilepsia occipital benigna de la infancia de inicio temprano (tipo Panayiotopoulos); epilepsia occipital benigna de la infancia de inicio tardío (tipo Gastaut); epilepsia con ausencias mioclónicas; epilepsia con crisis mioclónicas-astáticas; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de Landau-Kleffner; epilepsia con picos y ondas continuas durante el sueño de ondas lentas (distinto de LKS); epilepsia de ausencia infantil; epilepsias mioclónicas progresivas; epilepsias generalizadas idiopáticas con fenotipos variables tales como epilepsia de ausencia juvenil o epilepsia mioclónica juvenil o epilepsia con convulsiones tónico-clónicas generalizadas sólo; epilepsias reflejas; epilepsia del lóbulo occipital fotosensible idiopática; otras epilepsias visuales sensibles; epilepsia de lectura primaria; epilepsia de susto; epilepsia del lóbulo frontal autosómica dominante nocturna; epilepsias del lóbulo temporal familiares; epilepsias generalizadas con crisis febriles plus; epilepsia focal familiar con focos variables; epilepsias focales sintomáticas (o probablemente sintomáticas); epilepsias límbicas; epilepsia del lóbulo temporal mesial con esclerosis del hipocampo; epilepsia del lóbulo temporal mesial definida por etiologías específicas; otros tipos definidos por localización y etiología; epilepsias neocorticales; y/o síndrome de Rasmussen.

La epilepsia del lóbulo temporal (TLE) es el tipo de epilepsia focal del adulto más común y resistente a los fármacos. La TLE, en su conjunto, constituye un tipo común de epilepsia. La incidencia exacta no está clara, pero se sospecha que constituye una proporción significativa de epilepsia resistente a los fármacos. Aproximadamente el 30 % (de los 2,7 millones de casos de epilepsia en los Estados Unidos) no responden adecuadamente a los medicamentos. Hasta la mitad de estos casos puede ser debido a TLE. Los hipocampos resecaados quirúrgicamente de pacientes con TLE revelan esclerosis hipocámpica, caracterizada por gliosis y pérdida de neuronas, así como brotes axonales, neurogénesis y sinaptogénesis. Estas características de la TLE humana se reproducen en el modelo animal de litio - pilocarpina de TLE bien establecido. La pilocarpina, un quimioconvulsivo, induce un estado epiléptico que se caracteriza por convulsiones continuadas, dando lugar a una serie de cambios neuropatológicos y subsiguiente desarrollo de convulsiones recurrentes espontáneas (SRS) entre 3 y 5 semanas. La amplia pérdida de células está presente en la amígdala, la corteza piriforme y el hipocampo CA1 dorsal.

50 Diagnóstico y/o detección de la epilepsia.

Además de la manifestación de los síntomas observables, la epilepsia se puede detectar y/o diagnosticar usando diversos procedimientos. Estos pueden incluir electroencefalografía (EEG), video EEG, barridos de tomografía computerizada (CT), imágenes de resonancia magnética (MRI), tomografía de emisión de positrones (PET), y/o tomografía computerizada de emisión de fotón único (SPECT).

55 El EEG se usa mucho para ayudar en la detección o el diagnóstico de la epilepsia. La presencia de descarga epileptiforme interictal (IED) puede ser indicativa de epilepsia. Algunos tipos de fenómenos epileptiformes, p. ej. una descarga de punta onda de 3 a 7 Hz, hipsarritmia, y/o la respuesta fotoparoxismal generalizada, están fuertemente

correlacionados con la epilepsia clínica. Las ondas agudas focales en las regiones centro-temporal u occipital o las descargas en el EEG centro temporales o rolándicas, también pueden ser indicativas de epilepsia. La ubicación de una zona epileptogénica es relevante: la mayoría de los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal muestran IED, mientras que los focos epilépticos en regiones corticales mediales o basales alejadas de los electrodos en el cuero cabelludo son menos probables de mostrar picos. EEG puede opcionalmente tomarse en varios momentos, tanto durante la vigilia como durante el sueño. Véase, p. ej. Smith et al, Journal of Neurology Neurosurgery y Psychiatry 2005; 76: 112 - 117.

IV. PACIENTES CURABLES.

Los pacientes susceptibles de tratamiento o curables incluyen las personas que tienen uno o más síntomas o trastornos de epilepsia, incluyendo los descritos anteriormente.

Los pacientes curables pueden tener o no otras enfermedades o trastornos para los que previamente se ha propuesto el tratamiento con antagonistas de PSD-95. Estas enfermedades y condiciones incluyen la excitotoxicidad mediada por enfermedades, infarto cerebral, epilepsia, hipoxia, lesión traumática en el SNC no asociada con ataques tales como lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. En los pacientes en los que está presente dicha enfermedad comórbida, los agentes de la invención pueden ser efectivos contra la epilepsia y la enfermedad comórbida.

Opcionalmente, los agentes de la invención se administran a sujetos diagnosticados de epilepsia que no tienen historia de infarto cerebral ni de otros trastornos mediados por la excitotoxicidad y/o lesión cerebral isquémica u otra enfermedad. Los agentes de la invención también se pueden administrar a sujetos que tienen epilepsia que no se sabe que estén predispuestos a una segunda enfermedad, o en mayor riesgo de ella. Opcionalmente, los agentes de la invención también se pueden administrar a sujetos que tienen epilepsia que se sabe que tienen un riesgo menor para una segunda enfermedad, o no se sabe que tengan un mayor riesgo de una segunda enfermedad. En otras situaciones, los agentes de la invención también se pueden administrar preferiblemente a sujetos que tienen epilepsia que no han tenido una segunda enfermedad, pero pueden estar predispuestos o en mayor riesgo de una segunda enfermedad. Los agentes también se pueden administrar a sujetos con un riesgo desconocido de una segunda enfermedad. La segunda enfermedad es una enfermedad mediada por PSD-95. Opcionalmente, la segunda enfermedad es el infarto cerebral, enfermedades mediadas por excitotoxicidad, apoplejía, epilepsia, hipoxia, lesión traumática del SNC no asociada con ataques tales como la lesión cerebral traumática y la lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, malformación cerebral congénita, infección con daños permanentes, tumor del SNC, maraña u ovillo de vasos sanguíneos, y/o trastorno metabólico.

V. MÉTODOS DE TRATAMIENTO. PROGRAMACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN EN EL TIEMPO.

Los agentes de la invención se usan para tratar pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar síntomas de un trastorno epiléptico, incluyendo los descritos anteriormente.

De acuerdo con la presente invención como se especifica en las reivindicaciones, el agente puede ser administrado al menos una hora después de un episodio de epilepsia (p. ej. una convulsión). El agente se puede administrar, p. ej. al menos aproximadamente dos, tres, cuatro, cinco, seis, ocho, diez, doce, dieciséis o veinticuatro horas después de un episodio de epilepsia. El agente también puede administrarse días después del episodio de epilepsia, por ejemplo al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 o 12 días después de la iniciación. El agente también puede administrarse al menos una semana después del episodio de epilepsia, p. ej. al menos aproximadamente 1, 2 o 3 semanas después del episodio.

El inhibidor puede ser administrado después del episodio de epilepsia, pero no más tarde de una hora o más, p. ej. no más tarde de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 18 o 24 horas después del episodio. El inhibidor puede ser administrado después del episodio de epilepsia pero no más tarde de uno o más días, p. ej. no más tarde de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 14 días después del episodio. El inhibidor puede ser administrado después del episodio de epilepsia, pero no más tarde de una o más semanas, p. ej. no más tarde de aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5 o 3 semanas después del episodio.

De acuerdo con la invención, y como se especifica en las reivindicaciones, el inhibidor se administra después del episodio de epilepsia dentro de un lapso de tiempo. El lapso de tiempo puede basarse en cualquier combinación de los momentos mencionados anteriormente. Por ejemplo, el inhibidor puede ser administrado dentro de un lapso de tiempo de al menos aproximadamente una hora después de un episodio de epilepsia y no más tarde de aproximadamente 2 semanas después del episodio, tal como al menos aproximadamente dos horas después de un episodio de epilepsia y no más tarde de una semana después del episodio, p. ej. al menos aproximadamente tres horas después de un episodio de epilepsia y no más tarde de aproximadamente tres días (o, alternativamente, una semana) después del episodio.

5 La programación en el tiempo de la administración después de un episodio de epilepsia puede medirse desde el momento de inicio del episodio (p. ej. cuando el episodio es breve), o desde el momento de la conclusión del episodio (p. ej. cuando una crisis epiléptica es de mayor duración), o desde cualquier momento en que se observan signos de actividad epiléptica en el cerebro. Para los fines de la invención, la iniciación de los síntomas experimentados u observados de la actividad convulsiva epiléptica en el cerebro, no incluyendo premoniciones convulsivas no específicas o estados postictales, se puede considerar como la iniciación del episodio epiléptico. Del mismo modo, la finalización de los síntomas experimentados u observados de la actividad convulsiva epiléptica en el cerebro puede ser considerada como la conclusión del episodio epiléptico.

10 Opcionalmente, el agente no se administra antes o durante un episodio de epilepsia. En otros casos, el agente también se puede administrar durante un episodio epiléptico, p. ej. una convulsión.

Si se administra el tratamiento después de haberse iniciado un episodio, el tratamiento puede administrarse al menos después de aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 ó 48 horas después de la conclusión de una crisis epiléptica. Muchas veces es suficiente una dosis única de un agente de la invención. Sin embargo, también se pueden administrar múltiples dosis a intervalos de 6 a 24 horas.

15 Cuando se desee, el tratamiento puede iniciarse antes de un evento desencadenante que promueve el episodio, o bien en el momento después de que el sujeto experimenta un aura que típicamente precede a la aparición de una crisis observable en el sujeto. El agente puede administrarse al menos aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 o 48 horas antes de un ataque epiléptico.

20 En otros casos, el tratamiento se puede administrar en el momento que se desee después de la iniciación de una crisis epiléptica. El agente puede ser administrado por ejemplo al menos aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 o 48 horas después de la iniciación de un ataque epiléptico. El ataque epiléptico puede ser efímero, durando p. ej. menos de un segundo, o unos pocos segundos, o aproximadamente uno o unos pocos minutos, o aproximadamente media hora.

25 Los métodos de la invención pueden combinarse con otros tratamientos para la epilepsia. Tales tratamientos convencionales incluyen terapia del comportamiento, cambios de forma de vida y/o terapia farmacéutica. Los fármacos antiepilépticos conocidos incluyen medicamentos "tradicionales", tales como el fenobarbital, primidona, fenitoína, carbamazepina y valproato, así como fármacos antiepilépticos más nuevos que inducen el bloqueo de los canales iónicos dependientes del voltaje, la potenciación de la neurotransmisión inhibitoria, y/o la reducción de la neurotransmisión excitatoria. Los ejemplos incluyen antagonismo del glutamato en los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), (p. ej. felbamato) y los receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) (p. ej. felbamato, topiramato) y la inhibición de la reabsorción de ácido γ -aminobutírico (GABA) en neuronas y astrocitos (p. ej. tiagabina).

35 Los antiepilépticos adecuados incluyen bloqueantes de los canales de sodio, agonistas del receptor de GABA, inhibidores de la rabsorción de GABA, inhibidores de la GABA transaminasa, bloqueantes de glutamato, así como agentes antiepilépticos con otros mecanismos de acción. Los fármacos antiepilépticos incluyen aldehídos, alcoholes alílicos aromáticos, barbituratos, benzodiazepinas, bromuros, carbamatos, carboxamidas, ácidos grasos, derivados de la fructosa, análogos de GABA, hidantoínas, oxazolidindionas, propionatos, pirimidindionas, pirrolidinas, succinimidias, sulfonamidias, triazinas, ureas, valproilamidias (derivados amida de valproato). Los ejemplos específicos de agentes antiepilépticos usados de un modo general incluyen acetazolamida, liberación modificada de acetazolomide, carbamazepina, liberación modificada de carbamazepina, clobazam, clonazepam, etosuximida, gabapentina, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, fenobarbital (fenobarbitona), fenitoína, pregabalina, primidona, rufinamida, valproato sódico, liberación modificada de valproato sódico, tiagabina, topiramato, ácido valproico, vigabatrina o zonisamida. Puede utilizarse cualquier combinación de tales fármacos o sus derivados.

