

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 522**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**C07K 5/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2009 E 09780378 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2320927**

54 Título: **Péptidos modificados como inhibidores potentes de la interacción entre receptor de NMDA/PSD-95**

30 Prioridad:

**09.07.2008 EP 08160017**

**09.07.2008 US 79290 P**

**23.10.2008 US 107933 P**

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

**06.08.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF COPENHAGEN (100.0%)**

**Norregade 10**

**1165 Copenhagen K , DK**

72 Inventor/es:

**BACH, ANDERS y**

**STRØMGAARD, KRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 542 522 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

Péptidos modificados como inhibidores potentes de la interacción entre receptor de NMDA/PSD-95

**Campo de la invención**

5 La interacción proteína-proteína entre el receptor de NMDA y su proteína intracelular de armazón, PSD-95, es una posible diana para el tratamiento de la lesión isquémica o traumática del sistema nervioso central (SNC). La presente invención se dirige al abastecimiento de moléculas pequeñas que inhiben la interacción de PSD-95 con el receptor de NMDA, mediante el empleo de un undecapéptido que corresponde al extremo carboxilo del NMDA como plantilla para hallar los candidatos iniciales.

**Antecedentes de la invención**

10 Las interacciones proteína-proteína (PPI, por su nombre en inglés) son esenciales para los procesos celulares vitales y están implicadas en numerosos estados fisiopatológicos en los que funcionan de posible diana para la intervención terapéutica. Por lo general, se ha percibido que es difícil actuar selectivamente sobre las PPI con moléculas orgánicas pequeñas, ya que a menudo se caracterizan por tener superficies de contacto grandes, planas e hidrófobas.

15 Una clase de PPI es la que implica los dominios PDZ [PDZ es una abreviatura de PSD-95 (la proteína 95 de densidad postsináptica),DlgA (supresor tumoral grande de discos homólogo de *Drosophila*) y ZO-1 (proteína 1 de *zonula occludens*)]. Los dominios PDZ a menudo funcionan como módulos en las proteínas de armazón que están implicadas en el ensamblaje de grandes complejos de proteínas de la célula, y son muy abundantes en los organismos eucariotas. Los dominios PDZ comprenden aproximadamente 90 aminoácidos e interactúan por lo  
20 general con sólo unos pocos aminoácidos de la parte carboxiterminal de la proteína con la que interactúa. Los dominios PDZ típicamente se dividen en tres clases de acuerdo con la secuencia de sus ligandos. PSD-95 contiene tres dominios PDZ, PDZ1-3, que se fijan a ligandos peptídicos con la secuencia consenso Glu/Gln-Ser/Thr-X-Val-COOH, por lo que se denominan dominios PDZ de clase I.

La base estructural para la interacción de los dominios PDZ con los péptidos del extremo carboxilo se elucidó  
25 primero mediante una estructura cristalográfica por rayos X del PDZ3 de PSD-95 formando complejo con un ligando peptídico nativo, CRIPT. PDZ3 contiene seis hojas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta$ A- $\beta$ F) y dos hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A y  $\alpha$ B) y el ligando peptídico del extremo carboxilo se fija como una hoja  $\beta$  antiparalela adicional en un surco entre la hoja  $\beta$ B y la hélice  $\alpha$ B. Dos restos del ligando peptídico se consideran particularmente importantes para la afinidad y la especificidad, el primer aminoácido ( $P^0$ ) y el tercer aminoácido ( $P^2$ ) (a contar desde el extremo carboxilo). La cadena lateral del  
30 aminoácido en la posición  $P^0$  se proyecta en un bolsillo hidrófobo y se requiere un aminoácido de cadena lateral alifática (Val, Ile y Leu). En la estructura PDZ3-CRIPT, el oxígeno hidroxílico de la Thr ( $P^2$ ) forma un puente de hidrógeno con el nitrógeno de una cadena lateral imidazólica de la His372, que es un resto muy conservado en los dominios PDZ de clase I. Un motivo Gly-Leu-Gly-Phe conservado (posición 322-325 en PDZ3) y un resto cargado positivamente (Arg318 en PDZ3) de los dominios PDZ intervienen en la fijación al grupo carboxilato del extremo  
35 carboxilo.

Los dominios PDZ1 y PDZ2 de PSD-95 interactúan con una serie de proteínas que incluyen un grupo de receptores ionótrofos de glutamato, el receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Este receptor es un canal de iones heterotetramérico que suele estar formado por dos subunidades, NR1 y NR2, y se abre con glutamato y glicina. El receptor de NMDA (NMDAR) desempeña una función clave en varias enfermedades encefálicas del SNC, pero ha  
40 sido difícil desarrollar fármacos que interactúen directamente con el receptor de NMDA. Por lo tanto, se necesitan estrategias alternativas para modular la actividad del receptor de NMDA; una de tales estrategias es la alteración de la interacción entre PSD-95 y receptor de NMDA. La PSD-95 se fija simultáneamente al receptor de NMDA, principalmente a las subunidades NR2A y NR2B, y la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) a través de PDZ1 o PDZ2 (figura 1). La activación del receptor de NMDA ocasiona una entrada de  $Ca^{2+}$ , lo que activa a la nNOS,  
45 con lo que se acaba generando óxido nítrico (NO). Así pues, la PSD-95 interviene en una asociación específica entre la activación del receptor de NMDA y la producción de NO, lo que puede ser perjudicial para las células si se mantiene durante mucho tiempo (figura 1).

La inhibición de la interacción de entre PSD-95 y el receptor de NMDA se sabe que impide el daño cerebral isquémico en los ratones, supuestamente al alterar la conexión funcional entre la entrada de  $Ca^{2+}$  y la producción de  
50 NO, mientras que la función fisiológica del receptor de NMDA permanece intacta<sup>1</sup>. El desacoplamiento de PSD-95 de la subunidad NR2B se consiguió mediante un nonapéptido, correspondiente al extremo carboxilo de NR2B, fusiónado al péptido Tat del VIH-1, conocido por su capacidad para facilitar la permeabilidad de la membrana. Este péptido icosamérico (Tat-NR2B, 3, Tabla 1) está actualmente en ensayos clínicos como un posible fármaco para el tratamiento de la isquemia cerebrovascular, tal y como se observa en el accidente cerebrovascular<sup>2-4</sup>. Sin embargo,  
55 los péptidos no suelen ser candidatos farmacológicos atractivos debido a su poca biodisponibilidad, su inestabilidad *in vivo* y la poca tolerancia del paciente debido al desarrollo de «inmunogenia» contra el péptido administrado.

El bolsillo de fijación de los dominios PDZ, que incluye un pequeño motivo lineal, tiene un área superficial relativamente pequeña y una forma desfavorable, que hace que los dominios PDZ sean difíciles de alcanzar con

moléculas pequeñas. Estas dificultades quedan reflejadas por la poca cantidad de moléculas pequeñas capaces de inhibir las interacciones del dominio PDZ.

### Compendio de la invención

- 5 La presente invención se define mediante las reivindicaciones. De acuerdo con una primera realización, la invención da a conocer un compuesto que comprende un primer péptido y un segundo análogo peptídico conectados a través de un conector, en donde cada uno del péptido o análogo peptídico comprende al menos cuatro restos unidos por amida que tienen la secuencia YTXV o YSXV, en donde Y se selecciona de E, Q y A; y X se selecciona de entre A, Q, D, N, *N*-Me-A, *N*-Me-Q, *N*-Me-D y *N*-Me-N. En una segunda realización, el péptido o análogo peptídico está *N*-alquilado en la posición P<sup>-3</sup> de la secuencia.
- 10 El conector del compuesto puede comprender PEG, que tiene una longitud de 1 a 28 restos (n = 1-28) de etilenglicol, preferiblemente de 1 a 12 restos (n = 1-12), más preferiblemente de 4 a 6 restos (n = 4-6).
- Un compuesto de acuerdo con la primera o la segunda realización es preferiblemente el que es capaz de inhibir la interacción proteína-proteína entre el NMDAR y PSD-95 (a saber, inhibidor de NMDAR/PSD-95).
- 15 Se da a conocer un compuesto de acuerdo con la primera o segunda realización, en donde el péptido o análogo peptídico tiene de 4 a 10 restos de longitud unidos por amida, preferiblemente de 5 o 4 restos de longitud unidos por amida.
- Se da a conocer un compuesto de acuerdo con la primera o la segunda realización, en donde el péptido o análogo peptídico comprende al menos 4 restos de aminoácidos L. Preferiblemente, el resto X del compuesto se selecciona de entre A, Q y D.
- 20 Se da a conocer un compuesto de acuerdo con la segunda realización, en donde el péptido o análogo peptídico está *N*-alquilado (en la posición P<sup>-3</sup>) con un sustituyente cicloalquilo, y además comprende un grupo espaciador entre el sustituyente y el grupo amino terminal del péptido o análogo peptídico, en donde el espaciador es un grupo alquilo. El grupo alquilo se selecciona preferiblemente de metileno, etileno, propileno y butileno. El sustituyente cicloalquilo del compuesto puede ser ciclohexano.
- 25 Se da a conocer un compuesto de acuerdo con la segunda realización, en donde el péptido o análogo peptídico está *N*-alquilado (en la posición P<sup>-3</sup>) con un sustituyente aromático, y comprende adicionalmente un grupo espaciador entre el sustituyente y un grupo amino terminal del péptido, en donde el espaciador es un grupo alquilo. El grupo alquilo se selecciona preferiblemente de entre metileno, etileno, propileno y butileno. El sustituyente aromático del compuesto puede ser un resto naftalén-2-ilo. Cuando el sustituyente aromático del compuesto es un anillo aromático,
- 30 el anillo aromático puede estar sustituido con uno o dos átomos de halógeno (por ejemplo, cloro o flúor) y/o grupo alquilo.
- En un caso, el resto aminoacídico V del péptido está sustituido por *tert*-leucina.
- Se da a conocer un compuesto de acuerdo con la segunda realización, en donde el péptido o análogo peptídico está unido covalentemente a una poliamina o a una diamina.
- 35 La descripción da a conocer además un complejo que comprende un dominio PDZ y un compuesto de acuerdo con la primera o segunda realización. Preferiblemente, el dominio PDZ del complejo es un dominio PDZ1 y/o PDZ2 comprendidos en una proteína PSD-95.
- La invención está dirigida además al uso de la *N*-alquilación de un resto amino terminal de un péptido o análogo peptídico para mejorar su afinidad por un dominio PDZ. Por consiguiente, la *N*-alquilación se puede utilizar para
- 40 mejorar la afinidad de un compuesto por un dominio PDZ de PSD-95. Preferiblemente, la interacción es entre NMDAR y PSD-95, y el NMDAR está comprendido en una célula.
- La invención se dirige además al uso de un conector para dimerizar un ligando o péptido capaz de fijarse a PDZ para mejorar su afinidad y selectividad por las proteínas que contienen dominios PDZ en tándem. Preferiblemente, el conector es un conector de PEG que comprende de 1 a 28 restos de PEG, más preferiblemente de 1 a 12 restos de
- 45 PEG, y la interacción es entre NMDAR y PSD-95, y el NMDAR está comprendido en una célula.
- La invención da a conocer adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la primera o segunda realización, para ser usada como un medicamento. La composición farmacéutica se puede utilizar en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad relacionada con la excitotoxicidad, de acuerdo con la reivindicación 15, preferiblemente lesión isquémica o traumática del SNC.
- 50 La invención da a conocer adicionalmente un kit que comprende la composición farmacéutica de la invención, que además comprende medios para administrar la composición a un sujeto.

**Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Esquema que muestra la activación del receptor de NMDA durante la isquemia. Durante la isquemia se libera una cantidad excesiva de glutamato. Esta liberación activa los receptores de NMDA unidos a la membrana, lo que conduce a que los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  entren en las células. Debido a la colocalización de los receptores de NMDA y nNOS mediada por PSD-95, esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  está acoplada a la posible producción perjudicial de NO.

Figura 2. A) Valores de  $K_i$  de la interacción con PDZ1 y PDZ2 para péptidos truncados. B) Valores de  $K_i$  por PDZ1 y PDZ2 de un barrido con Ala realizado con un pentapéptido (7). Las barras de error indican el EEM basado en al menos cuatro mediciones independientes.

Figura 3. Gel de SDS-PAGE teñido con plata que muestra el péptido con el dominio PDZ2 unido a un cebo inmovilizado del péptido silvestre de NR2B con polihistidina después de la incubación en presencia o ausencia de los siguientes análogos peptídicos inhibidores: Tat-NR2B (3),  $\text{E}_{\text{Me}}\text{TAV}$  (40), TAV (49), SDV (9), ESDV (8), IESDV (7) y luego recuperado con el ensayo de arrastre (*pull-down assay*).

Figura 4. Valores de  $K_i$  de los tetrapéptidos *N*-metilados y sus correspondientes tetrapéptidos sin metilar por PDZ1 y PDZ2, en donde se han combinado las sustituciones individualmente favorables. Las barras de error indican el EEM basado en al menos cuatro mediciones independientes.

Figura 5. Péptidos acoplados en el modelo de homología de PDZ1. A) IESDV (7), B)  $\text{E}_{\text{Me}}\text{TAV}$  (40) y C) TAV (49).

Figura 6. Alquilación *N*-terminal de los análogos peptídicos de acuerdo al esquema 1<sup>a</sup>. Reactantes y condiciones: (a) cloruro de *o*-nitrobenzenosulfonilo, DIPEA. (b)  $\text{Ph}_3\text{P}$ , ROH, DIAD. (c) NaSPh, DMF. (d) TFA, TIPS,  $\text{H}_2\text{O}$  (90:5:5).

Figura 7. Estructura química de los compuestos diméricos 74 y 75. Para el compuesto 75, el grupo ciclohexiletilo se posiciona en el nitrógeno del Glu (E) en  $\text{P}^3$ .

Figura 8. Curvas de inhibición de los ligandos peptídicos diméricos 74 y 75 sobre los dominios PDZ1, PDZ2, PDZ3 y PDZ1-2 medidos mediante fluorescencia polarizada (FP).

Figura 9. Curvas de inhibición de los ligandos peptídicos diméricos 74, 76-81 sobre los dominios PDZ1, PDZ2 y PDZ1-2 medidos mediante FP.

Figura 10. Estructura de los compuestos 56 y 83.

Figura 11. Se muestra la estabilidad de los compuestos 74 y 76-78 en el plasma sanguíneo humano y se compara con la estabilidad del correspondiente ligando monomérico (7), el candidato clínico Tat-NR2B (3), y el ligando monomérico PEGilado 91.

Figura 12. Efecto sobre la excitotoxicidad mediada por el NMDA, en las neuronas corticales cultivadas, del compuesto 3, 56, 63, 73 y 74 a una concentración de 500 nM.

**Descripción detallada de la invención**

I. Definición de las abreviaturas y de la terminología:

«Uno» o «un», tal y como se utilizan en la presente memoria, puede significar uno o varios, según el contexto en el que se utilicen.

«Abu», ácido 2-aminobutanoico;

«Aib», ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico;

Un «enlace amida» se forma mediante una reacción entre un ácido carboxílico y una amina. Cuando la reacción es entre dos restos aminoácidos, el enlace formado como resultado de la reacción se conoce como una conexión peptídica (enlace peptídico);

Un «aminoácido» que se produce de forma natural se denomina en la presente memoria bien con su código de 1 letra o de 3 letras de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC, véase, por ejemplo, <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac>. Si no se especifica nada más, un aminoácido puede ser en forma D o L. En la descripción (pero no en la lista de secuencias), un código de 3 letras que comienza con una letra mayúscula indica un aminoácido en la forma L, mientras que un código de 3 letras en letras minúsculas indica un aminoácido en la forma D;

«cGMP», 3',5'-monofosfato de guanosina;

«que comprende» se debe entender de manera inclusiva. Por lo tanto, a modo de ejemplo, una composición que comprende el compuesto X puede comprender el compuesto X y opcionalmente otros compuestos;

- «SNC», sistema nervioso central;
- «CPP», péptido que penetra en la célula;
- «DAPI», 4',6-diamino-2-fenilindol;
- «DIPEA», diisopropiletilamina;
- 5 «DMF», *N,N*-dimetilformamida;
- «FP», fluorescencia polarizada;
- «GFP», proteína fluorescente verde;
- «HATU», hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio;
- «HBTU», hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio;
- 10 «ITC», calorimetría isotérmica de titulación;
- «célula de mamífero» pretende indicar cualquier célula procedente de mamífero. La célula puede ser una línea celular establecida, muchas de las cuales están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, EE. UU.), o una célula primaria con un vida útil limitada procedente de un tejido de mamífero que incluye tejidos procedentes de un animal transgénico, o una línea celular inmortal recién establecida procedente de un tejido
- 15 mamífero que incluye tejidos transgénicos, o una célula híbrida o una línea celular originada por la fusión de diferentes tipos de células procedentes de mamífero, p. ej., líneas celulares de hibridoma. Las células pueden expresar opcionalmente uno o varios productos génicos no nativos, p. ej., receptores;
- «OACM», oclusión de la arteria cerebral media;
- «nNOS», óxido nítrico sintasa neuronal;
- 20 «NO», óxido nítrico;
- «NMDA», *N*-metil-D-aspartato;
- «NMDAR», receptor de NMDA;
- Un «inhibidor de NMDAR/PSD-95» es un compuesto que comprende un péptido o análogo peptídico capaz de fijarse, o de interactuar, con dominios PDZ y, como consecuencia, de inhibir la interacción entre PSD-95 y NMDAR, en
- 25 donde el péptido o análogo peptídico puede estar modificado por *N*-alquilación (inhibidor de péptido modificado/inhibidor de análogo peptídico modificado) en la posición P<sup>3</sup>. Otra alternativa es que el inhibidor sea un compuesto que comprende dos péptidos o análogos peptídicos que están conectados covalentemente mediante un conector;
- 30 «P<sup>0</sup>» se define como el primer resto aminoacídico o análogo del mismo que corresponde al aminoácido del extremo carboxilo del péptido/análogo peptídico;
- «P<sup>-1</sup>» se define como el segundo resto aminoacídico o análogo del mismo contando desde el aminoácido del extremo carboxilo del péptido/análogo peptídico;
- «P<sup>-2</sup>» se define como el tercer resto aminoacídico o análogo del mismo contando desde el aminoácido del extremo carboxilo del péptido/análogo peptídico;
- 35 «P<sup>-3</sup>» se define como el cuarto resto aminoacídico o análogo del mismo contando desde el aminoácido del extremo carboxilo del péptido/análogo peptídico.
- «PDZ», proteína 95 de densidad postsináptica (PSD-95), supresor tumoral grande de discos homólogo de *Drosophila* (DlgA), proteína 1 de *zonula occludens* (ZO-1);
- 40 «PEG», polietilenglicol; el PEG es un polímero de etilenglicol, en donde por ejemplo 12 restos de PEG o PEG12 corresponde a un polímero de 12 restos ( $n = 12$ ) de etilenglicol.
- «PPI», interacciones proteína-proteína;
- «PSD-95», proteína 95 de densidad postsináptica;
- «rLUC», luciferasa citosólica de *Renilla*;
- «EEM», error estándar de la media;

«TIPS», triisopropilsilano al 5%;

«TMF», ácido trifluoroacético;

«WT», silvestre.

II. Estructura química y propiedades de un inhibidor peptídico modificado (inhibidor de NMDAR/PSD-95) de la invención de acuerdo con una primera realización

El undecapéptido 1 (**YEKLSSIESDV**) de NR2B se ha utilizado como plantilla para el desarrollo de moléculas inhibitoras no peptídicas más pequeñas con capacidad para desacoplar la PPI entre PSD-95 y el receptor de NMDA. Mediante una serie de modificaciones utilizadas para convertir los péptidos en estructuras no peptídicas simplificadas, se han identificado una serie de derivados peptídicos pequeños que muestran una mejoría de varias veces de la afinidad por los dominios PDZ de PSD-95, lo que proporciona inhibidores de tipo fármaco de la interacción entre PSD-95 y el receptor de NMDA.

En concreto, se siguió una estrategia peptidomimética, que comenzó con el truncamiento de 1 desde su extremo amino a un pentapéptido, IESDV (7), sin pérdida de afinidad por PDZ1 y PDZ2 de PSD-95, mientras que una delección adicional redujo la afinidad. La disminución en la afinidad se pudo compensar por la sustitución de Glu y Ser del tetrapéptido ESDV por *N*-Me-Glu y Thr, respectivamente, lo que da lugar a un tetrapéptido *N*-metilado, E<sub>Me</sub>TDV (36), con una afinidad mejorada por PDZ1 y esencialmente una afinidad silvestre por PDZ2. El resto de Asp se pudo reemplazar por Gln sin cargar o por Ala hidrófoba sin afectar a la afinidad significativamente, lo que convierte al E<sub>Me</sub>TAV (40) en un compuesto inicial prometedor. Es interesante que un tripéptido TAV (49) sea aún un inhibidor razonablemente potente de PDZ1 y PDZ2 con valores de *K*<sub>i</sub> de 42 y 37 μM, respectivamente, por lo tanto sólo aproximadamente 2 y 9 veces menos potente que el péptido de NR2B (1), mientras que sigue mostrando selectividad dentro de los dominios PDZ de PSD-95.

Guiados por la modelización molecular y el acoplamiento de péptidos y péptidos modificados en un modelo de homología de PDZ1, el objetivo era la modificación del grupo metilo del extremo amino de E<sub>Me</sub>TAV. La aplicación del protocolo de Fukuyama de la reacción de Mitsunobu permitió preparar 11 tetrapéptidos *N*-alquilados, los cuales tenían más afinidad por PDZ1 y PDZ2 que el péptido inicial E<sub>Me</sub>TAV. En particular, reemplazar el grupo metilo con ciclohexilmetilo (55) o bien con ciclohexiletilo (56) proporcionó inhibidores potentes de la interacción de PSD-95/NMDA, de los que el más potente fue (56) con valores de *K*<sub>i</sub> de 1 y 0,5 μM por PDZ1 y PDZ2, respectivamente (estructuras en la figura 10). Además, la introducción de los sustituyentes aromáticos proporcionó compuestos casi de la misma potencia, como se ejemplificó mediante los compuestos 62 y 63. Aunque también se incrementó la fijación a PDZ3 mediante las alquilaciones del extremo amino, se seguía observando una considerable selectividad por PDZ1 y 2.

La presente invención enseña que la *N*-alquilación de la posición P<sup>-3</sup> también se puede utilizar para incrementar la afinidad de un péptido o de un análogo peptídico por uno o más dominios PDZ diana, con lo que mejora su capacidad para impedir las PPI que se producen con dicha diana. Cuando la PPI es entre el inhibidor de NMDAR/PSD-95, el péptido o el análogo peptídico comprende preferiblemente al menos 4 restos unidos por amida y la secuencia YTXV o YSXV, en donde Y se selecciona de entre E, Q y A, o un análogo de los mismos, y X se selecciona de entre A, Q, D, N, *N*-Me-A, *N*-Me-Q, *N*-Me-D y *N*-Me-N o un análogo de los mismos. Los análogos adecuados del resto Y o X, o los análogos de cualquiera de los 4 restos unidos por amida (YTXV o YSXV) incluyen: retroamidas y/o tioamidas («Chemistry & Biochemistry of amino acids, peptides and proteins», vol. 7, 1983, Boris Weinstein, capítulo 5 por Arno F. Spatola); la unidad aza-@ (resto 5-dihidro-2(3*H*)-pirazona), en particular en la posición P<sup>-1</sup> o P<sup>-3</sup> que corresponde al resto X o Y (Hammond et al., *Chemistry and Biology*, 2006, pág. 1247); en donde la elección del análogo podría estar asistida por el uso de las herramientas y ensayos para una estrategia peptidomimética, tal y como se describe en la presente memoria.