VI. DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS.

45 Los péptidos y peptidomiméticos de la invención pueden ser administrados en forma de composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se fabrican bajo las condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma de dosificación unitaria (es decir, la dosificación para una única administración) que contiene cualquiera de las dosificaciones indicadas más adelante. Las composiciones farmacéuticas se pueden elaborar por medio de procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, 50 levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. En particular, los péptidos o peptidomiméticos de la invención liofilizados pueden ser usados en las formulaciones y composiciones que se describen a continuación.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de una manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables, que facilitan el procesamiento de péptidos o peptidomiméticos en preparados que pueden ser usados farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de 55 la vía de administración elegida.

La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. La administración intravenosa del fármaco en una solución salina tamponada con fosfato es la preferida.

5 Se pretende que la invención sea para el tratamiento de la neurodegeneración en cualquier parte del cerebro. En la Figura 14 se muestran varias áreas del cerebro.

10 Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral son preferiblemente estériles y sustancialmente isotónicas. Para inyección, los péptidos o peptidomiméticos se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones compatibles fisiológicamente tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o solución salina fisiológica o tampón de acetato (para reducir las molestias en el sitio de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, de estabilización y/o de dispersión.

Alternativamente, los péptidos o peptidomiméticos pueden estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, p. ej. agua estéril libre de pirógenos, antes de usarse.

15 Para la administración transmucosal, se utilizan en la formulación agentes de penetración apropiados para la barrera que se ha de permear. Esta vía de administración puede ser utilizada para suministrar los compuestos a la cavidad nasal o para la administración sublingual.

20 Para la administración oral, los compuestos se pueden formular combinando los péptidos o peptidomiméticos con vehículos aceptables farmacéuticamente tales como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, papillas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por el paciente que se ha de tratar. Para las formulaciones sólidas orales tales como, p. ej., polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol, preparados de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como el alginato de sodio. Si se desea, las formas de dosificación sólidas pueden ser recubiertas con azúcar o con un recubrimiento entérico usando técnicas estándar. Para los preparados orales líquidos tales como, p. ej., suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, o alcoholes. Adicionalmente, se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares.

30 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos pueden formularse también como un preparado de depósito o retardado. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, p. ej., 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 como derivados escasamente solubles, p. ej. como una sal escasamente soluble.

35 Alternativamente se pueden emplear otros sistemas farmacéuticos de administración. Los liposomas y las emulsiones pueden ser utilizados para suministrar péptidos y peptidomiméticos. También pueden emplearse ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque normalmente a costa de una toxicidad más alta. Adicionalmente, los compuestos se pueden suministrar usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico.

40 Dependiendo de su naturaleza química, las cápsulas de liberación sostenida pueden liberar los péptidos o peptidomiméticos durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

45 Como los péptidos o peptidomiméticos de la invención pueden contener cadenas laterales o términos cargados, pueden ser incluidos en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como ácidos o bases libres o como sales aceptables farmacéuticamente. Las sales aceptables farmacéuticamente son las sales que retienen 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 disolventes próticos otros que son las formas de base libre correspondientes.

50 Los agentes de la invención se usan en una cantidad efectiva para conseguir el objetivo perseguido. Una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de agente suficiente para eliminar, reducir o inhibir el empeoramiento de al menos un signo y/o síntoma de la epilepsia o un subtipo de la misma en un paciente que actualmente está experimentando síntomas de epilepsia. Por ejemplo, una cantidad se considera terapéuticamente efectiva si reduce significativamente al menos un signo o síntoma de la epilepsia en una población de pacientes

tratados (personas o animales) en comparación con una población control de pacientes no tratados. La cantidad se considera también terapéuticamente efectiva si un paciente tratado individualmente consigue un resultado más favorable que el resultado medio en una población control o de control de pacientes comparables no tratados por los métodos de la invención. Una cantidad profilácticamente efectiva de un agente significa una cantidad de agente suficiente para retrasar, inhibir o prevenir el desarrollo de al menos un signo o síntoma de la epilepsia o un subtipo de la misma en un paciente que en la actualidad no está experimentando síntomas pero que se considera en un riesgo más alto de desarrollar estos síntomas con respecto a la población general. Por ejemplo, se considera que una cantidad es profilácticamente efectiva si una población de pacientes en riesgo de desarrollar los síntomas de la epilepsia tratada con el agente desarrolla signos o síntomas reducidos en relación con una población control no tratada con el agente. La referencia a una cantidad efectiva significa una cantidad efectiva bien sea terapéuticamente o bien profilácticamente. La referencia a un régimen efectivo significa una combinación de una cantidad efectiva y la frecuencia de dosificación requerida para conseguir el propósito buscado que se describe anteriormente.

Los márgenes de dosificación preferidos incluyen aproximadamente de 0,01 a 100 μmol de agente por kg de peso corporal del paciente, opcionalmente de 0,1 a 10 μmol de agente por kg de peso corporal del paciente, p. ej. de 0,5 a 2 μmol de agente por kg de peso corporal del paciente, o aproximadamente 1 μmol de agente por kg de peso corporal del paciente. En algunos métodos, se administran de 0,1 a 10 μmol de agente por kg de peso corporal del paciente. En algunos métodos, se administran de 0,5 a 5 μmol de agente por kg de peso corporal del paciente dentro de las 6 horas, más preferiblemente aproximadamente 1 μmol de agente por kg de peso corporal del paciente en aproximadamente de 3 a 6 horas después de una crisis epiléptica. En otros casos, el intervalo de dosis es de 0,05 a 0,5 μmol de agente por kg de peso corporal del paciente. La dosificación por kg de peso corporal se puede convertir de ratas a seres humanos dividiendo por 6,2 para compensar las distintas relaciones de área de la superficie a masa. Del mismo modo, la dosificación por kg de peso corporal se puede convertir de ratones a seres humanos dividiendo por 12,3. Las dosificaciones se pueden convertir de unidades de moles a gramos multiplicando por el peso molecular de un péptido (en este caso, 2519 para Tat - NR2B9c). Las dosificaciones se pueden convertir de unidades de moles a gramos multiplicando por el peso molecular de un péptido. Las dosificaciones adecuadas de péptidos o peptidomiméticos de la invención para su uso en seres humanos pueden incluir de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal del paciente, o más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal del paciente o de aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg, o aproximadamente de 1 a 4 mg/kg, p. ej. aproximadamente 2,6 mg/kg. En peso absoluto para un paciente de 75 kg, estas dosis se traducen en de 0,75 a 7.500 mg, de 7,5 a 750 mg, de 37,5 a 3750 mg, o aproximadamente de 75 a 300 mg, p. ej. aproximadamente 200 mg. Redondeada para abarcar variaciones p. ej. en el peso del paciente, la dosificación está generalmente dentro del intervalo de 0,05 a 500 mg, preferiblemente de 0,1 a 100 mg, de 0,5 a 50 mg, o de 1 a 20 mg.

Alternativamente, agentes tales como Tat-NR2B9c destinados a ser usados en los presentes métodos han sido informados con anterioridad como útiles para el tratamiento de los infartos cerebrales y han sido sometidos a ensayos clínicos en fase I para esta indicación sin efectos adversos graves. Las dosificaciones y regímenes utilizados para tratar el infarto cerebral también se pueden utilizar para la epilepsia, en particular crisis intermitentes breves de epilepsia.

La cantidad de agente administrado depende del sujeto que se esté tratando, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, la forma de administración y del juicio del médico responsable. La terapia se puede proporcionar intermitentemente sola o en combinación con otros medicamentos.

Dosis terapéuticamente efectivas de los agentes pueden proporcionar un beneficio terapéutico sin causar sustancialmente toxicidad. La toxicidad de los péptidos o peptidomiméticos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o en animales experimentales, p. ej. mediante la determinación de la LD_{50} (dosis letal para el 50 % de la población) o la LD_{100} (dosis letal para el 100 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Se prefieren los péptidos o peptidomiméticos que muestran índices terapéuticos elevados (véase, p. ej. Fingl et al., 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, cap. 1, p. 1).

VII. MÉTODOS DE CRIBADO.

En el presente texto se describen también métodos de cribado de péptidos, peptidomiméticos y otros compuestos en relación con su actividad útil en el tratamiento de la epilepsia. Los compuestos se administran a un modelo animal de epilepsia. A continuación se discuten diversos modelos animales.

Los compuestos adecuados para el cribado en los métodos incluyen péptidos, peptidomiméticos y moléculas pequeñas (es decir, de menos de 500 Da) que se sabe que inhiben las interacciones de los ligandos con los dominios PDZ de PSD-95, incluyendo NDMAR 2B. También se pueden cribar otros péptidos, peptidomiméticos y moléculas pequeñas que se sabe que inhiben interacciones entre otros pares de NDMAR y proteínas de dominio PDZ mostrados en la Tabla 1.

Los compuestos a cribar pueden ser tanto de origen natural como sintético, orgánicos e inorgánicos, e incluyendo polímeros (p. ej. oligopéptidos, polipéptidos, oligonucleótidos, y polinucleótidos), moléculas pequeñas, anticuerpos, azúcares, ácidos grasos, nucleótidos y análogos de nucleótidos, análogos de estructuras de origen natural (p. ej. miméticos de péptidos, análogos de ácidos nucleicos, y similares), y otros muchos compuestos. Los compuestos se pueden preparar a partir de bibliotecas de diversidad, tales como bibliotecas de péptidos o no péptidos aleatorias o combinatorias. Las bibliotecas incluyen bibliotecas sintetizadas químicamente, recombinantes (p. ej. bibliotecas de presentación de fagos), y bibliotecas basadas en la traducción *in vitro*. Se describen ejemplos de bibliotecas sintetizadas químicamente en Fodor et al., 1991, *Science* 251: 767 - 773; Houghten et al., 1991, *Nature* 354: 84 - 86; Lam et al., 1991, *Nature* 354: 82 - 84; Medynski, 1994, *Bio/Technology* 12: 709 - 710; Gallop et al., 1994, *J. Medicinal Chemistry* 37 (9): 1233 - 1251; Ohlmeyer et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10922 - 10926; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422 - 11426; Houghten et al., 1992, *Biotechniques* 13: 412; Jayawickreme et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1614 - 1618; Salmon et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11708-11712; el documento WO 93/20242; y Brenner y Lerner, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5381 - 5383. Se describen ejemplos de bibliotecas de presentación de fagos en Scott y Smith, 1990, *Science* 249: 386 - 390; Devlin et al., 1990, *Science*, 249: 404 - 406; Christian, R. B. et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227: 711 - 718); Lenstra, 1992, *J. Immunol. Meth.* 152: 149 - 157; Kay et al., 1993, *Gene* 128: 59 - 65; documento WO 94/18318 fechado el 18 de agosto de 1994. Las bibliotecas basadas en traducción *in vitro* incluyen las que se describen en el documento WO 91/05058; y Mattheakis et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9022 - 9026. A título de ejemplo de bibliotecas no peptídicas, puede ser adaptada para ser usada una biblioteca de benzodiazepina (véase p. ej. Bunin et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4708 - 4712). También se pueden utilizar bibliotecas de peptoides (Simon et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9367 - 9371). Otro ejemplo de biblioteca que se puede utilizar, en la cual las funcionalidades amida en los péptidos han sido permitiladas para generar una biblioteca combinatoria transformada químicamente, se describe en Ostresh et al. (1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11138 - 11142).