III. Optimización de inhibidores peptídicos modificados (inhibidor de NMDAR/PSD-95) de acuerdo con una primera y segunda realización respecto a permeabilidad en la membrana, selectividad y propiedades farmacocinéticas.

La probabilidad de que los inhibidores peptídicos modificados atraviesen las membranas celulares se incrementaría con la disminución de su polaridad y carga. Resulta sorprendente que las modificaciones de la secuencia peptídica de YTXV *N*-alquilada (Y = Glu, Ala o Gln y X = Asp y Ala) para disminuir la polaridad y/o la carga no empeoran significativamente su afinidad por PDZ1 y PDZ2 de PSD-95. Los tetrapéptidos estaban *N*-alquilados con ciclohexiletilo y se compararon con sus versiones sin alquilar con respecto a la afinidad y a la selectividad por los dominios PDZ de PSD-95. Los aminoácidos sin carga e incluso pequeños e hidrófobos se pudieron posicionar en estas regiones variables, de forma individual o en combinación, sin una pérdida significativa en la afinidad (compuestos 70-73). También se observó que el efecto de la *N*-alquilación era tan significativo como se había observado antes, lo que subraya la reproducibilidad y el carácter general de la *N*-alquilación como una modificación que incrementa la afinidad de los inhibidores peptídicos por PDZ1 y PDZ2 de PSD-95. Así pues, la presente invención da a conocer ligandos peptídicos *N*-alquilados cuyo tamaño se pudo reducir a un tetrapéptido y cuya afinidad por PDZ1 y PDZ2 es mucho mayor que por la secuencia peptídica silvestre o Tat-NR2B (3). Los ligandos peptídicos *N*-alquilados de la invención, cuando se comparan con los ligandos peptídicos conocidos, también

reducen el riesgo de inmunogenia y resulta más económico producirlos debido a su menor tamaño. Además, la alquilación del extremo amino de un ligando peptídico de la invención (p. ej., en P<sup>3</sup>), a diferencia de otras técnicas de modificación de péptidos (tales como la acetilación, glucosilación o fosforilación «que se produce en la naturaleza») sirve para potenciar su hidrofobia y, con ello, incrementar su permeabilidad en la membrana. De esta forma, los compuestos son capaces de inhibir la interacción de PSD-95 con el receptor de NMDA dentro de la célula, lo que reduce así la excitotoxicidad mediada por NMDA en las neuronas corticales de rata en cultivo.

De acuerdo con la realización, la invención da a conocer inhibidores peptídicos modificados que comprenden dos inhibidores peptídicos (o análogos peptídicos) conectados para formar un ligando dimérico (como se ejemplificó mediante 74 y 75). Los dos péptidos o análogos peptídicos pueden tener la misma estructura y composición o pueden tener una estructura y composición diferentes. En otra realización, el péptido o análogos peptídicos del ligando dimérico pueden estar adicionalmente *N*-alquilados en P<sup>3</sup> en las mismas formas químicas que se describen para un péptido del análogo peptídico de la primera realización. Mediante la fijación simultánea a PDZ1 y PDZ2 de PDZ1-2, la afinidad del ligando dimérico por la construcción en tándem de PDZ1-2 de PSD-95 aumenta considerablemente, mientras que permanece constante por cada uno de los dominios PDZ por separado, PDZ1, 2 y 3. Los inhibidores peptídicos se mantienen juntos por medio de un conector. Los conectores adecuados incluyen un conector compuesto por diácido de polietilenglicol (PEG); poliamina (Hervé F. et al., 2008, *AAPS J*, publ. electrónica, 26 de agosto); ácido peptidonucleico (PNA, por su nombre en inglés) (Egholm et al., 2005 *Nature* 365: 566-568); ácido nucleico cerrado (LNA, por su nombre en inglés) (Singh et al., 1998, *Chem. Comm*, pág. 455). Cuando el conector es un conector de PEG, también puede comprender un grupo funcional activo, tal como un grupo funcional electrófilo o nucleófilo (solicitud de patente internacional WO/2007/140282), que se puede utilizar para unir el conector de PEG a cada inhibidor peptídico (o análogo peptídico). Los grupos funcionales adecuados para la adhesión incluyen grupos electrófilos aminorreactivos, seleccionados entre éster de *N*-hidroxisuccinimida (NHS), éster de *p*-nitrofenilo, carbonato de succinimidilo, carbonato de *p*-nitrofenilo, succinimidiluretano, isocianato, isotiocianato, azida de acilo, cloruro de sulfonilo, aldehído, carbonato, imidoéster o anhídrido; y grupos tiorreactivos seleccionados entre maleimida, haloacetilo, derivados de haluro de alquilo, aziridina, derivados de acrililo, agentes de arilación o reactivos de intercambio de tiodisulfuro. Los grupos funcionales nucleófilos adecuados incluyen amina, hidrazida, carbazato, acilhidrazida, semicarbamato o hidrazina, que pueden someterse a reacciones con grupos aldehído o carboxilo sobre el péptido o análogo peptídico inhibidor.

La longitud óptima del conector en el ligando dimérico dependerá del conector seleccionado. Cuando el conector es PEG, el número (n) de restos de etilenglicol del PEG puede estar comprendido entre n = 1-28 o n = 4-28 o el conector puede tener una longitud de n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. De acuerdo con la presente invención, los diácidos de PEG se utilizan para conectar ligandos (péptidos o análogos peptídicos), en donde el, p. ej., conector de PEG12 está modificado para que dos grupos de ácido carboxílico estén presentes a cada extremo del conector. Así pues, un conector de PEG12 antes del procedimiento de dimerización se denomina ácido 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-tridecaoxatritetracontán-1,43-dioico. Durante la dimerización de los dos ligandos peptídicos con el conector, los dos grupos de ácido carboxílico reaccionan con los grupos amino del extremo amino de los ligandos para crear enlaces de amida. Los conectores de PEG0,1,2,4,6,8 están en consonancia con esta descripción.

Un conector de PEG que tiene 12 restos (n = 12) tendrá, cuando se extienda, una longitud de aproximadamente 50 Å, que fácilmente permitirá a los ligandos de cada extremo del conector estar en una proximidad suficientemente cercana con el dominio PDZ en tándem y de esta forma actuar juntos como un potente inhibidor. Se ha modelado la distancia entre PDZ1 y PDZ2 en PSD-95 y se ha estimado que está en torno a 20 Å (medido a partir de las dos histidinas conservadas en αB) (Long et al., *JMB*, 2003, p. 203-214). Por consiguiente, el conector de PEG en el ligando dimérico comprende preferiblemente de 1 a 12 restos (n = 1-12), más preferiblemente de 2 a 12 (n = 2-4) e incluso más preferiblemente de 4 a 6 restos (n = 4-6). Los ligandos diméricos de la invención poseen varias ventajas: su afinidad por la construcción de PDZ1-2 en tándem se incrementa significativamente hasta 1000 veces en comparación con el silvestre o Tat-NR2B (3). La afinidad de estos ligandos por la proteína con PDZ1-2 en tándem, que comparte la mayor similitud estructural con la diana de la proteína PSD-95 nativa para estos inhibidores peptídicos modificados, es de extrema importancia con respecto a su eficacia durante el uso terapéutico. De igual forma, el tándem PDZ1-2 corresponde a una diana proteica mucho más distintiva que cada uno de los dominios PDZ por separado, que son más bien habituales en la naturaleza. Por lo tanto, al proporcionar inhibidores peptídicos del ligando dimerizado que actúan específicamente sobre PDZ1-2, se obtiene una mejora de la selectividad en comparación con los ligandos monoméricos, lo que es posiblemente importante para el uso terapéutico de estos inhibidores. Además, la modificación con PEG de los péptidos ofrece varias ventajas farmacocinéticas, tales como la disminución de la inmunogenia, retraso de su eliminación de la sangre, y menor sensibilidad a las proteasas. Además, el PEG no es tóxico, es muy soluble y se sabe que facilita la captación celular, y también se ha demostrado que los ligandos diméricos inhiben la interacción de PSD-95 con el receptor de NMDA dentro de la célula, lo que reduce la excitotoxicidad mediada por el NMDA en las neuronas corticales de rata en cultivo. Así pues, además de funcionar como un conector, el PEG potencia las propiedades terapéuticas de estos inhibidores peptídicos modificados.

La permeabilidad en la membrana y la permeabilidad en la barrera hematoencefálica que presentan el péptido o los análogos peptídicos de la presente invención se pueden además potenciar mediante la cationización con una poliamina o diamina natural o sintética (p. ej., hexametildiamina; putrescina; espermidina; espermina), que pueden

estar unidas covalentemente al péptido o análogo peptídico (Hervé F. et al., 2008, *AAPS J*, pág. 455-472). Preferiblemente, el péptido o los análogos peptídicos incluyen la cationización en su extremo amino.

La unión de diácido de PEG12 (ácido 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-tridecaoxatetracontán-1,43-dioico), diácido de PEG8 (ácido 4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaohentriacontán-1,31-dioico), diácido de PEG6 (ácido 4,7,10,13,16,19,22-heptaoxapentacosán-1,25-dioico) y diácido de PEG4 (ácido 4,7,10,13,16-pentaoxonadecán-1,19-dioico) a dos moléculas pentapeptídicas con la secuencia IESDV da lugar a los ligandos diméricos 74, 76, 77 y 78, respectivamente, que muestran una o varias de las propiedades de fijación de alta afinidad por la diana de la proteína con PDZ12, resistencia completa a las enzimas proteolíticas en el plasma sanguíneo, permeabilidad en la membrana y actividad excitotóxica en un ensayo celular *ex vivo*. La afinidad se incrementa todavía más mediante la dimerización del pentapéptido que tiene la secuencia IETAV, para obtener el compuesto 83, mientras que la estabilidad plasmática sigue siendo pronunciada, en particular en comparación con el ligando peptídico monomérico.

IV. Herramientas para monitorizar y evaluar las propiedades inhibitoras del inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención.

A. Ensayo de fluorescencia polarizada (FP): tal y como se describe a continuación en el ejemplo 1 y en el apartado Metodología, proporciona un modo cómodo y fiable para monitorizar y evaluar las propiedades inhibitoras de un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención. El ensayo de FP permite analizar y comparar un amplio abanico de análogos peptídicos con respecto a su interacción con los dominios PDZ y a su especificidad por los tres dominios PDZ, PDZ1-3, de la PSD-95. Los dominios PDZ pueden expresarse de manera individual o como construcciones con el dominio en tándem, mediante la tecnología de ADN recombinante estándar conocida por los expertos en la técnica. La purificación de los dominios PDZ expresados puede verse facilitada por la inclusión de un etiqueta de afinidad (p. ej., etiqueta de polihistidina, etiqueta de glutatión-S-transferasa o etiqueta de anticuerpo, tal como la etiqueta FLAG) en la proteína expresada que comprende el dominio PDZ (p. ej., proteína de fusión) y el uso de una resina de afinidad para purificar selectivamente proteínas etiquetadas con dominio PDZ.