MODELOS ANIMALES DE EPILEPSIA:

Hay un amplio número de modelos animales de diferentes condiciones epilépticas que están bien caracterizados. Véase, p. ej., *Models of Seizures and Epilepsy*, editado por Asia Pitkänen, Philip A. Schwartzkroin y Salomón L. Moshe, ISBN: 978-0-12-088554-1; Elsevier Inc., Copyright © 2006. Los animales pueden variar de *Drosophila* a primates, en los que se produce la epilepsia en de diversas maneras, incluyendo mediante la administración de productos químicos o cribado genético en relación con especímenes que desarrollan espontáneamente convulsiones y/o epilepsia. Los ejemplos de modelos animales incluyen convulsiones inducidas por hipertermia en ratas que imitan las convulsiones febriles, los mutantes de ratón como ratones *totterer* (tambaleantes), *stargazer*, letárgico, y epilepsia de olas lentas (SWE: Slow Wave Epilepsy) que comparten características similares a las epilepsias humanas de ausencia tal como la detención breve de comportamiento (es decir, mirando u observando).

También se han descrito modelos animales bien caracterizados para las crisis parciales complejas observadas en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ELT). Los modelos de convulsiones de ácido kaínico y pilocarpina (PILo) son probablemente los modelos animales inducidos químicamente más comúnmente estudiados para TLE. El *kindling* (activación propagada), un fenómeno por el cual la aplicación repetitiva focal de la estimulación eléctrica inicialmente subconvulsiva tiene por resultado en última instancia intensos ataques convulsivos parciales y generalizados, sigue siendo un modelo informativo para TLE.

Además, varias especies propensas genéticamente a la epilepsia han sido descritas como modelos animales para estudiar epilepsias reflejas fotosensibles y audiogénicas. Estos incluyen el babuino *Papio papio*, la cepa de pollos epiléptica Fayoumi (FEpi), la rata genéticamente propensa a la epilepsia (GEPR) y ratones DBA/2.

Hay una variedad de métodos disponibles para inducir crisis tónico-clónicas o de ausencia generalizadas en los animales, al igual que algunos modelos animales genéticos que son muy propensos a las crisis o bien tienen crisis espontáneas. Lo que sigue son unos pocos métodos tradicionales para provocar tales tipos de convulsiones.

Las crisis convulsivas, caracterizadas por la extensión/flexión tónica de las extremidades posteriores seguida de actividad clónica, se inducen fiablemente mediante electroshock máximo que sigue siendo un método popular para el cribado rápido de nuevos fármacos anticonvulsivos.

El pentilentetrazol (PTZ) es probablemente el agente convulsivo administrado sistémicamente utilizado más ampliamente. Se pueden administrar inyecciones repetidas de PTZ para producir un tipo de *kindling* químico que se asemeja al *kindling* (o activación propagada) eléctrico. En dosis altas, el PTZ (se administra por lo general por vía subcutánea o por vía intravenosa) produce de forma fiable convulsiones tónico-clónicas en ratas o ratones y es una medida rápida y eficiente tanto de susceptibilidad a las crisis como del cribado de nuevos fármacos. Administrado sistémicamente en dosis bajas, el PTZ también puede utilizarse para provocar convulsiones similares a la ausencia.

El flurotil, un éter hexafluorado, es un inhalante químico utilizado para inducir un patrón de crisis convulsiva reproducible en los roedores. En este método, las ratas o los ratones se ponen en una cámara hermética al aire en la que difunde el flurotil administrado centralmente; al cabo de 10 a 20 min el flurotil provoca inicialmente sacudidas

mioclónicas seguidas de graves convulsiones clónico-tónicas. Finalmente, otros modelos animales experimentales para las crisis de ausencia generalizadas incluyen la estimulación talámica, la administración sistémica de penicilina en gatos, el tratamiento con g-hidroxibutirato (GHB), y los opiáceos intracerebroventriculares, así como el número de modelos genéticos en ratas (GAERS, WAG/Rij, SER) y ratones (*stargazer*, *tottering* o tambaleantes, letárgicos, ratones de epilepsia de ondas lentas, mocha, y ducky) ya descritos.

Los modelos animales tales como los descritos anteriormente, tanto *in vivo* como *in vitro*, han sido valiosos en la comprensión de los mecanismos básicos de fenómenos parciales o generalizados relacionados con convulsiones y son técnicas estándar para evaluar nuevas terapias. Sarkisian, *Epilepsy and Behavior* 2, 201 - 216 (2001).

EJEMPLOS

10 EJEMPLO 1 MODELO DE EPILEPSIA DE PILOCARPINA EN RATAS

A. Canulación de la vena femoral.

Los animales fueron anestesiados durante aproximadamente 40 minutos con un suministro continuo de isoflorane al 3 % y puestos en decúbito supino sobre una almohadilla térmica durante la cirugía. Los sitios quirúrgicos se limpiaron y se rasuraron con jabón de Betadine. Se hizo una incisión ventral en la piel de 3 cm desde el cuadrante inferior derecho del abdomen y a lo largo del muslo derecho, próxima a un pliegue apreciable que marca la posición de la vena femoral, la arteria femoral y el nervio ciático. Se realizó una mínima disección de los músculos aductores para visualizar el haz vascular, y la vena femoral, la arteria femoral y el nervio ciático se separaron con cuidado. Se hizo una pequeña incisión en la vena femoral, y se introdujo una cánula de polietileno P10, previamente llenada con solución salina fisiológica que contenía heparina (1 mL de heparina/1 L de PBS), de 4 a 5 cm. Múltiples suturas de seda 4.0 fueron ligadas alrededor de la vena femoral, arteria femoral, nervio ciático para asegurar la cánula. El animal se colocó en posición de decúbito prono, y se hizo una incisión en la piel en la línea media dorsal de 0,5 cm entre las escápulas. Se introdujo un tubo metálico de 15 cm de longitud con un extremo no despuntado a través de la incisión de la línea media dorsal y por vía subcutánea se tuneló a la incisión ventral del muslo. El extremo libre de la cánula fue alimentado a través del tubo de metal y se extruyó desde la incisión de la línea media dorsal. El tubo de metal se retiró y se cerró la incisión ventral de la piel. La cánula fue asegurada abovedando por medio de un botón de cirugía plástica, se aclaró con solución salina fisiológica que contiene heparina, y se selló con una punta de calibre 23. La incisión dorsal se cerró, y el botón de cirugía plástica se cortó con sutura de seda 4.0 entre las escápulas, una región estratégica que quedaba fuera del alcance del animal durante el período de recuperación de 5 días que siguió.

30 B. Inducción de crisis epilépticas.

Ratas Wistar macho entre 350 a 400 gramos de peso se trataron previamente con cloruro de litio (ip; 3 mEq/kg) 17 a 24 horas antes de la inyección sistémica del quimioconvulsionante pilocarpina. La pilocarpina (ip; 10mg/kg) se administró cada 30 minutos hasta la aparición del estado epiléptico (Status Epilepticus: SE), que se definió como una pérdida del conocimiento y la actividad convulsiva continua evidente. En el método de pilocarpina a baja dosis (PLD), a ratas Wistar o LEH se les administró una inyección inicial de pilocarpina (30 mg/kg, i.p.). Si no se desarrollaba el SE dentro de los 60 minutos siguientes, se administraba una segunda inyección de pilocarpina (15 mg/kg). En el segundo procedimiento, el método de la pilocarpina en dosis bajas repetida (RLDP), la pilocarpina (10 mg/kg, i.p.) se administró a ratas LEH o Wistar cada 30 minutos como se describe en Glien et al., (*Epilepsy Res.* Agosto 2001; 46 (2): 111 - 9) hasta que la rata experimentó una crisis generalizada de clase 4/5. Generalmente las ratas desarrollaron el SE poco después. Los animales que no desarrollaron SE a los 30 minutos de la primera crisis de clase 4/5, recibieron inyecciones adicionales de pilocarpina en intervalos de 30 minutos hasta un máximo de 6 inyecciones. El SE finalizó en 1, 3 y 5 horas después de la aparición del SE con diazepam (ip; 4 mg/kg). La actividad convulsiva evidente que se produjo durante el SE se registró en etapas usando una escala Racine modificada (Racine, 1972) de la forma siguiente: 1) movimientos de la boca, 2) movimientos de la boca y asentimiento con la cabeza, 3) clonias (movimientos violentos y confusos) de las extremidades anteriores, 4) clonias de extremidades anteriores y levantamiento, 5) clonias de extremidades anteriores, levantamiento y una caída, 6) clonias extremidades anteriores, levantamiento y múltiples caídas, y 7) carrera y salto. Nuestra escala de Racine modificada separa más la clase original de cinco en tres etapas para tener en cuenta la actividad convulsiva que implica las múltiples caídas (6) y carrera y salto (7).

50 C. Evaluación de la neurodegeneración después de los ataques epilépticos.

Los animales fueron anestesiados con ketamina y Romptum, y perfundidos transcardialmente con paraformaldehído (PFA; 4 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4) 2 semanas después de la inducción del SE. Los cerebros fueron extraídos, postfijados durante la noche en PFA, y después equilibrados en sacarosa al 30 % en PBS. Los cerebros fueron después congelados a -35 °C en metilbutano y almacenados hasta su uso posterior a -70°C en viales de centelleo que contenían sacarosa al 30% congelada en PBS para evitar el secado del congelador. Los cerebros se

seccionaron coronalmente a 40 μm utilizando un microtomo de congelación y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en placas de 24 pocillos que contenían solución anticongelante (15 % de glucosa, 30 % de etilenglicol, tampón de fosfato 50 mMol, pH 7,4).

5 Para cada animal, las células neuronales se cuantificaron mediante tinción inmunohistoquímica con NeuN, un anticuerpo específico de las células neuronales. Las secciones que flotan libremente se aclararon (3 minutos x 2) en PBS 0,1 M antes de ser incubadas durante la noche en anticuerpo NeuN específico de neuronas primarias (1:1000), 0,3 % de Triton X-100, y 2 % de suero de cabra a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitando lentamente. Las secciones se lavaron (3 minutos x 3) en PBS 0,1 M y se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Cy3 (1:200) y 0,3 % de Triton X-100 durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones del cerebro fueron enjuagadas (3 minutos x 3) y se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina. Las secciones se dejaron secar al aire antes de ponerlas en alcohol al 100 % durante 1 minuto, se aclararon en xileno durante 3 minutos, y se pusieron con cubreobjetos con Permount.

15 Las células inmunorreactivas a NeuN se contaron usando el método disector óptico (objetivo 40X) en 3 secciones espaciadas 240 μm a lo largo del eje rostrocaudal del hipocampo dorsal (bregma $-2,8$ a $-3,8$ mm). Las secciones seleccionadas fueron comparables entre los animales. Dentro de la región CA1, se distribuyeron 3 cajas de recuento (marco de recuento = $60 \times 120\text{ }\mu\text{m}$, altura del disector = $40\text{ }\mu\text{m}$) por sección de forma sistemáticamente aleatoria. Las imágenes Z-stack de los marcos de recuento tomadas en intervalos de solapamiento de $0,7\text{ }\mu\text{m}$ se salvaron y se exportaron como imágenes de galería JPEG 2564×2051 en el software Image Browser Zeiss LSM. Las imágenes de galería JPEG se importaron y se cuantificaron usando Adobe Photoshop 7.0. Un total de 9 cajas de recuento por animal fueron cuantificadas para la región CA1 anterior. Los resultados se presentan como promedio del número total de células cuantificadas por marco de recuento.

EJEMPLO 2

EFFECTOS DE CRISIS EPILÉPTICAS SOBRE EL CEREBRO EN UN MODELO DE RATA.