Más específicamente, el ensayo se basa en un ensayo de fijación competitiva heterólogo, en donde la afinidad medida como  $CI_{50}$  de un análogo peptídico dado (no fluorescente) por un dominio PDZ se mide en presencia de una concentración fija de un péptido undecapeptídico marcado con fluorescencia que corresponde al extremo carboxilo silvestre (WT) de la subunidad NR2B (YEKLSIESDV) y de CRIPT (LDTKNYKQTSV). Los valores de  $CI_{50}$  determinados se pueden convertir en valores de  $K_i^5$ . Los fluoróforos adecuados incluyen bien 5-FAM o Cy5, que pueden estar conjugados a un conector tripeptídico (KSG o CSG) conectado al extremo amino del undecapéptido para dar 5-FAM-NR2B, Cy5-NR2B, 5-FAM-CRIPT y Cy5-CRIPT. El fluoróforo 5-FAM se puede unir a los undecapéptidos por conjugación con HATU. El fluoróforo Cy5 se puede conjugar a los undecapéptidos por conjugación de la Cy5-maleimida a la cadena lateral de cisteína de la secuencia tripeptídica CSG unida al extremo amino del péptido, según se detalla en el apartado Metodología.

B. Ensayo de arrastre (*pull-down*): El arrastre con polihistidina es una técnica *in vitro* que consiste en la utilización de un dominio cebo del extremo carboxilo de la proteína CRIPT o NRB2 etiquetado con polihistidina (p. ej., péptido silvestre de NR2B con la secuencia HHHHHHYEKLSIESDV) para identificar los competidores de una pareja molecular que se une al dominio PDZ (dominio PDZ de PSD-95) (la presa). La proteína de cebo se inmoviliza en un gel de afinidad quelado con cobalto. El cebo sirve de soporte de afinidad secundario para la pareja proteica del cebo y para identificar competidores que pueden desplazar la presa del cebo. Los competidores son análogos peptídicos, específicamente un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la presente invención. Las PPI entre la presa y el cebo se analizan por disociación/elución química de la presa unida (dominio PDZ o análogo peptídico) y visualización de la presa por SDS-PAGE y procedimientos de detección asociados según los requisitos de sensibilidad de las proteínas que interaccionan. Estos procedimientos incluyen tinción con colorante de Coomassie®, plata y cinc; inmunotransferencia; y detección radioisotópica de [ $^{35}$ S]. Otra alternativa es que la presa desplazada detectada sobre el gel se pueda aislar de un gel de poliácridamida y posteriormente se la pueda analizar. Los protocolos adecuados del ensayo de arrastre se conocen bien en la técnica (Sambrook J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York, 3.<sup>a</sup> edición), mientras que el kit ProFound™ de interacción proteína:proteína de arrastre con polyHis de Pierce Biotechnology, 3747 N. Meridian Road, P. O. Box 117 Rockford, IL 61105, contiene un conjunto de reactivos completo y validado desarrollado específicamente para realizar los ensayos de arrastre.

C. Calorimetría isotérmica de titulación (ITC, por su nombre en inglés): Esta técnica (Pierce, M. et al., 1999, *Methods*, p. 213-221) proporciona una determinación exacta de la afinidad de un ligando por su proteína diana, así como la medición de las propiedades termodinámicas de la interacción, entre ellas entalpía ( $\Delta H$ ), entropía ( $\Delta S$ ) y energía libre ( $\Delta G$ ), junto con la relación estequiométrica de la fijación del ligando. En este procedimiento, el ligando sin marcar se titula en una solución de proteína PDZ sin marcar colocada en un calorímetro. Se consigue así medir el calor generado tras el reconocimiento de la proteína ( $\Delta H$ ) durante la titulación del ligando y la proteína PDZ hasta la saturación, y es insignificante el intercambio de calor tras la posterior adición del ligando. A partir de la cantidad de ligando necesario para conseguir la saturación se calcula una constante de afinidad ( $K_a$ ) y, además, se determinan  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$  y la estequiometría.

D. Ensayo de estabilidad en el plasma sanguíneo. En este ensayo, la semivida ( $T_{1/2}$ ) de un compuesto en el plasma sanguíneo se mide *in vitro*, mediante lo cual se cuantifica su propensión a la degradación por proteasas, peptidasas y el contenido plasmático general.

5 E. Ensayo de toxicidad neuronal del NMDA. Cuando las neuronas corticales en cultivo se exponen a concentraciones elevadas de NMDA, se inicia una cascada excitotóxica que conduce al daño celular y finalmente a la muerte celular de la neurona. En consecuencia, se destruyen las membranas celulares y las enzimas citoplasmáticas se liberan al entorno de la célula. La extensión de esta muerte celular neuronal se puede cuantificar al medir la liberación al medio celular de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) citoplasmática. A los compuestos de interés y el compuesto de control (3) se les estudia su capacidad para atenuar la toxicidad mediada por NMDA.  
10 Los compuestos que están activos en este ensayo son capaces de atravesar las membranas y pueden impedir la excitotoxicidad *ex vivo*, que son propiedades importantes para los tratamientos dirigidos contra las enfermedades debidas a la excitotoxicidad.

F. Transferencia de energía de resonancia de la bioluminiscencia (BRET, por su nombre en inglés)<sup>2</sup>: Este ensayo se puede utilizar para valorar la permeabilidad celular de un inhibidor de NMDAR/PSD-95, lo que es importante para la biodisponibilidad que se le pide para el tratamiento terapéutico eficaz de un sujeto mamífero. Una línea celular de mamífero se puede transfectar con parejas de construcciones de ADN que codifican dos proteínas de fusión, que comprenden una proteína de fusión a GFP (p. ej., GFP-NR2B) y una proteína de fusión a rLUC (p. ej., rLUC-PDZ2). La interacción entre las dos proteínas de fusión, cuando se expresan en una célula transfectada, se puede monitorizar por medio del ensayo por BRET entre las dos proteínas de fusión al fijarse entre sí. La capacidad de un  
20 inhibidor de NMDAR/PSD-95, cuando se añade extracelularmente, para atravesar la membrana celular e inhibir la interacción entre las dos proteínas de fusión se puede monitorizar con el ensayo BRET, lo que proporciona una medición valiosa del potencial terapéutico del inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención.

V. Procedimientos para sintetizar el inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención y para verificar su composición y su estructura.

25 A. Síntesis de los análogos peptídicos: La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, por su nombre en inglés) con el uso de Fmoc proporciona un procedimiento adecuado para la síntesis de los análogos peptídicos, mediante lo cual se puede preparar un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención. Los péptidos con un resto aminoacídico natural en el extremo carboxilo, tal como Val o Ala, se puede sintetizar a partir de resinas de Wang precargadas. En el caso de péptidos que tienen un resto aminoacídico no natural en el extremo carboxilo, entonces se puede utilizar  
30 una resina de 2-clorotritilo, en donde el resto se puede cargar en la resina con diisopropiletilamina (DIPEA) (resina/aminoácido/DIPEA a 1:4:8) en DCM durante 30 min, entonces se remata con metanol, antes de la desprotección del Fmoc y de la conjugación del resto aminoacídico siguiente. Los aminoácidos *N*-metilados y el aminoácido que va después del aminoácido *N*-metilado se pueden conjugar al péptido en crecimiento con el uso de HATU. Más adelante se ofrece una descripción detallada de un protocolo adecuado de SPPS con Fmoc en el  
35 apartado Metodología.

B. Alquilación del extremo amino de los análogos peptídicos: La reacción de Mitsunobu con el protocolo de Fukuyama<sup>6</sup> proporciona un procedimiento adecuado para la preparación de los péptidos *N*-alquilados<sup>7</sup>. El grupo amino terminal del péptido se activa como una nitrobenzilsulfonamida y, posteriormente, se hace reaccionar con un abanico de alcoholes con la intervención del azadicarboxilato de diisopropilo (DIAD) y Ph<sub>3</sub>P para dar los productos unidos a la resina y protegidos (figura 6/esquema 1). Los productos *N*-alquilados finales, obtenidos por desprotección de la sulfonamida y la escisión de la resina, tienen la pureza y rendimiento requeridos.  
40

C. Síntesis de ligandos diméricos: Los diácidos de PEG están activados como ésteres de pentafluorofenilo (Pfp) y se hacen reaccionar con el grupo amino del extremo amino del ligando peptídico fijado a la resina mediante el uso de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como catalizador. De este modo se genera un ligando dimérico compuesto por dos  
45 ligandos peptídicos unidos por el conector de PEG a través de enlaces amida<sup>8</sup>. Otra alternativa es que los ligandos diméricos se pueden producir por activación de los diácidos de PEG *in situ* con reactivos de conjugación, tales como HBTU y HATU, seguido de la incubación con el grupo amino del extremo amino del ligando peptídico fijado a la resina. Con este procedimiento, el procedimiento de dimerización se limita a una reacción de una etapa y se puede realizar en un día en vez de en seis.

50 D. Análisis químico de los análogos peptídicos: El péptido se puede analizar mediante ESI-LC/MS y se puede caracterizar adicionalmente mediante espectros de protones (<sup>1</sup>H) por RMN y espectrometría de masas de alta resolución, con el empleo de técnicas bien conocidas por el experto en la técnica y ejemplificadas en el apartado Metodología.

55 VI. Inhibidores de NMDAR/PSD-95 de acuerdo con la primera y segunda realización de la invención para el tratamiento terapéutico de la lesión isquémica o traumática de los trastornos relacionados con la excitotoxicidad del sistema nervioso central.

En las sinapsis neuronales, los extremos carboxilo de las subunidades del receptor de NMDA interactúan con los dominios PDZ de PSD-95 y los conectan a las moléculas de señalización neurotóxicas posteriores (p. ej., nNOS), lo

que conduce a la producción de NO y la excitotoxicidad. La presente invención da a conocer inhibidores de NMDAR/PSD-95 capaces de inhibir la interacción entre los receptores de NMDA y nNOS en una célula, sin alterar las corrientes iónicas del NMDAR ni las funciones de señalización del calcio del NMDAR. Así pues, un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención actúa como un neuroprotector de una o varias células o tejidos, lo que proporciona

5 una estrategia específica para tratar los trastornos excitotóxicos, que incluyen lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática, lesión isquémica o traumática del sistema nervioso central (SNC), epilepsia y enfermedades neurodegenerativas del SNC.

El tratamiento terapéutico de los sujetos en riesgo o que actualmente padecen los trastornos o enfermedades anteriores se puede administrar bien como tratamiento preventivo para reducir el riesgo de que comience el trastorno o la enfermedad, o como tratamiento terapéutico después de que haya comenzado el trastorno o enfermedad. El sujeto puede ser un mamífero o paciente humano.

VII. Fabricación de una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de NMDAR/PSD-95 de acuerdo con la primera o segunda realización de la invención.

Las formulaciones de un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de acuerdo con la primera o segunda realización de la presente invención en las composiciones farmacéuticas se conocen bien en la técnica y se describen adicionalmente en Gennaro (ed.), 2000, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20.<sup>a</sup> ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000); y Ansel et al., 1999, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7.<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers.

Tal composición contiene típicamente de aproximadamente el 0,1 al 90% en peso (tal como aproximadamente del 1 al 20%, o aproximadamente del 1 al 10%) de un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptado.

Se pueden preparar varias formulaciones líquidas y en polvo mediante los procedimientos convencionales para la inhalación en los pulmones del mamífero a tratar.

Las composiciones adecuadas para la administración oral se pueden formular al combinar un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención con un vehículo adecuado, tal como un comprimido, píldora, grajea, cápsula, líquido, gel, sirope, suspensión viscosa, suspensión para la ingestión oral por el sujeto a tratar. Para las formulaciones orales/rectales sólidas, los excipientes adecuados incluyen sustancias de relleno tales como azúcares (p. ej., lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol); preparaciones de celulosa (p. ej., almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidina; agentes de granulación; y aglutinantes. Opcionalmente, se pueden incluir disgregantes, tales como polivinilpirrolidina entrecruzada, agar o ácido alginico, o una sal de alginato de sodio. La formulación sólida puede incluir además un revestimiento entérico.

Para las formulaciones orales líquidas, los excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites y alcoholes.

Las formulaciones inyectables de las composiciones pueden contener diferentes vehículos tales como aceites vegetales, dimetilacetamida, dimetilformamida, lactato de etilo, carbonato de etilo, miristato de isopropilo, etanol, polioles (glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares). Para las inyecciones intravenosas, las versiones hidrosolubles de los compuestos se pueden administrar mediante el procedimiento de infusión, mediante lo cual se infunde una formulación farmacéutica que contiene el agente activo (inhibidor de NMDAR/PSD-95) y un excipiente fisiológicamente aceptable. Los excipientes fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, dextrosa al 5%, disolución salina al 0,9%, solución de Ringer u otros excipientes adecuados. Las preparaciones intramusculares, p. ej., una formulación estéril de una forma salina soluble adecuada de los compuestos, se puede disolver y administrar en un excipiente farmacéutico, tal como agua para inyección, solución salina al 0,9% o solución de glucosa al 5%. Se puede preparar una forma insoluble adecuada del compuesto y administrarla como una suspensión en una base acuosa o en una base oleosa farmacéuticamente aceptable, tal como un éster de un ácido graso de cadena larga (p. ej., oleato de etilo).

Un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención también se puede formular como una preparación de liberación prolongada con el tiempo. Por ejemplo, el inhibidor se puede formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (p. ej., una emulsión de un aceite aceptable) o resina de intercambio iónico, o como un derivado bastante soluble, tal como una sal bastante soluble.

También se pueden utilizar liposomas y emulsiones para administrar el inhibidor de NMDAR/PSD-95. Adicionalmente, el inhibidor de NMDAR/PSD-95 se puede administrar a través de un sistema de liberación prolongada, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que comprenden el inhibidor.

El porcentaje óptimo del agente terapéutico en cada formulación farmacéutica varía de acuerdo con la propia formulación y con el efecto terapéutico deseado en las enfermedades específicas y en las pautas terapéuticas correlacionadas.

VIII. Modo de administración de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de acuerdo con la primera o segunda realización de la invención.

Se pueden utilizar procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica de la medicina, para administrar composiciones al sujeto o paciente, y se pueden proporcionar para utilizarlos en forma de un kit. Estas incluyen, pero sin limitarse a ellas, las vías subcutánea, intrapulmonar, transmucosal, intraperitoneal, intrauterina, sublingual, intratecal o intramuscular, mediante el uso de procedimientos/medios estándares para la administración [que incluye por inyección, catéter, en donde el kit puede incluir un dispositivo de inyección, un dispositivo para administrar una inyección de efecto prolongado, o un catéter]. Además, las formulaciones farmacéuticas se pueden administrar al paciente a través de vías de administración inyectables de liberación prolongada, tales como mediante el uso de materiales y procedimientos biodegradables o inyectables de liberación prolongada durante 1, 3 o 6 meses.

Independientemente de la vía de administración, un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la presente invención se administra típicamente a una dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 30 mg/kg de masa corporal del paciente (p. ej., de 1 mg/kg a 5 mg/kg). La formulación farmacéutica se puede administrar en varias dosis al día, si se desea, para alcanzar la dosis diaria total deseada.

Los procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica de la medicina, se pueden utilizar para administrar al paciente la formulación o formulaciones farmacéuticas de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar solas o en combinación con otros agentes terapéuticos o intervenciones. En concreto, las composiciones de la presente invención pueden además comprender una serie de agentes de la presente invención.

## 20 Ejemplos

### Metodología

Análisis químico: Los espectros de protones ( $^1\text{H}$ ) por RMN se grabaron en espectrómetros Bruker: RMN Avance 300 (300 MHz). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se describen en partes por millón (ppm) con referencia al tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los experimentos de RMN se realizaron en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Las siguientes abreviaturas se utilizan para múltiples espectros de protones: s, singulete; d, doblete; dd, doble doblete, triplete; q, cuarteto; m, multiplete. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se describen en hercios (Hz). Los espectros de masas se obtuvieron con un instrumento que es un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6410 mediante pulverización de electrones (ESI-MS) acoplada a un sistema de HPLC Agilent 1200 con un automuestreador y un detector de diodos ordenados con un gradiente lineal del sistema de solvente binario de agua/acetronitrilo/TFA (A: 95/5/0,1 y B: 5/95/0,086) con una velocidad de flujo de 1 ml/min. Durante el análisis de ESI-MS se obtuvieron trazas de dispersión evaporativa de luz (ELS, por su nombre en inglés) con un detector de dispersión de luz Sedere Sedex 85, que se utilizaron para la estimación de la pureza de los productos finales. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS, por su nombre en inglés) se obtuvieron con un instrumento Q-ToF<sup>TM</sup> 2 y todos estaban dentro de  $\pm 5$  ppm de los valores teóricos. Se realizó la HPLC preparativa en un sistema Agilent 1100 con una columna de fase inversa C18 (Zorbax 300 SB-C18, 21,2  $\times$  250 mm) con un gradiente lineal del sistema de solvente binario de agua/acetronitrilo/TFA (A: 95/5/0,1 y B: 5/95/0,086) con una velocidad de flujo de 20 ml/min y detección UV a 230 nm.

Expresión y purificación de PDZ1, PDZ2, PDZ3 y PDZ1-2 de PSD-95: El ADNc que codifica PDZ1 (restos 61-151), PDZ2 (restos 155-249), PDZ3 (restos 309-401) y el tándem PDZ1-2 (restos 61-249) de PSD-95 se amplificó por PCR inversa y se clonó en un vector modificado pRSET etiquetado con His (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) (los números entre paréntesis se refieren a los números de restos en la PSD95 $\alpha$  completa de humano sin el exón 4b). Todas las construcciones de PDZ contenían una secuencia extra, **MHHHHHPRGS**, que se utilizó de etiqueta para la purificación (etiqueta de His), y las secuencias codificantes de ADN y las proteínas codificadas se designan como sigue:

ADN de HIS-PDZ1 [SEQ ID n.º 1] que codifica la proteína HIS-PDZ1 [SEQ ID n.º 2]

ADN de HIS-PDZ2 [SEQ ID n.º 3] que codifica la proteína HIS-PDZ2 [SEQ ID n.º 4]

ADN de HIS-PDZ3 [SEQ ID n.º 5] que codifica la proteína HIS-PDZ3 [SEQ ID n.º 6]

ADN de HIS-PDZ1-2 [SEQ ID n.º 7] que codifica la proteína HIS-PDZ1-2 [SEQ ID n.º 8]

Las bacterias competentes de *E. coli* (BL2-DE3, pLysS) se transformaron con construcciones que expresaban PDZ y se hicieron crecer durante una noche en placas de agar que contenían ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y cloranfenicol (35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a 37 °C. Se picaron las colonias y se utilizaron para inocular cultivos bacterianos (medio LB con ampicilina a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Estas se agitaron mientras se incubaban a 37 °C hasta que la  $A_{600}$  alcanzó 0,95 para PDZ1, PDZ2 y PDZ3, o 0,45 para PDZ1-2, momento en el cual se añadió el isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido a 1 mM. Los cultivos inducidos se incubaron durante 4 horas a 37 °C (PDZ1, 2, 3) o durante una noche a 30 °C (PDZ1-2). Las células se recogieron por centrifugación a 10.000g durante 10 min a 4 °C y resuspendieron en tampón de lisis (Tris/HCl a 50 mM, pH 7,5, PMSF a 1 mM, ADNasa a 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  a 40 mM). Las células se destruyeron con un aparato que rompe las células a 26 kPsi. El lisado celular se sedimentó a 35.000g durante 1 hora y el

sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 µm y otro de 0,22 µm. Se realizó la purificación empezando con una columna cargada con níquel (II) (HisTrap™ HP, GE Healthcare, Reino Unido) equilibrada con tampón de Tris (tampón de Tris/HCl a 50 mM, pH 7,5) y después cromatografía de intercambio aniónico para PDZ1 y 3, y filtración en gel para PDZ2 y 1-2. Para la cromatografía de intercambio aniónico se utilizó una columna MonoQ HR 5/5 (GE Healthcare, Reino Unido) equilibrada con Tris/HCl a 50 mM, pH 8,5 y se realizó la elución con un gradiente de NaCl de 0 a 500 mM. Para la filtración en gel, la muestra de PDZ se cargó en una columna Superdex™ 75 HR 10/30 (GE Healthcare, Reino Unido) equilibrada con tampón de Tris (Tris/HCl a 20 mM, pH 7,5) con una velocidad de flujo constante de 0,5 ml/min. Se analizaron las fracciones relevantes en un gel de SDS-PAGE teñido mediante el protocolo estándar de tinción con plata. La purificación final se analizó mediante cromatografía líquida de ionización con pulverización-espectrometría de masas (ESI-LC/MS) para conseguir la masa molecular exacta y con ello verificar la identidad del dominio PDZ. Se hallaron los coeficientes de extinción molar mediante el análisis de los aminoácidos (Alphalyse, Odense, Dinamarca) y después se utilizaron para medir la concentración de las proteínas. Para los experimentos de arrastre se produjo la PDZ2 sin la etiqueta de His, para que actuara de «presa». Para esto se utilizó una construcción ligeramente diferente que permitió escindir enzimáticamente la etiqueta de His mediante la trombina bovina (1 unidad por 100 µg de proteína; incubación con rotación durante una noche a temperatura ambiente), seguido de la purificación mediante «purificación inversa» en la columna HisTrap™ HP en las mismas condiciones que se describieron anteriormente.

Síntesis peptídica: los péptidos se sintetizaron manualmente mediante la síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) con Fmoc en un MiniBlock™ (Mettler-Toledo, Columbus, OH, EE. UU.). Los péptidos con Val o Ala en el extremo carboxilo se sintetizaron a partir de resinas de Wang precargadas (Novabiochem, Darmstadt, Alemania). Para los péptidos con un aminoácido no natural en el extremo carboxilo, se utilizó una resina de 2-clorotritilo y el primer aminoácido se cargó en la resina con diisopropiletilamina (DIPEA) (resina/aminoácido/DIPEA a 1:4:8) en DCM durante 30 min, seguido del remate con metanol (DCM/MeOH/DIPEA 17:2:1). La desprotección del Fmoc se realizó con piperidina al 20% en DFM (2 × 10 min) y la conjugación del aminoácido siguiente se llevó a cabo con hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) y DIPEA (resina/aminoácido/HBTU/DIPEA 1:4:4:4) y se monitorizó mediante la prueba con ninhidrina. El péptido final se escindió de la resina mediante tratamiento con agua al 5% y triisopropilsilano (TIPS) al 5% en ácido trifluoroacético (TFA) durante 2 h. El péptido bruto se purificó por HPLC preparativa para dar una pureza de >98%. El péptido se analizó mediante ESI-LC/MS y se liofilizó. La cuantificación de los péptidos sintetizados se realizó pesando el producto peptídico. Los péptidos clave (NR2B WT [1], 5-FAM-NR2B y Tat-NR2B [3]) se analizaron mediante análisis de los aminoácidos (Alphalyse, Odense, Dinamarca) y de esta manera se determinaron los coeficientes de extinción molar. El 5-FAM (Anaspec, San José, CA, EE. UU.) se unió a los péptidos mediante la conjugación con hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU). De igual forma, los aminoácidos N-metilados y el aminoácido que sigue al aminoácido N-metilado se acoplaron al péptido creciente con el uso de HATU. La NR2B conjugada a Cy5 (Cy5-NR2B) se sintetizó mediante la conjugación de Cy5-maleimida (GE Healthcare, Reino Unido) a la cadena lateral de cisteína de la secuencia peptídica CSG-YEKLSSIESDV en solución seguido de la purificación por HPLC y el análisis por ESI-LC/MS. La reacción se realizó a una proporción de 1:1 entre el péptido y la Cy5-maleimida en tampón TBS a 1× durante 2 horas a temperatura ambiente. La cuantificación de los péptidos que llevan unido Cy5 se consiguió midiendo la absorbancia y el uso del coeficiente de extinción molar de Cy5. Se sintetizaron dos péptidos fluorescentes de fijación a PDZ3, basados en la secuencia de CRIPT (KSG/CSG-LDTKNYKQTSV)<sup>9</sup>, con 5-FAM y Cy5, respectivamente, como se describe más arriba para NR2B. Los péptidos acetilados en el extremo amino se sintetizaron mediante el tratamiento del péptido desprotegido con anhídrido acético en DIPEA y DMF (1:2:3) durante 1 hora seguido de la escisión con TFA, purificación y caracterización tal y como se describe más arriba.