25 El estado epiléptico SE fue inducido en ratas Wistar macho como se describió en el Ejemplo 1. Los efectos de las crisis epilépticas sobre el cerebro de estas ratas fueron caracterizados como se describe a continuación.

A. Caracterización de la neuropatología inducida por SE.

30 La neurodegeneración se evaluó mediante análisis estereó con el método del disector óptico y tinción para NeuN para cuantificar las neuronas. Se analizaron tres secciones coronales por animal, y se contaron de 60 a 100 neuronas por sección del cerebro en un animal naïve (no usado antes en experimentación). Los recuentos de células se realizaron a las 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 3 días, 7 días, 14 días y 3 meses después de la terminación del SE. Todos los animales desarrollaron SRSs entre 3 y 8 semanas. Al menos 4 animales fueron incluidos en todos los grupos. Hasta la fecha, se han analizado las siguientes regiones del cerebro: la capa piramidal de los subcampos del hipocampo anterior CA1, CA2, CA3, CA4, posterior dorsal CA1 y posterior ventral CA1 (D&V), los núcleos amigdaloides basolaterales (BLN), núcleos talámicos posteriores laterales (LPTN) y corteza piriforme.

35 La máxima pérdida de células ocurrió dentro de los 3 días para todas las regiones del cerebro, con la excepción de la CA1 posterior (véanse las Figuras 1 y 2). La aparición de convulsiones recurrentes espontáneas no contribuyó a más pérdida de células en estas regiones del cerebro, indicando que la neurodegeneración ocurre específicamente como consecuencia del SE sostenido. Los subcampos CA2 y CA3 del hipocampo parecían ser algo menos susceptibles a la pérdida de células (Figura 2 y 3). Los subcampos CA1 anteriores y posteriores fueron las regiones más severamente afectadas del hipocampo (más del 70% de pérdida de células). Además, la LPTN, BLN y corteza piriforme son también severamente afectadas (menos del 80 % de pérdida de células).

45 La tinción con el anticuerpo NeuN específico de las neuronas detecta la neurodegeneración por la ausencia de células NeuN-positivas, es decir, al final del proceso de neurodegeneración. En cambio, la tinción con fluoro-jade B (FJB) detecta la muerte de neuronas antes de la patología de punto final. La doble tinción con NeuN y FJB después del SE permite la detección precoz de la neurodegeneración. Por ejemplo, en los núcleos amigdaloides basolaterales apareció tinción con FJB en $8 \pm 13\%$ de las neuronas tan tempranamente como en 3 horas, en $30 \pm 6\%$ de las neuronas en 6 horas, y en $54 \pm 7\%$ de las neuronas a las 24 horas después del SE. Así pues, se detectó una iniciación rápida de los procesos que contribuyen a la neurodegeneración después del SE, con la pérdida de células detectada tan tempranamente como a las 6 horas después del SE.

50

EJEMPLO 3

TAT- NR2B9C RESCATA LA PERDIDA DE NEURONAS EN LA REGIÓN CA1 DORSAL DESPUÉS DE CRISIS EPILÉPTICAS.

5 Se indujo el estado epiléptico en ratas Wistar macho como se describió en el Ejemplo 1. Se administró Tat-NR2B9c (3 nmol/g en solución salina fisiológica) a través de la vena femoral 3 horas después de la terminación del SE a una velocidad constante de 60 µm por minuto. Las ratas se dejaron recuperar durante 14 días después del SE y luego se analizaron.

10 La neurodegeneración fue evaluada en términos de pérdida de células NeuN-positivas como se describe en los Ejemplos 1 y 2. La evolución con el tiempo típica de pérdida de células neuronales después de la inducción de crisis epilépticas se muestra en la Figura 6. La pérdida de células es máxima aproximadamente 7 días después del SE, un agotamiento que se mantiene el día 14.

Como se muestra en la Figura 8, Tat - NR2B9c rescató la pérdida de neuronas de manera dependiente de la dosis cuando se administra a ratas aproximadamente a las 3 horas después de la inducción de crisis epilépticas. En cambio, un péptido de control Tat-NR2BAA no disminuyó la neurodegeneración (Figura 4A).

15 En sorprendente contraste, Tat-NR2B9c administrado a ratas durante un estado de crisis epiléptica continua no disminuyó la pérdida de neuronas (Figura 7). Este resultado es especialmente sorprendente a la luz de estudios previos que indican que Tat-NR2B9c es altamente neuroprotector en modelos animales de infarto cerebral cuando se aplica antes o 1 hora después de un infarto cerebral (Aarts et al., 2002), y efectivo a las 3 horas después de la lesión neurológica y más allá.

20 Tat-NR2B9c era especialmente protectora en la región CA1 anterior, mientras que el péptido de control negativo Tat-NR2BAA, que no puede actuar como antagonista de PSD-95, no lo era (Figura 4A). Una comparación de los efectos diferenciales de Tat-NR2B9c dependiendo del tiempo de administración en relación con las crisis epilépticas se presenta en las Figuras 5 y 4B. La pérdida de neuronas en ratas a las que se ha administrado Tat-NR2B9c durante el estado epiléptico fue comparable a la pérdida de neuronas en ratas no tratadas, incluso a altas dosis de Tat-NR2B9c (9 nmol/g) (Figuras 4B, 5 y 7). En contraste llamativo, las dosis más bajas de Tat-NR2B9c (0,3 nmol/g y 3 nmol/g) confirieron neuroprotección (Figuras 4B, 5 y 7) cuando se dan después de la terminación del estado epiléptico.

EJEMPLO 4

30 VISUALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE LA NEUROPROTECCIÓN DESPUÉS DE CRISIS EPILÉPTICAS MEDIANTE TAT- NR2B9C.

Se indujeron convulsiones en ratas Wistar macho y se administró Tat-NR2B9c 3 horas después de la lesión, como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Los cerebros se fijaron, se seccionaron y se inmunotifaron con NeuN como se describió anteriormente. Secciones coronales del hipocampo dorsal se visualizaron bajo un microscopio a 2,5 aumentos, y las imágenes representativas se muestran más adelante. Figura 8, panel de la izquierda, muestra el aumento de la inmunotinción con NeuN como resultado de la administración de Tat-NR2B9c, siendo los mejores resultados (los más próximos al control sin SE) los obtenidos con la cantidad más alta de Tat-NR2B9c.

40 Cuando las secciones de la región dorsal CA1 del hipocampo fueron observadas bajo 40 aumentos, el número de células teñidas con NeuN disminuyó grandemente en las ratas tratadas con pilocarpina en comparación con las ratas tratadas con solución salina. Este efecto se invirtió por la administración de Tat-NR2B9c (Figura 8, panel izquierdo).

EJEMPLO 5

TAT- NR2B9C REDUCE DRÁSTICAMENTE EL TAMAÑO DE LOS VENTRÍCULOS LATERALES DESPUES DE UN SE.

45 Después de la administración de pilocarpina y Tat-NR2B9c, y la fijación de las secciones del cerebro, como se describió anteriormente, cada sexta sección fue utilizada para la tinción de Nissl con violeta de cresilo. Las secciones fueron montadas y se dejaron secar al aire sobre portaobjetos recubiertos con gelatina. Las secciones se rehidrataron en una serie de alcohol al 100 %, al 95 %, al 70 % y al 50 %, durante 5 minutos en cada uno. Las secciones se ponen después en agua durante 1 minuto, seguido por el colorante violeta de cresilo durante 20 a 30 minutos (o menos), 95 % durante 5 minutos (o menos), 100 % durante 5 minutos (o menos), y 100 % durante 5 minutos (o menos). La máxima diferenciación se produce a los gradientes de alcohol de 50 % y 70%. Las secciones se aclararon en xileno durante 5 minutos, se cubrieron con Permount, y se observaron, p. ej., bajo 40 aumentos.

Mientras que las ratas que experimentaron convulsiones tenían ventrículos laterales muy grandes, la administración de Tat-NR2B9c los redujo al tamaño que se observa en las ratas a las que no se ha administrado pilocarpina.

La Figura 11 muestra una reducción drástica del tamaño del ventrículo lateral en los animales tratados con Tat-NR2B9c a las 3 horas posteriores al SE. En las secciones teñidas con Nissl comparables, los animales tratados con Tat-NR2B9c a las 3 horas posteriores al SE tenían ventrículos laterales notablemente más pequeños en comparación con los animales no tratados.

EJEMPLO 6

Tat-NR2B9c MEJORA EL DETERIORO COGNITIVO CAUSADOS POR LAS CRISIS EPILÉPTICAS.

Los autores de la presente invención investigaron los posibles efectos sobre el comportamiento de 60 min de SE inducido con el procedimiento RLDP. Se investigó la memoria visual-espacial con el laberinto de agua de Morris (MWM) a las 8 semanas posteriores al SE para detectar el deterioro cognitivo crónico. El MWM tiene una particular utilidad en estudios en los que están implicados agentes terapéuticos, ya que la gravedad de la neurodegeneración en la región CA1 anterior está fuertemente correlacionada con el rendimiento (latencia de escape) (Clasussen et al., 2005). Cuatro grupos de animales fueron comparados en el presente análisis: 1) controles que recibieron solución salina en vez de pilocarpina y no entraron en SE, 2) no grupo de SE que recibió hasta 6 dosis bajas repetidas de pilocarpina, pero no entraron en SE, 3) grupo de SE que entró en SE inducido por el procedimiento RLDP, y 4) grupo de Tat-NR2B9c que entró en SE inducido por el procedimiento RLDP y se le administró el fármaco Tat-NR2B9c a las 3 horas posteriores al SE vía canulación de la vena femoral (los resultados obtenidos con Tat-NR2B9c se discutirán en la sección 4)). Todos los grupos contenían al menos 6 animales.

Se evaluaron varias funciones cognitivas de los ratones epilépticos tratados o no tratados con Tat-NR2B9c de la siguiente manera:

i) Laberinto en cruz elevado:

El laberinto en cruz (*plus maze*) elevado se usa para investigar la conducta exploratoria. A las 8 semanas posteriores al SE, los animales se pusieron en el laberinto en cruz elevado durante 5 minutos y grabaron en vídeo. Los animales SE pasaron menos tiempo (50 %) en el brazo cerrado, en comparación con los controles (86 %), y tenían un mayor número de entradas en el brazo abierto y menos entradas en el brazo cerrado (Figura 12 A-D). Además, los animales SE tenían una frecuencia reducida de miradas en el brazo abierto y episodios de *rearing* en comparación con los controles (Figura 12 E y F). Los animales tratados con Tat-NR2B9c, en comparación con los animales no tratados, disminuyeron estos efectos del SE sobre el comportamiento exploratorio.

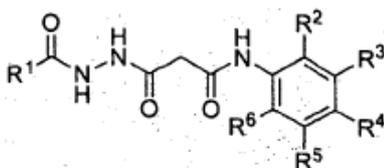
ii) Laberinto de agua de Morris:

Los autores de la presente invención encontraron que las ratas SE mostraban una clara mejora en el rendimiento a lo largo de pruebas repetidas y de días (Figura 13). En el estudio de los autores de la presente invención, los animales fueron entrenados en la tarea MWM durante 14 días consecutivos, con 6 ensayos completados diariamente. Como se representa en la Figura 13B, los animales SE mostraron una mejoría inter-ensayos (detectada como la diferencia entre las pruebas 4-5 de las pruebas 1-2) sobre todos los días de entrenamiento. En cambio, los animales no SE no muestran ninguna mejora después del día 6, puesto que ya habían aprendido la posición de la plataforma. Fig. 13A muestra que los animales SE mostraron una modesta mejora en la latencia de escape a lo largo de días repetidos. Ningún animal SE, sin embargo, aprendió la tarea dentro de 6 días consecutivos, sin más mejoras en la latencia de escape después de esto.

Aunque la invención que antecede ha sido descrita en detalle con el propósito de una mayor claridad de comprensión, puede ser obvio que se pueden poner en práctica ciertas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Si más de una versión de secuencia está asociada con el mismo número de acceso en diferentes momentos, la referencia a ese número de acceso significa la versión asociada a ella en el momento de presentar la presente solicitud remontándose a cualquier solicitud de prioridad que también incluye ese número de acceso. A menos que sea evidente de otro modo a partir del contexto, cualquier etapa, característica, elemento o realización se pueden utilizar en combinación con cualquier otro.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de PSD-95 que bloquea la unión de un ligando de unión con PDZ a un dominio PDZ de PSD-95 para su uso en el tratamiento de la epilepsia, en donde el inhibidor es administrado al menos aproximadamente una hora después de la terminación de un episodio de epilepsia.
- 5 2. El inhibidor para ser usado en la reivindicación 1ª, que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende [S/T] - X - [V/L] en su término C, opcionalmente en donde el péptido está enlazado a un péptido de internalización.
3. El inhibidor para ser usado en la reivindicación 2ª, en donde el péptido es KLSSIESDV (SEC ID NO: 9) o KLSSIETDV (SEC ID NO: 7), opcionalmente en donde el péptido está enlazado a un péptido de internalización.
- 10 4. El inhibidor para ser usado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el episodio de epilepsia comprende una crisis epiléptica continua que dura no más de aproximadamente 20 minutos, o comprende al menos dos crisis epilépticas sin retorno a la consciencia entre las dos crisis, o la epilepsia comprende epilepsia del lóbulo temporal.
- 15 5. El inhibidor para ser usado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la actividad epiléptica se observa en la región CA1 del cerebro.
6. El inhibidor para ser usado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el episodio de epilepsia tiene una duración de menos de aproximadamente 10 minutos.
7. El inhibidor para ser usado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la duración del episodio de epilepsia se determina usando electroencefalografía.
- 20 8. El inhibidor para ser usado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor se administra al menos aproximadamente tres horas después de la terminación de un episodio de epilepsia.
9. El inhibidor para ser usado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor se administra no más tarde de aproximadamente una semana después de la terminación de un episodio de epilepsia.
10. El inhibidor para ser usado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor se administra no más tarde de aproximadamente un día después de la terminación de un episodio de epilepsia.
- 25 11. El inhibidor para ser usado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor es Tat-NR2B9c (SEC ID NO: 10).
12. El inhibidor para ser usado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor es F-Tat-NR2B9C (SEC ID NO: 46).
- 30 13. El inhibidor para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor es 0625-0057.
14. El inhibidor para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene la estructura:



35 en donde R¹ es un miembro elegido entre el grupo que consiste en ciclohexilo sustituido con 0-4 R⁷, fenilo sustituido con 0-4 R⁷, -(CH₂)_u-(CHR⁸R⁹), un alquilo C₁₋₆ ramificado (isopropilo, isobutilo, 1-isopropil-2-metil-butilo, 1-etil-propilo), y -NH-C(O)-(CR¹⁰R¹¹)_vH;

cada R⁷ es independientemente un miembro elegido entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, -C(O)R¹², OH, COOH, -NO, indolina N-sustituida y un péptido de translocación de la membrana celular

ES 2 446 306 T3

cada R^8 y R^9 se elige independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, ciclohexano, ciclopentano, fenilo, fenilo sustituido (p. ej. sustituido con grupos halo, alquilo y/o hidroxilo) y ciclopentadieno;

cada R^{10} y R^{11} se elige independientemente entre el grupo que consiste en H, ciclohexano, fenilo y un péptido de translocación de la membrana celular;

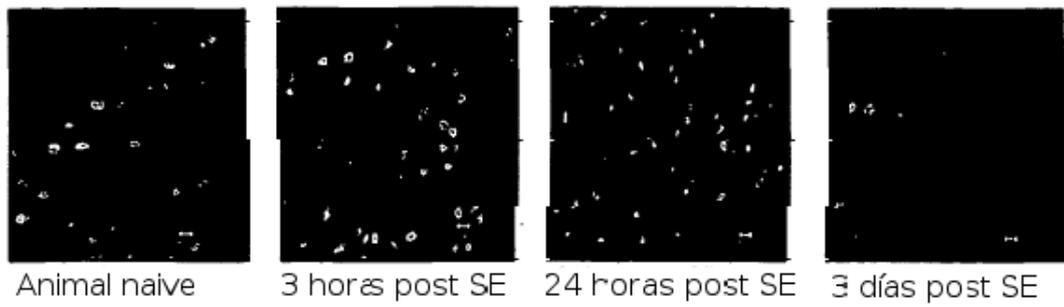
5 R^{12} es un miembro elegido entre el grupo que consiste en alquilo C_{1-6} y arilo; y

cada uno de los valores u y v son independientemente de 0 a 20;

en donde uno de los grupos R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 es $-COOH$, y en donde el resto de los grupos R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son elegidos cada uno de ellos independientemente entre el grupo que consiste en F, H, OCH_3 y CH_3 .

Figura 1

A



B

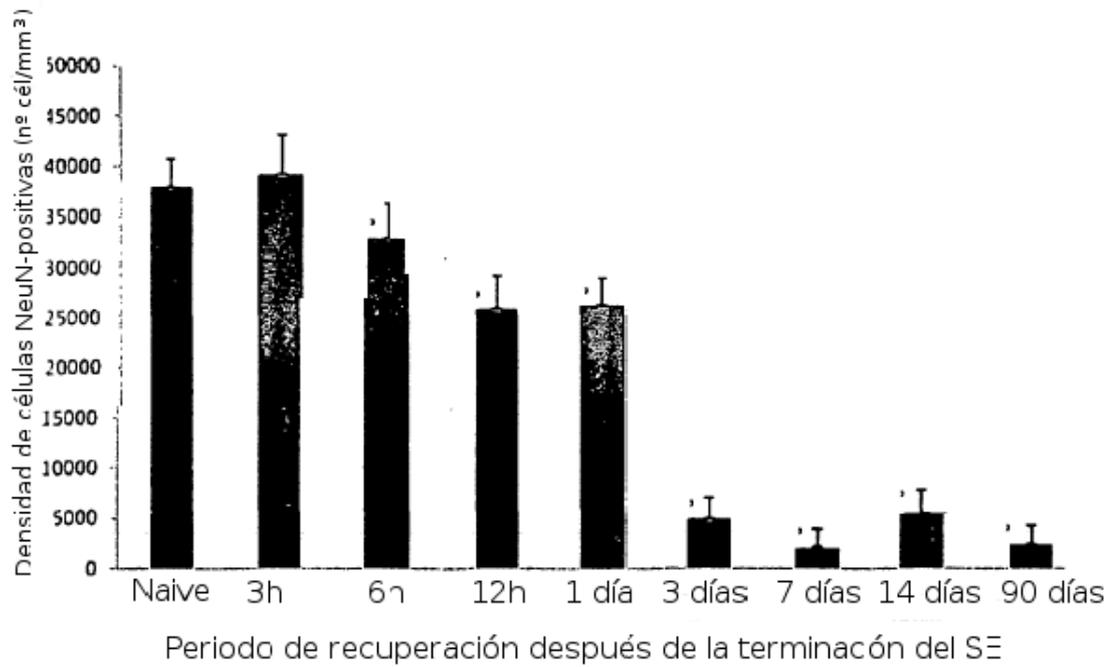
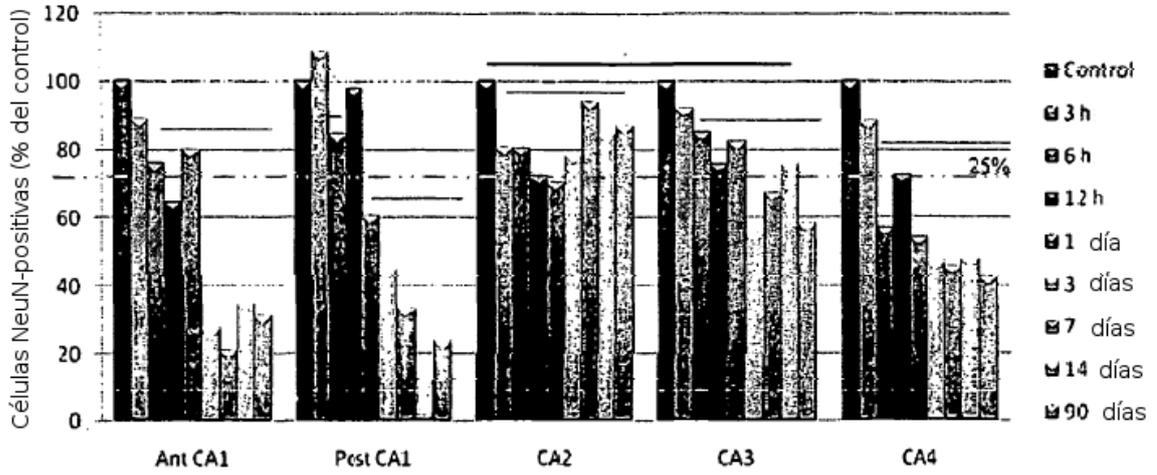


Figura 2

A



B

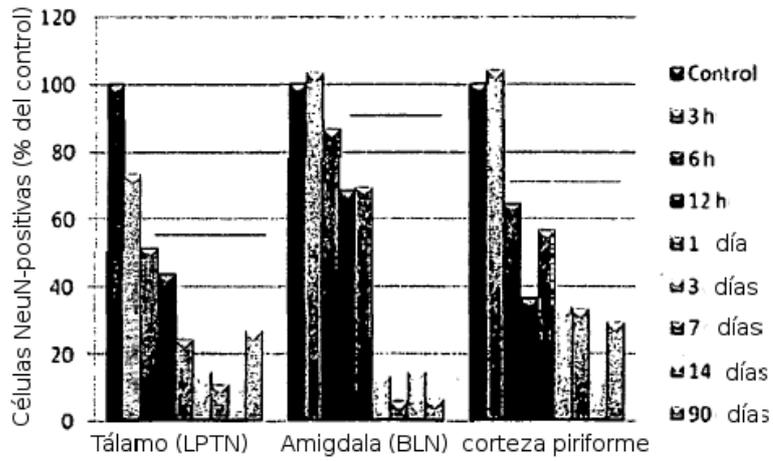


Figura 3**A) Patrón temporal de neurodegeneración después de 60 minutos de estado epiléptico**