Alquilación del extremo amino de los péptidos, procedimiento general: Se sintetizó el péptido (0,25 mmol, 1 equiv.) en una resina con 2-clorotritilo tal y como se describe más arriba seguido de la desprotección de Fmoc, lavado y secado de la resina. La resina se hinchó en DIPEA (6 equiv.) en THF (2,5 ml) y se le añadió cloruro de 2-nitrobencenosulfonilo (4 equiv.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml) lentamente mientras se agitaba la solución. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 h, se drenó la resina y se lavó con THF, MeOH, DCM y THF (lavados con flujo durante 2 min). Posteriormente, la resina se trató con trifetilfosfina (Ph<sub>3</sub>P a 2 M en THF, 5 equiv.) y el alcohol (ROH, 10 equiv.) en THF seco (1,0 ml) en atmósfera de nitrógeno. Se le introdujo DIAD (1 M en THF, 5 equiv.) lentamente y luego se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se drenó la resina y se lavó con THF y DCM (lavados con flujo). La sulfonamida alquilada unido a la resina se hinchó en 2 ml de DMF y se trató con una solución de NaSPh/DMF (1 M, 2 ml) durante 1 h. Esto se repitió cuatro veces para garantizar que la desprotección era completa, tras lo cual se lavó la resina y el péptido modificado se escindió de la resina, se purificó y se caracterizó tal y como se describió anteriormente.

N-Metil-ETAV (40). Rendimiento: 80%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), 98% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 4,47 (q, J = 7,2, 1H), 4,44 (d, J = 4,8, 1H), 4,30 (d, J = 5,6, 1H), 4,18-4,14 (m, 1H), 3,97 (dd, J = 7,2, 5,6 Hz, 1H), 2,68 (s, 3H), 2,53 (t, J = 7,4, 2H), 2,19-2,14 (m, 3H), 1,39 (d, J = 7,2, 3H), 1,23 (d, J = 6,4, 3H), 0,97 (d, J = 6,6, 6H). HRMS (ES+) calculada para C<sub>18</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M + H]<sup>+</sup>, 433,2298; encontrado, m/z 433,2315.

N-Etil-ETAV (52). Rendimiento: 71%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), > 99% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 4,47 (q, J = 6,8, 1H), 4,44 (d, J = 5,2, 1H), 4,30 (d, J = 6,0, 1H), 4,17-4,13 (m, 1H), 4,03 (dd, J = 7,6, 5,2 Hz, 1H), 3,06-3,03 (m,

2H), 2,53 (t,  $J = 7,4$ , 2H), 2,19-2,13 (m, 3H), 1,38 (d,  $J = 7,2$ , 3H), 1,32 (t,  $J = 7,4$ , 3H), 1,22 (d,  $J = 6,4$ , 3H), 0,97 (d,  $J = 6,8$ , 6H), HRMS (ESI+) calculada para  $C_{19}H_{35}N_4O_8$  [M + Na]<sup>+</sup>, 469,2274; encontrado,  $m/z$  469,2280.

5 *N*-Propil-ETAV (53). Rendimiento: 95%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), > 99% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 4,47 (q,  $J = 6,8$ , 1H), 4,44 (d,  $J = 5,2$ , 1H), 4,30 (d,  $J = 5,2$ , 1H), 4,17-4,14 (m, 1H), 4,02 (dd,  $J = 7,6$ , 5,2 Hz, 1H), 2,98-2,88 (m, 2H), 2,54 (t,  $J = 7,4$ , 2H), 2,21-2,12 (m, 3H), 1,76-1,70 (m, 2H), 1,38 (d,  $J = 7,2$ , 3H), 1,22 (d,  $J = 6,4$ , 3H), 1,0 (t,  $J = 7,4$ , 3H), 0,97 (d,  $J = 6,8$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{20}H_{37}N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 461,2611; encontrado,  $m/z$  461,2624.

10 *N*-Butil-ETAV (54). Rendimiento: 94%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), > 99% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 4,47 (q,  $J = 7,2$ , 1H), 4,44 (d,  $J = 5,2$ , 1H), 4,30 (d,  $J = 5,6$ , 1H), 4,17-4,14 (m, 1H), 4,02 (dd,  $J = 7,2$ , 5,2 Hz, 1H), 3,00-2,93 (m, 2H), 2,54 (t,  $J = 7,4$ , 2H), 2,21-2,12 (m, 3H), 1,70-1,65 (m, 2H), 1,45-1,40 (m, 2H), 1,38 (d,  $J = 7,2$ , 3H), 1,22 (d,  $J = 6,4$ , 3H), 1,0 (t,  $J = 7,4$ , 3H), 0,97 (d,  $J = 6,8$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{21}H_{39}N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 475,2768; encontrado,  $m/z$  475,2770.

15 *N*-Ciclohexilmetil-ETAV (55). Rendimiento: 8%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), > 99% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 4,45 (q,  $J = 7,2$ , 1H), 4,41 (d,  $J = 4,8$ , 1H), 4,28 (d,  $J = 5,4$ , 1H), 4,17-4,12 (m, 1H), 3,94 (dd,  $J = 7,2$ , 5,6 Hz, 1H), 2,82 (d,  $J = 6,6$ , 1H), 2,76 (d,  $J = 7,2$ , 1H), 2,56 (t,  $J = 7,4$ , 2H), 2,18-2,12 (m, 3H), 1,86-1,68 (m, 6H), 1,38 (d,  $J = 7,2$ , 3H), 1,32-1,25 y 1,08-1,01 (m, 5H), 1,22 (d,  $J = 6,0$ , 3H), 0,96 (d,  $J = 6,6$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{24}H_{43}N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 515,3081; encontrado,  $m/z$  515,3091.

20 *N*-Ciclohexil-ETAV (56). Rendimiento: 56%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), > 99% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 4,45 (q,  $J = 7,2$ , 1H), 4,42 (d,  $J = 4,8$ , 1H), 4,29 (d,  $J = 5,4$ , 1H), 4,16-4,12 (m, 1H), 3,99 (dd,  $J = 7,2$ , 5,4 Hz, 1H), 3,03-2,91 (m, 2H), 2,53 (t,  $J = 7,4$ , 2H), 2,22-2,06 (m, 3H), 1,76-1,66 y 1,32-1,25 (m, 10H), 1,58 (q,  $J = 7,2$ , 1H), 1,38 (d,  $J = 7,2$ , 3H), 1,22 (d,  $J = 6,3$ , 3H), 0,97 (d,  $J = 6,9$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{25}H_{45}N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 529,3237; encontrado,  $m/z$  529,3214.

25 *N*-Bencil-ETAV (58). Rendimiento: 66%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), 97% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 7,49-7,41 (m, 5H), 4,48 (q,  $J = 7,2$ , 1H), 4,44 (d,  $J = 4,8$ , 1H), 4,28 (d,  $J = 5,4$ , 1H), 4,16 (s, 2H), 4,12-4,01 (m, 2H), 2,54 (t,  $J = 6,9$ , 2H), 2,22-2,11 (m, 3H), 1,38 (d,  $J = 7,2$ , 3H), 1,24 (d,  $J = 6,3$ , 3H), 0,97 (d,  $J = 6,6$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{24}H_{37}N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 509,2611; encontrado,  $m/z$  509,2595.

30 *N*-Fenil-ETAV (59). Rendimiento: 11%. ESI-LC/MS: 98% (ELSD), 98% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 7,35-7,23 (m, 5H), 4,45 (q,  $J = 6,9$ , 1H), 4,42 (d,  $J = 4,8$ , 1H), 4,28 (d,  $J = 5,4$ , 1H), 4,13-4,09 (m, 1H), 4,05 (dd,  $J = 7,2$ , 5,1 Hz, 1H), 3,23-3,15 (m, 2H), 3,00 (t,  $J = 7,8$ , 2H), 2,54 (t,  $J = 7,2$ , 2H), 2,22-2,12 (m, 3H), 1,38 (d,  $J = 7,2$ , 3H), 1,20 (d,  $J = 6,3$ , 3H), 0,96 (d,  $J = 6,9$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{25}H_{39}N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 523,2768; encontrado,  $m/z$  523,2787.

35 *N*-Fenilpropil-ETAV (60). Rendimiento: 30%. ESI-LC/MS: 98% (ELSD), 97% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 7,48 (d,  $J = 8,1$ , 1H), 7,46 (d,  $J = 1,2$ , 1H), 7,20 (dd,  $J = 8,4$ , 2,1, 1H), 4,45 (q,  $J = 6,9$ , 1H), 4,41 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 4,28 (d,  $J = 5,4$ , 1H), 4,15-4,09 (m, 1H), 4,05 (dd,  $J = 7,2$ , 5,4 Hz, 1H), 3,27-3,13 (m, 2H), 2,99 (t,  $J = 7,8$ , 2H), 2,54 (t,  $J = 7,2$ , 2H), 2,22-2,09 (m, 3H), 1,38 (d,  $J = 7,5$ , 3H), 1,21 (d,  $J = 6,6$ , 3H), 0,96 (d,  $J = 6,6$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{26}H_{41}N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 537,2924; encontrado,  $m/z$  537,2928.

40 *N*-(3,4-Diclorofenil)propil-ETAV (61). Rendimiento: 20%. ESI-LC/MS: 98% (ELSD), 97% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 7,26-7,17 (m, 2H), 7,09-7,04 (m, 1H), 4,45 (q,  $J = 6,9$ , 1H), 4,41 (d,  $J = 5,1$ , 1H), 4,28 (d,  $J = 5,4$ , 1H), 4,15-4,09 (m, 1H), 4,05 (dd,  $J = 7,2$ , 5,4 Hz, 1H), 3,27-3,13 (m, 2H), 2,99 (t,  $J = 7,8$ , 2H), 2,54 (t,  $J = 7,2$ , 2H), 2,22-2,09 (m, 3H), 1,38 (d,  $J = 7,5$ , 3H), 1,21 (d,  $J = 6,6$ , 3H), 0,96 (d,  $J = 6,6$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{25}H_{37}Cl_2N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 591,1988; encontrado,  $m/z$  591,1967.