Regiones del cerebro
Subcampos del hipocampo

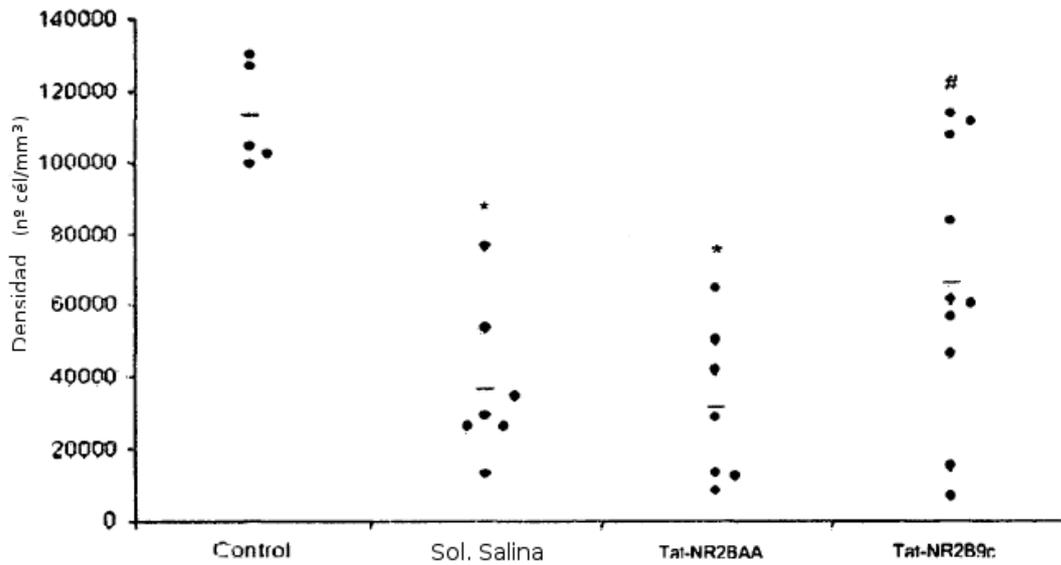
	Anterior CA1	Posterior CA1 (D&V)	CA2	CA3	CA4	Amígdala (BLN)	Tálamo (LPTN)	Corteza Piriforme
Naive	113188±20463	88877±14453	102286±81017	46069±2545	46207±6904	37905±6980	22897±6881	34472±8632
3 h	78815±15948	96674±6893	79832±62371	42371±3086	40791±3576	39207±7755	16790±3796	35847±5772
6 h	86094±7058*	75234±14932	79832±59875*	39074±9031*	26267±3597*	32841±6885*	11743±5040*	22181±1129*
12 h	73063±4166*	87006±2507	81094±51144*	34817±9193*	33581±9914*	25896±6345*	9991±849*	12498±12432*
24 h	90502±19821*	53872±8847*	86071±19946*	37838±4987*	25082±7104*	26186±5456*	5562±4465*	19503±11949*
3 días	30569±17150*	39527±18036*	77340±57368*	25409±10220*	21621±5614*	4918±4132*	3296±2306*	11539±4513*
7 días	23540±5959*	29470±6782*	94790±58629*	31040±7951*	21013±10193*	2170±3610*	2472±2874*	11468±4064*
14 días	39262±23817*	11616±3070*	88567±56133*	34840±4186*	22132±14485*	5497±4394*	2575±2761*	4166±3633*
90 días	42735±34939*	21018±5448*	87567±56133*	26782±8837*	19674±13152*	2459±3547*	8652±7285*	10026±3127*

Los valores se expresan en densidad celular (nº de células/mm³) ± desviación estándar. Cada grupo tenía al menos 4 animales.

* Diferente del grupo naive (p<0,05).

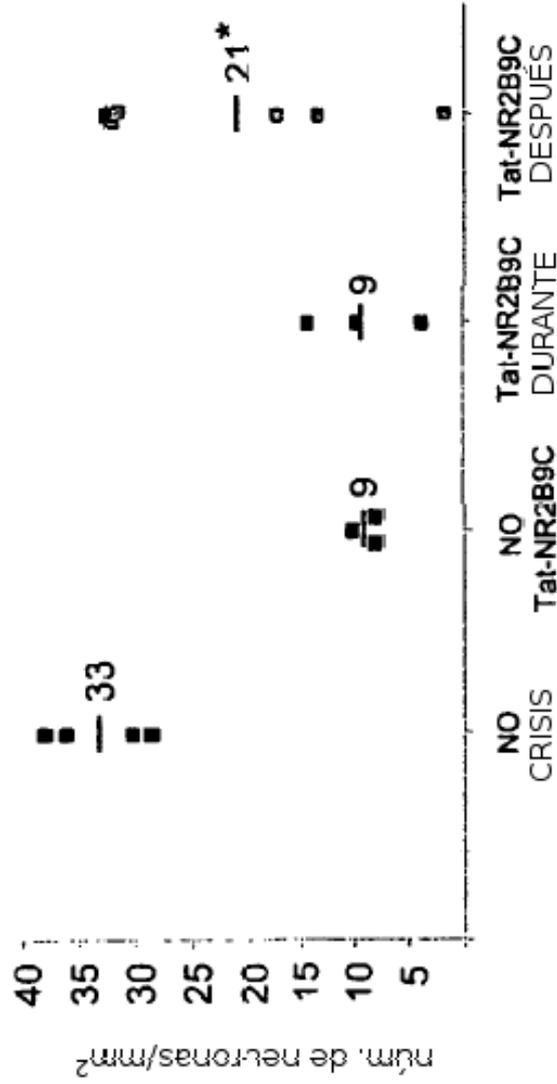
Figura 4A

Tat-NR2B9c es neuroprotector en la región CA1 anterior del hipocampo



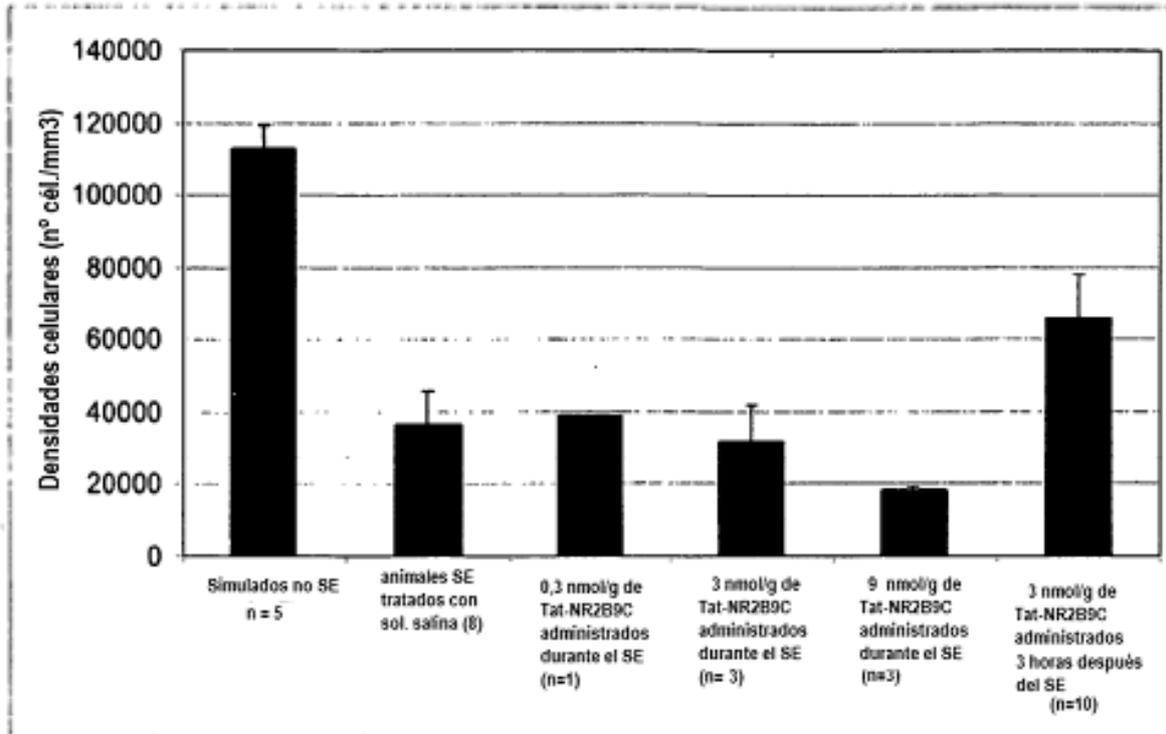
*Diferente de animales de contro. #Diferente de grupos tratados con sol. salina y Tat-NR2B9c. Los puntos representan animales individuales. Los guiones representar media del grupo.

Figura 4B



Animales experimentados 60 minutos de SE inducido por Li/pilocarpina.
 Se administró Ta: NR2B9C (nmol/g) en SE o 3h después de la administración del SE.
 Los animales fueron sacrificados 14 días después de la terminación del SE.
 */Significativamente diferente de "NO Tat-NR2B9C"