45 *N*-(3,4-Difluorofenil)propil-ETAV (62). Rendimiento: 12%. ESI-LC/MS: 98% (ELSD), 98% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 7,85-7,79 (m, 3H), 7,74-7,72 (m, 1H), 7,47-7,44 (m, 3H), 7,37 (dd,  $J = 8,7$ , 1,8, 1H), 4,45 (q,  $J = 6,9$ , 1H), 4,42 (d,  $J = 4,8$ , 1H), 4,28 (d,  $J = 5,4$ , 1H), 4,13-4,06 (m, 2H), 3,34-3,14 (m, 4H), 2,545 (t,  $J = 7,5$ , 2H), 2,21-2,15 (m, 3H), 1,38 (d,  $J = 7,2$ , 3H), 1,19 (d,  $J = 6,3$ , 3H), 0,96 (d,  $J = 6,9$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{25}H_{37}F_2N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 559,2579; encontrado,  $m/z$  559,2591.

50 *N*-(Naftalén-2-il)etil-ETAV (63). Rendimiento: 49%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), > 99% (UV). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 7,29-7,15 (m, 5H), 4,45 (q,  $J = 6,9$ , 1H), 4,40 (d,  $J = 4,8$ , 1H), 4,28 (d,  $J = 5,4$ , 1H), 4,14-4,10 (m, 1H), 3,99 (dd,  $J = 7,2$ , 5,1 Hz, 1H), 2,96-2,91 (m, 2H), 2,70 (t,  $J = 7,2$ , 2H), 2,52 (t,  $J = 7,2$ , 2H), 2,19-2,08 (m, 3H), 2,06-1,98 (m, 2H), 1,38 (d,  $J = 7,2$ , 3H), 1,17 (d,  $J = 6,6$ , 3H), 0,96 (d,  $J = 6,9$ , 6H). HRMS (ESI+) calculado para  $C_{29}H_{41}N_4O_8$  [M + H]<sup>+</sup>, 573,2898; encontrado,  $m/z$  573,2897.

Síntesis de ligandos diméricos. Procedimiento general 1 («Procedimiento con Pfp»):

55 El HOOC-PEG(12)-COOH (diácido de PEG12, Iris Biotechnology, Alemania) (0,691 g, 1 mmol) se disolvió en acetato de etilo (100 ml) a 0 °C mediante agitación vigorosa durante 25 min. Se le añadió pentafluorofenol (Pfp) (0,368 g, 2 mmol) y *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,413 g, 2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 0 °C. Se filtró la mezcla y el filtrado se evaporó al vacío. El diéster de Pfp<sub>2</sub>-PEG resultante se utilizó sin más purificación.

Los péptidos se sintetizaron tal y como se describió previamente. Se le añadieron el diéster de Pfp<sub>2</sub>-PEG (0,125 mmol) y HOBt (0,625 mmol) al péptido fijado a la resina (0,25 mmol) en 5 porciones, cada una disuelta en DMF seca (4 ml) durante cinco días. Se drenó la resina y se lavó con DMF antes de unirle la siguiente porción. El péptido dimérico se escindió de la resina con TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (90/5/5) a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la retirada de los solventes al vacío, el péptido dimérico se purificó por HPLC preparativa y se caracterizó mediante LC/MS.

Síntesis de ligandos diméricos. Procedimiento general 2 («Procedimiento con HBTU»):

El diácido de PEG (0,1 eq.) se activa previamente con HBTU (0,2 eq.) y DIPEA (0,4 eq.) y se añade a la resina-péptido (1 eq., 0,25 mmol) en DMF (2 ml), y se incubó durante 45 min. Esta etapa se repite cinco veces y la resina se lava cada vez con DMF. El péptido dimérico se escinde de la resina por tratamiento con TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (90/5/5) a temperatura ambiente durante 2 h. Tras la retirada de los solventes al vacío, el péptido dimérico se purifica por HPLC preparativa y se caracteriza por LC/MS.

(IESDV)<sub>2</sub>PEG12 (74). El pentapéptido IESDV se sintetizó tal y como se describe más arriba y se generó 74 mediante el uso del protocolo general para dimerizaciones (que usa el «procedimiento con Pfp»). Rendimiento: 40%, ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), 98% (UV). MS (ESI+) calculada para C<sub>76</sub>H<sub>133</sub>N<sub>10</sub>O<sub>37</sub> [M + H]<sup>+</sup>, 1778,9; encontrado, *m/z* 1779.

(GE[N-Ciclohexiletil]TDV)<sub>2</sub>PEG12 (75). Se sintetizó el tetrapéptido ETDV y se *N*-alquiló con ciclohexiletilo tal y como se describe en el procedimiento general de la alquilación del extremo amino de los péptidos. A continuación se añadió Gly a la secuencia y se llevó a cabo la dimerización mediante el protocolo general (con el uso del «procedimiento con Pfp»). Rendimiento: 18%. ESI-LC/MS: 99% (ELSD), 94% (UV). MS (ESI+) calculada para C<sub>86</sub>H<sub>149</sub>N<sub>10</sub>O<sub>37</sub> [M + H]<sup>+</sup>, 1915,2; encontrado, *m/z* 1915.

(IESDV)<sub>2</sub>PEG8 (76). El pentapéptido IESDV se sintetizó tal y como se describe más arriba y se generó 76 mediante el uso del protocolo general para dimerizaciones (que usa el «procedimiento con HBTU»). Rendimiento: 23%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), 98% (UV). MS (ESI+) calculada para C<sub>68</sub>H<sub>117</sub>N<sub>10</sub>O<sub>33</sub> [M + H]<sup>+</sup>, 1601,7; encontrado, *m/z* 1602.

(IESDV)<sub>2</sub>PEG6 (77). El pentapéptido IESDV se sintetizó tal y como se describe más arriba y se generó 77 mediante el uso del protocolo general para dimerizaciones (que usa el «procedimiento con HBTU»). Rendimiento: 23%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), 99% (UV), MS (ESI+) calculada para C<sub>64</sub>H<sub>109</sub>N<sub>10</sub>O<sub>31</sub> [M + H]<sup>+</sup>, 1513,7; encontrado, *m/z* 1514.

(IESDV)<sub>2</sub>PEG4 (78). El pentapéptido IESDV se sintetizó tal y como se describe más arriba y se generó 78 mediante el uso del protocolo general para dimerizaciones (que usa el «procedimiento con HBTU»). Rendimiento: 24%. ESI-LC/MS: 98% (ELSD), 98% (UV). MS (ESI+) calculada para C<sub>60</sub>H<sub>101</sub>N<sub>10</sub>O<sub>29</sub> [M + H]<sup>+</sup>, 1425,7; encontrado, *m/z* 1426.

(IETAV)<sub>2</sub>PEG4 (83). El pentapéptido IESDV se sintetizó tal y como se describe más arriba y se generó 83 mediante el uso del protocolo general para dimerizaciones (que usa el «procedimiento con HBTU»). Rendimiento: 35%. ESI-LC/MS: > 99% (ELSD), 99% (UV), MS (ESI+) calculada para C<sub>60</sub>H<sub>104</sub>N<sub>10</sub>O<sub>25</sub> [M + H]<sup>+</sup>, 1365,6; encontrado, *m/z* 1366.

Ensayo de fluorescencia polarizada (FP): los ensayos de fijación a saturación a PDZ se utilizaron para medir la afinidad de fijación entre los péptidos fluorescentes (Cy5-NR2B, 5-FAM-NR2B, Cy5-CRIPT o 5-FAM-CRIPT). A una concentración fija de Cy5-NR2B, 5-FAM-NR2B, Cy5-CRIPT o 5-FAM-CRIPT (50 nM), se añadieron concentraciones crecientes de PDZ para conseguir una curva de fijación con saturación. El ensayo se realizó en tampón TBS a 1× (NaCl a 150 mM, Tris a 10 mM, pH 7,4) que incluye SAB al 1% en placas negras de 384 pocillos con fondo plano (Corning Life Sciences, NY, EE. UU.). Tras la incubación durante 20-30 min a temperatura ambiente, la FP de las muestras se midió en un lector de placas Safire<sup>2</sup> (Tecan, Männedorf, Suiza), pero antes de leer las muestras, se ajustó el factor *g* de tal forma que la sonda a 50 nM sin ninguna PDZ presente diera un valor de FP de 20 mP. Cy5-NR2B y Cy5-CRIPT, así como 5-FAM-NR2B y 5-FAM-CRIPT, se midieron a valores de excitación/emisión de 635/670 nm y 470/525 nm, respectivamente. Los valores de FP se ajustaron a la ecuación  $Y = B_{\max} \times X / (K_d + X)$ , en donde  $B_{\max}$  es el valor de FP máximo,  $X$  es la concentración de PDZ, e  $Y$  es valores de FP variables. Siempre y cuando la concentración del péptido marcado esté claramente por debajo de la  $K_d$  verdadera durante el ensayo, la  $K_d$  se puede deducir directamente a partir de esta curva de saturación al ser igual a la concentración de PDZ, en donde la curva está semisaturada (en estas condiciones,  $CE_{50} \square [PDZ \text{ total}]_{\text{semisaturación}} = [PDZ \text{ libre}]_{\text{semisaturación}} \square K_d$ )<sup>5</sup>.

Para medir las afinidades entre los péptidos no fluorescentes y los dominios PDZ, se realizaron ensayos de fijación competitiva heterólogos. Esto se realizó mediante la adición de concentraciones crecientes del péptido a una concentración fija de Cy5-NR2B, 5-FAM-NR2B, Cy5-CRIPT o 5-FAM-CRIPT (50 nM) y PDZ (20 μM para PDZ1, 3 μM para PDZ2 y 1-2, y 5 μM para PDZ3) en el mismo tampón TBS y las condiciones que se describen más arriba. Los valores de FP se ajustaron entonces a la ecuación general:  $Y = \text{Fondo} + (\text{Superior-Fondo}) / [1 + 10^{-X \cdot \log(CI_{50})}]$ , en donde  $X$  es el valor logarítmico de la concentración peptídica. Mediante esto se obtuvo el valor de  $CI_{50}$ , que se utiliza para calcular la constante de inhibición competitiva teórica,  $KI^5$ .

Fluorimetría de flujo detenido: Las construcciones de expresión HIS-PDZ2 e HIS-PDZ1-2 de PSD-95 se manipularon genéticamente para codificar un triptófano (en la posición 51 de la SEQ ID n.º 4 y en la posición 145 de la SEQ ID n.º 8, respectivamente) en vez de isoleucina. A continuación se monitorizó la fijación entre PDZ2 y PDZ1-2 y el ligando peptídico 74 y se la cuantificó con la medición del incremento de la fluorescencia de este triptófano tras el

reconocimiento del ligando ( $\lambda$  de excitación a 280 nm,  $\lambda$  de emisión > 320 nm). Las mediciones del flujo detenido se realizaron a 10 °C o 25 °C en un espectrómetro de flujo detenido SX-20MV (Applied Photophysics, Leatherhead, Reino Unido). El péptido, en diferentes cantidades, se mezcló rápidamente con una cantidad constante de PDZ y el cambio de la fluorescencia se midió a lo largo del tiempo. Los gráficos de la fluorescencia frente a tiempo se ajustaron a una ecuación exponencial única o doble, de la que se obtuvieron una o dos constantes de velocidad observadas. Las constantes de velocidad observadas se representaron entonces en un gráfico frente a la concentración de las especies variables y las constantes de velocidad microscópicas se determinaron al ajustar los datos a la ecuación para una asociación bimolecular (Ec. 1)

$$k_{obs} = ((k_{on}^2 (n - [A]_0)^2 + k_{off}^2 + 2 k_{on}k_{off} (n + [A]_0))^{0.5} \quad (\text{Ec. 1})$$

- 10  $k_{on}$  es la constante de asociación,  $k_{off}$  es la constante de disociación y  $[A]_0$  y  $n$  son la concentración inicial de las especies variables y constantes, respectivamente.