Figura 5



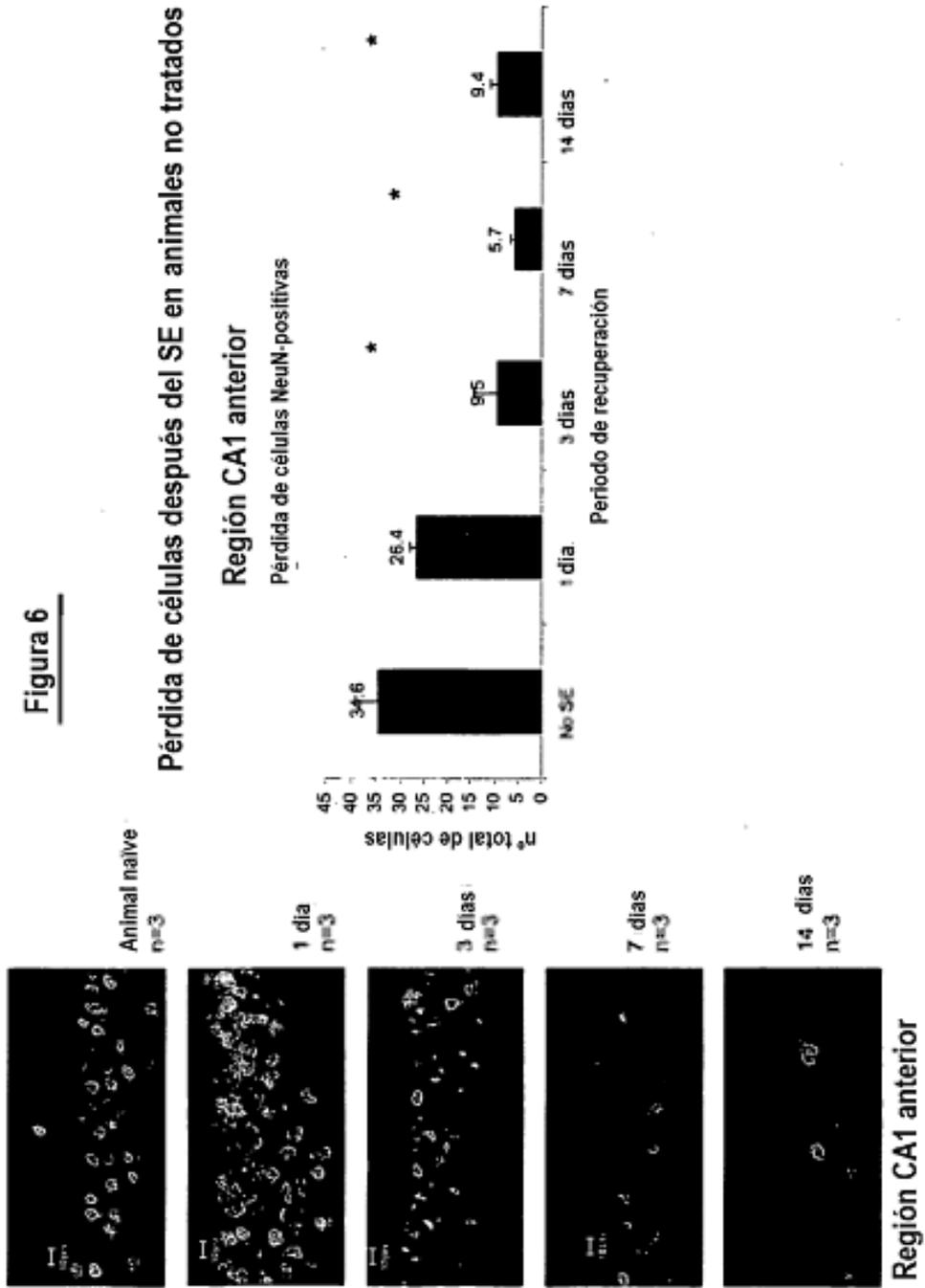


Figura 7
Tat-NR2B9c administrado durante el SE

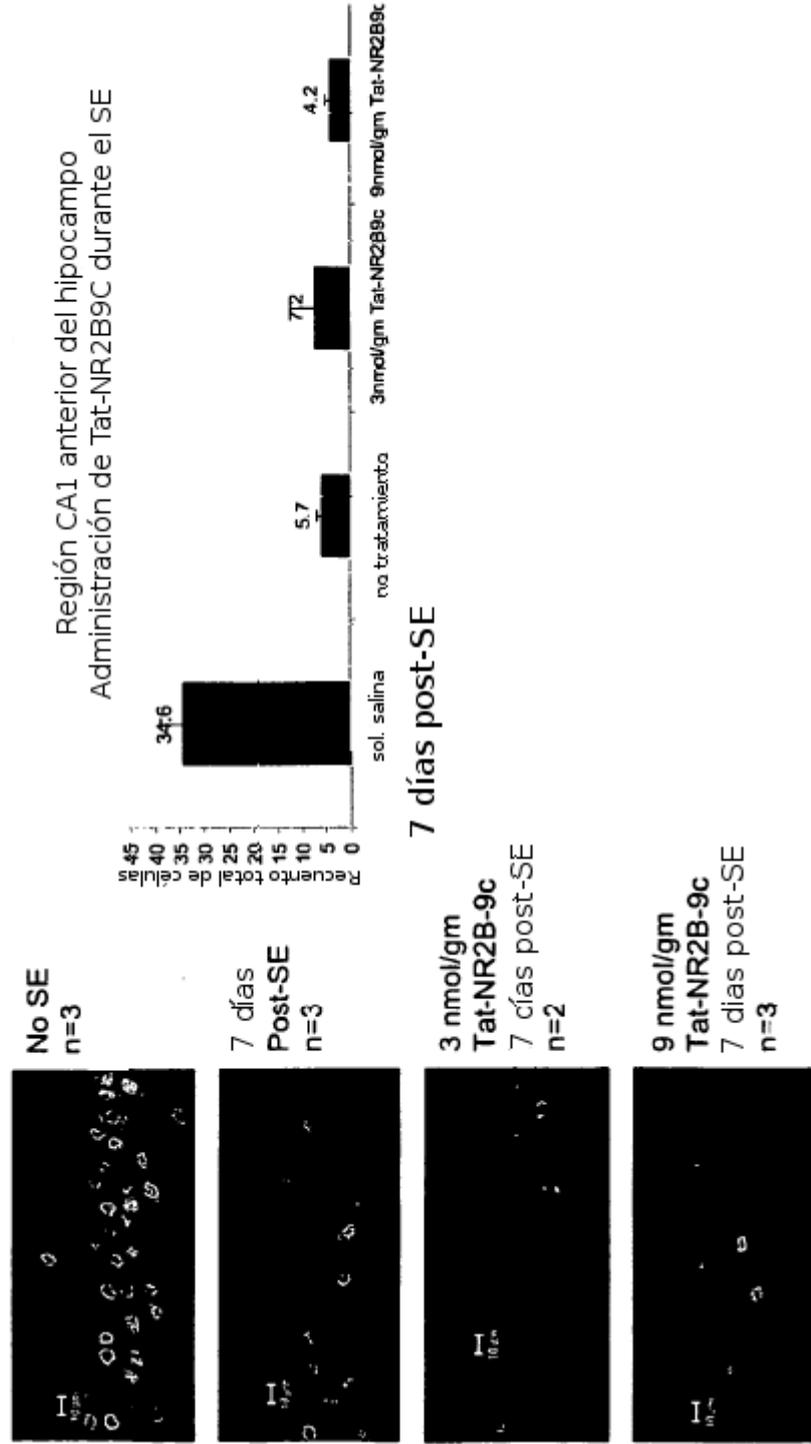


Figura 8
Tat-NR2B9C administrado post-SE

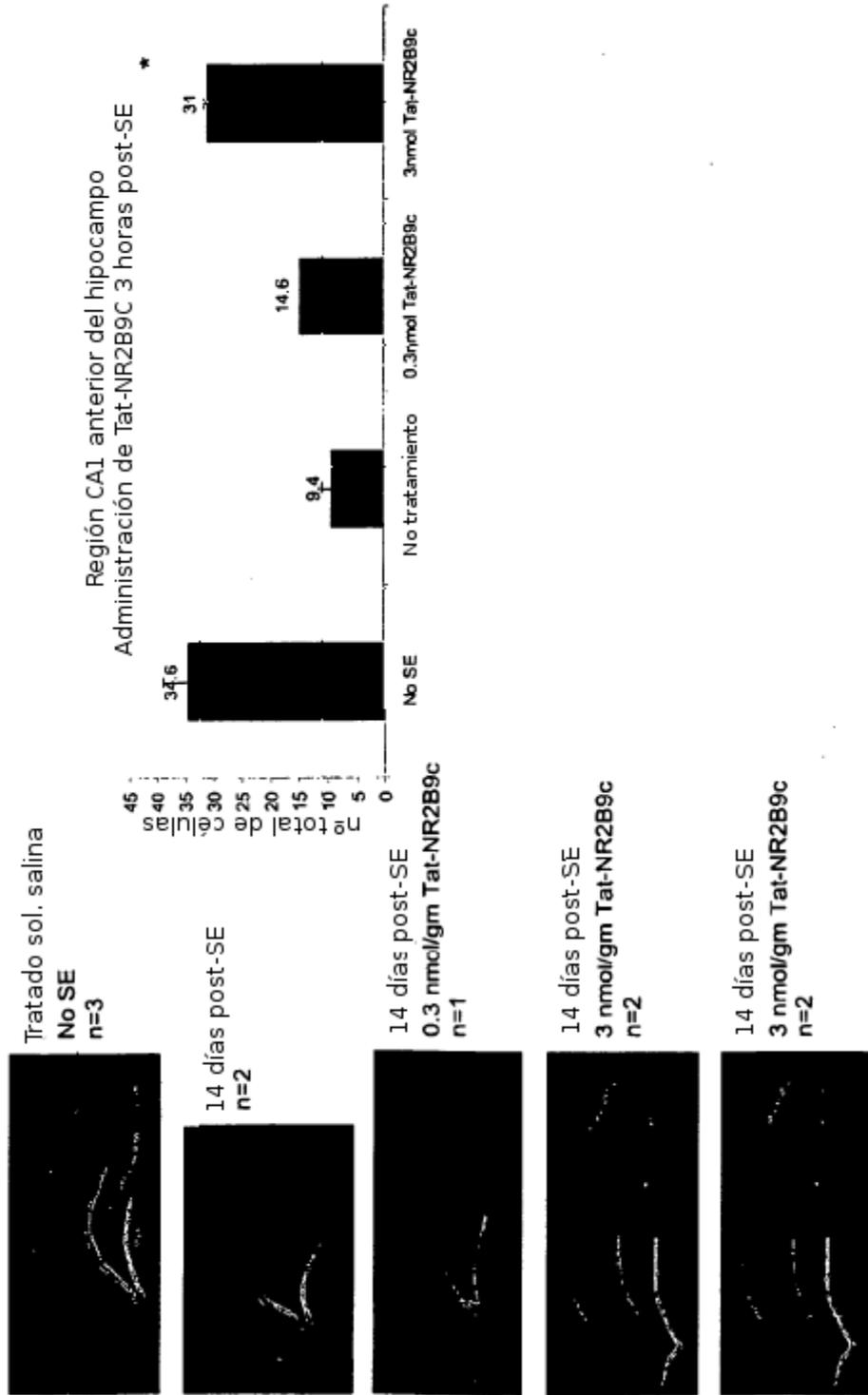
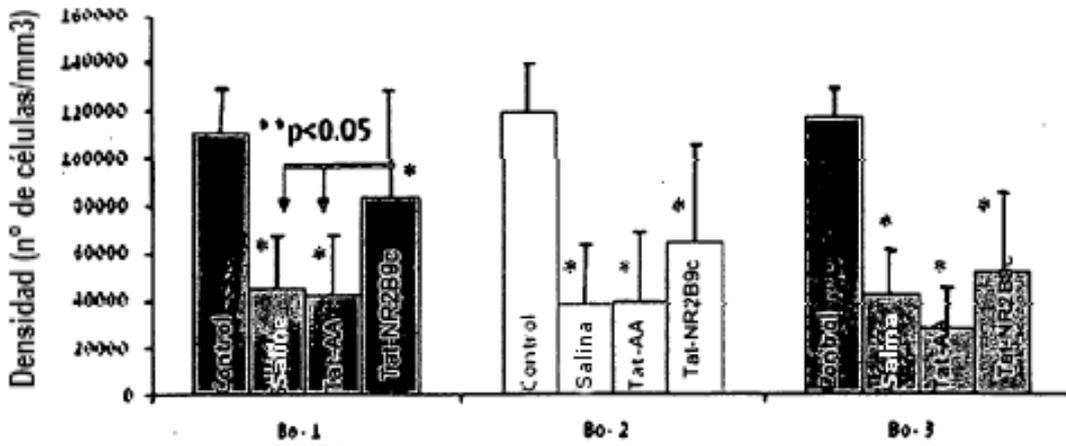
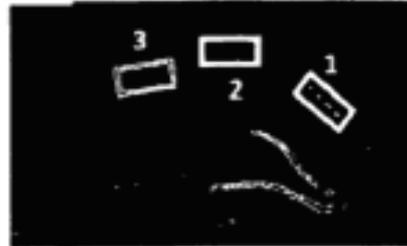


Figura 9

Tat-NR2B9C protege cerca del borde subicular de la región CA1

animal SE tratado con sol. salina (6)

animal SE tratado con Tat-NR2B9C (10)

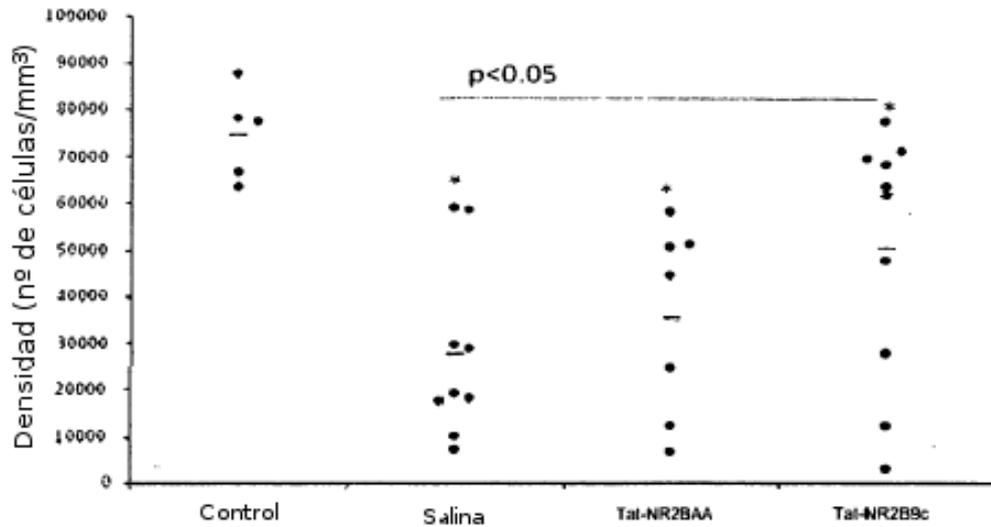


* $p < 0,05$ representa medios diferentes del control

** Tat-NR2B9C es diferente de los grupos de sol. salina y Tat-NR2B9AA ($p < 0,01$)

Figura 10

Tat-NR2B9c es altamente protector en la región CA4



* Diferente de los animales de control. La barra indica que Tat-NR2B9c es diferente de sol. salina ($p < 0,05$). Los puntos representan animales individuales. El guión representa media del grupo.

Figura 11

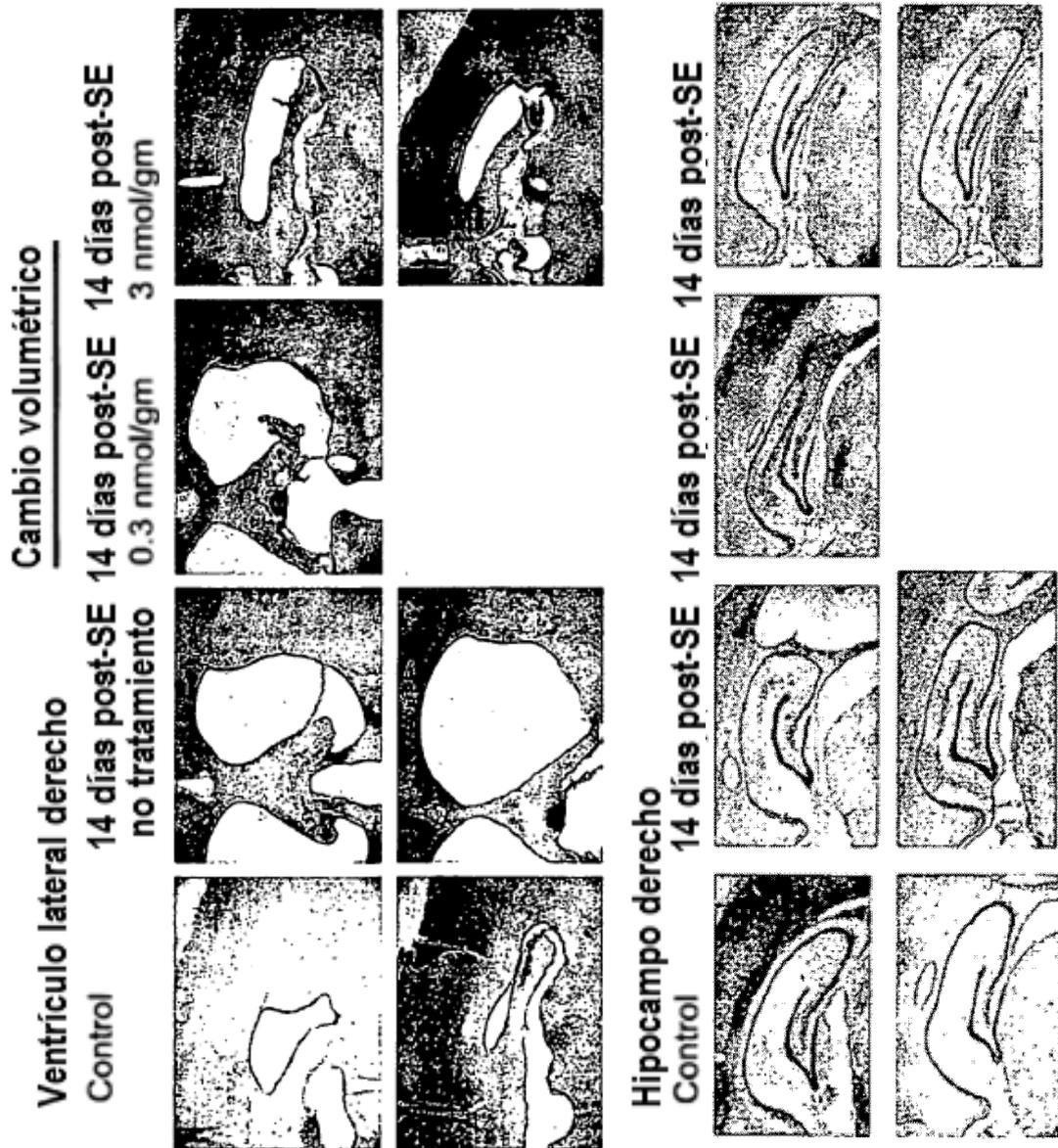


Figura 12

El laberinto en cruz elevado es muy sensible en la discriminación entre animales SE y no SE

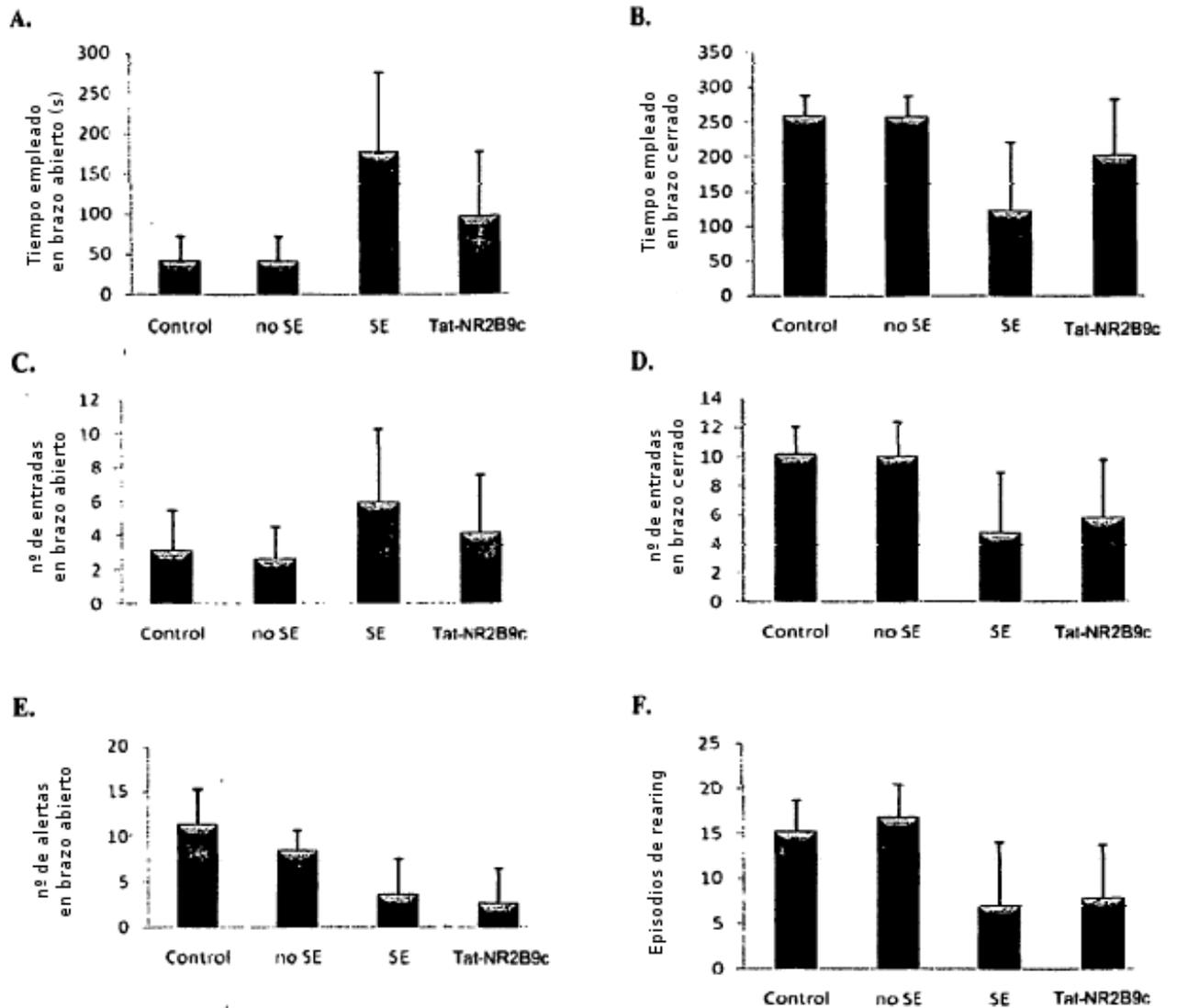
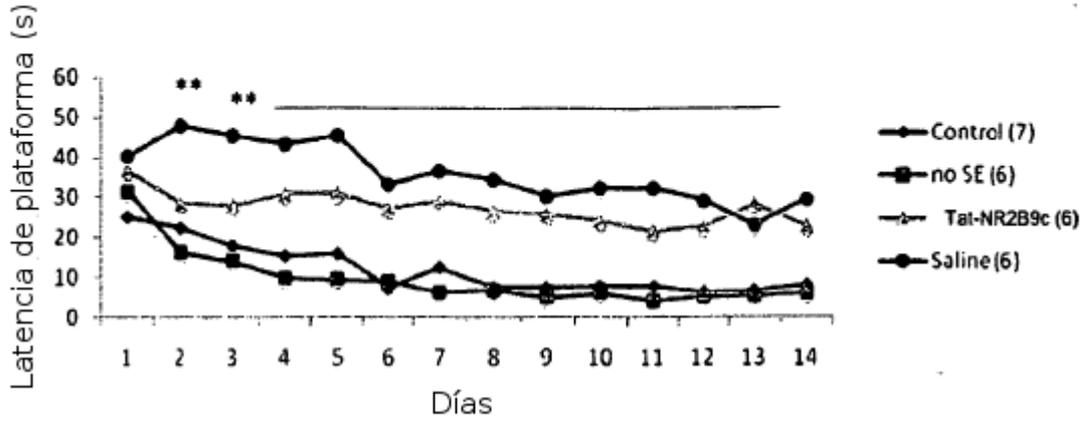


Figura 13

Laberinto de agua de Morris

A.



B.

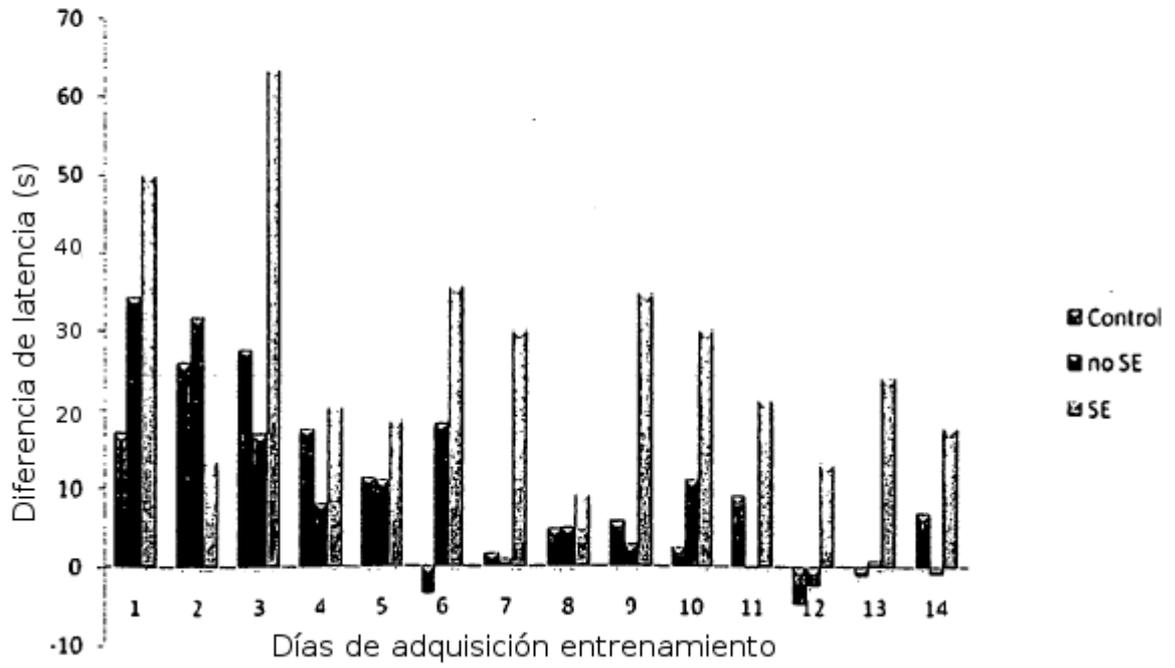


Figura 14