Para determinar el valor de la  $k_{off}$  se realizó un experimento de caza. En este experimento, el PDZ1-21195W en complejo con 74 se mezcló con el PDZ1-2 sin mutar, con el que compitió 74. En concentraciones altas de PDZ1-2 sin mutar, la constante de velocidad observada se acerca a la constante de disociación neta para la reacción de fijación ( $k_{off}^{app}$ ) entre 74 y PDZ1-2. El valor observado de las constantes se ajustaron a la Ec. 2 para estimar la constante de disociación aparente o neta para el péptido,  $k_{off}^{app}$ .

$$k_{obs} = k_{off}^{app} + k_{on}' \times K_D / (K_D + [\text{péptido sin marcar}]) \quad (\text{Ec. 2})$$

La constante de disociación en equilibrio  $K_D$  del complejo PDZ-péptido se calculó mediante las  $k_{on}$  y  $k_{off}$  determinadas experimentalmente.

- 20 Ensayo de arrastre (*pull-down*): El ensayo se realizó con un kit de interacción de proteína-proteína con PolyHis de arrastre ProFound™ comprado a Pierce y llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Modelado molecular: PDZ1 y PDZ2 se alinearon con PDZ3 con el uso de Prime (Schrödinger, Portland, OR, EE. UU.). A partir de estas secuencias se crearon modelos por homología con la estructura cristalina por rayos X de PDZ3 (estructura de PDB 1BE9)<sup>10</sup> como modelo en Prime con parámetros estándares. El ligando peptídico de IBE9, KQTSV, se reconstruyó a IESDV en los modelos de homología. A continuación, las cadenas laterales del dominio PDZ y el péptido se minimizaron el Macromodel (Schrödinger, Portland, OR, EE. UU.) con el campo de fuerza OPLS2005 y construyendo el esqueleto. Se generó una cuadrícula alrededor del péptido en Glide (Schrödinger, Portland, OR, EE. UU.) y se utilizó para el acoplamiento. Los péptidos oportunos se acoplaron flexiblemente en Glide con los parámetros por defecto y a los acoplamientos mejor puntuados se les minimizó la energía. La molécula de agua conservada que se observa en el bolsillo de fijación se mantuvo constante durante el acoplamiento y la minimización. Se utilizó Pymol, versión 0.97, para crear las figuras<sup>11</sup>.

Calorimetría isotérmica de titulación (ITC): Se realizaron experimentos de calorimetría en un microcalorímetro (Microcal, MA, EE. UU.). Los ligandos se titularon directamente en la solución de PDZ. Todos los ligandos y las proteínas de PDZ se solubilizaron en tampón PBS (NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 2 mM, pH 7,4) y cuando era necesario se ajustó el pH a 7,4 dentro de 0,02 unidades de pH tras la solubilización. La concentración del péptido y PDZ en la solución se cuantificó mediante análisis de aminoácidos. Los experimentos de calorimetría se realizaron a 25 °C, en donde la concentración de PDZ1-2 generalmente se ajustó a 20  $\mu$ M (200  $\mu$ l en calorímetro) y la concentración del ligando a entre 200 y 2500  $\mu$ M (inyectado a la proteína como 20  $\times$  2  $\mu$ l). Se diseñaron experimentos de tal modo que el valor de  $c$  (valor de  $c = K_a \times [\text{Proteína}] \times n$ ; en donde  $K_a$  es la constante de asociación de afinidad,  $[\text{Proteína}]$  significa concentración de proteínas y  $n$  es la estequiometría de la reacción) estaba entre 1 y 1000. La solución analizada se agitó a 1000 rpm, con una potencia de referencia de 6  $\mu$ cal/s. El calor de dilución se determinó inicialmente mediante la titulación del ligando en el tampón y sustrayendo estos valores basales de los «valores de calor» observados. Los datos de cada experimento de titulación se recogieron mediante ORIGIN 7.0 (Microcal, MA, EE. UU.), que también se utilizó para determinar las propiedades termodinámicas de la fijación del ligando mediante el ajuste no lineal de mínimos cuadrados que supone un modelo de sitio único.

Ensayo de estabilidad en el plasma sanguíneo humano. Los compuestos de interés se disolvieron en el plasma sanguíneo humano (270  $\mu$ l; 3H Biomedical, Suecia, cat. n.º 1300-1-P50) para una concentración de 0,25 mM (30  $\mu$ l de 2,5 mM) y se incubaron a 37 °C. Se retiraron alícuotas de 30  $\mu$ l a diferentes intervalos de tiempo (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 960, 1280, 2550, 4560 y 7240 min) y se pararon con 60  $\mu$ l de ácido tricloroacético (aq., 5%). Las alícuotas se agitaron vorticialmente y se incubaron durante al menos 15 min, a 4 °C antes de la centrifugación a 18,000g durante 2 min, y el sobrenadante se analizó por RP-HPLC para cuantificar el compuesto restante (absorbancia a 218 nm). El análisis por RP-HPLC se realizó en un sistema Agilent 1100 con una columna Zorbax 300 SB-C18 (5  $\mu$ m, 4,6  $\times$  150 mm, Agilent Technologies, EE. UU.), velocidad de flujo de 1 ml/min y un gradiente que comienza con el tampón A al 100% (agua al 95%, acetonitrilo al 5%, TFA al 1%) y acaba con el tampón B al 40% (acetonitrilo al 95%, agua al 5%, TFA al 1%) y el tampón A al 60% durante 40 min.

Ensayo de excitotoxicidad neuronal. Las neuronas corticales se retiraron quirúrgicamente de ratas (p. ej., E21) y a continuación se cultivaron durante 7 a 9 días *in vitro* en el medio Neurobasal A complementado con B-27 (cada uno

suministrado por Invitrogen), además complementado con glutamina a 1 mM, 50 unidades/ml de penicilina y estreptomycin a 50 µg/ml. A continuación se realizaron las etapas siguientes:

1. Se retiraron varias muestras de las neuronas corticales en cultivo del medio de cultivo basado en Neurobasal A, en diferentes momentos de tiempo antes de la exposición al compuesto, y se colocaron en el «medio de transfección» (TH; tal y como se define en Bading et al. (1993) *Science* 260, 181-186) que comprende: medio esencial mínimo modificado al 10% (suministrado por Invitrogen; producto n.º 21090022; que contiene sal de Earles, pero no L-glutamina), medio de sal-glucosa-glicina (SGG) al 90%: (NaCl a 114 mM, NaHCO<sub>3</sub> a 0,219%, KCl a 5,292 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, CaCl<sub>2</sub> a 2 mM, HEPES a 10 mM, glicina a 1 mM, glucosa a 30 mM, piruvato de sodio a 0,5 mM, rojo fenol al 0,1%), complemento de insulina-transferrina-selenita (suministrado por Sigma: 7,5 µg de insulina/ml, 7,5 µg de transferrina/ml y 7,5 ng de selenita de sodio/ml); con una osmolaridad final de 325 mosm/l. Todas las etapas posteriores se realizaron en este medio TM,
2. Las muestras de las neuronas se expusieron a un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención (compuestos 40, 52-90) a una concentración final de entre 0,05 y 50 µM durante un periodo de entre 0,5 a 1,5 horas. En los ensayos de control, las muestras se expusieron a NR2B (1) o a Tat-NR2B (3) o al medio TM solo.
3. Cada muestra de neuronas se lavó al menos una vez en medio TM para retirar el inhibidor de NMDAR/PSD-95 y se colocó en el medio TM.
4. Tras varios periodos de tiempo, las muestras de las neuronas se expusieron a NMDA a una concentración entre 10 y 100 µM durante un periodo de 0,5 a 1,5 horas, preferiblemente 1 hora, tras lo cual las muestras se colocaron de nuevo en el medio TM durante 24 horas.
5. Se cuantificó la LDH en el medio celular mediante los kits comerciales disponibles (p. ej., Promega Biotech AB, cat. n.º G1780).

Ejemplo 1. Un ensayo de fluorescencia polarizada para detectar las interacciones entre los análogos peptídicos y los dominios PDZ.

- Un modo cómodo y fiable para examinar las interacciones entre los análogos peptídicos y los dominios PDZ es mediante el uso de un ensayo de fluorescencia polarizada (FP). Los tres dominios PDZ, PDZ1-3, de PSD-95 se expresaron individualmente tal y como se presenta más arriba, mientras que PDZ1-2 también se expresaba como una construcción en tándem. Tal y como se presenta más arriba, los péptidos fluorescentes se sintetizaron mediante la marcación de los péptidos undecapeptídicos que corresponden al extremo carboxilo silvestre (WT) de la subunidad de NR2B (**YEKLSIESDV**) y de CRIPT (**LDTKNYKQTSV**) con 5-FAM o bien con Cy5, a través de un conector tripeptídico (KSG o CSG), en el extremo amino (designados 5-FAM-NR2B, Cy5-NR2B, 5-FAM-CRIPT y Cy5-CRIPT)<sup>12</sup>. A continuación, se determinaron los valores de  $K_d$ . También se implementó un ensayo de fijación competitiva para medir la afinidad como valores de  $CI_{50}$  entre los dominios PDZ y los péptidos no fluorescentes de NR2B (1, **KSG-YEKLSIESDV**) y de CRIPT (2, **KSG-LDTKNYKQTSV**). A continuación, los valores de  $CI_{50}$  se convirtieron en valores de  $K_i$ <sup>5</sup>.
- Ya que los valores de  $K_d$  y  $K_i$  deben ser similares cuando se mide la misma interacción PDZ-péptido, estos valores se compararon para los péptidos procedentes de NR2B (PDZ1, PDZ2 y PDZ1-2) y los péptidos procedentes de CRIPT (PDZ3). Los valores de  $K_d$  y  $K_i$  se halló que eran muy parecidos cuando se midieron frente a PDZ1, PDZ2 y PDZ3, aunque la  $K_i$  para la construcción en tándem PDZ1-2 es algo mayor que la  $K_d$  (tabla 1).

Tabla 1. Validación del ensayo de FP: valores de  $K_d$  y  $K_i$  de las sondas y péptidos silvestres<sup>a</sup>.

Compuesto	PDZ1	PDZ2	PDZ3	PDZ1-2
5-FAM/Cy5-NR2B <sup>b</sup>	20 ± 1,6	3,0 ± 0,16	NA <sup>d</sup>	1,7 ± 0,11
5-FAM/Cy5-CRIPT <sup>b</sup>	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>	3,5 ± 0,18	ND <sup>d</sup>
NR2B (1) <sup>c</sup>	18 ± 0,92	4,1 ± 0,17	NA <sup>d</sup>	7,0 ± 0,19
CRIPT (2) <sup>c</sup>	97 ± 18	25 ± 1,6	2,1 ± 0,15	45 ± 4,1
Tat-NR2B (3) <sup>c</sup>	14 ± 1,9	4,4 ± 0,32	NA <sup>d</sup>	9,8 ± 0,35

- <sup>a</sup> Los valores de  $K_d$  y  $K_i$  se muestran como la media ± EEM (error estándar de la media) en µM basado en al menos cuatro mediciones independientes. <sup>b</sup> Valores de  $K_d$ . <sup>c</sup> Valores de  $K_i$ . <sup>d</sup> ND: no determinado, NA: ninguna actividad.

- Además, los valores de  $K_d$  son independientes de si se utiliza 5-FAM o Cy5 como fluoróforo (datos sin mostrar). La  $K_d$  para el péptido 5-FAM-NR2B también se determinó para PDZ2 con y sin la etiqueta de His y, como se esperaba, no se observó ninguna diferencia (datos sin mostrar)<sup>13,14</sup>. Así pues, los resultados obtenidos en el ensayo representan mediciones precisas, coherentes con los valores de la bibliografía para mediciones similares<sup>15-17</sup>. El péptido NR2B (1) no muestra ninguna fijación a PDZ3 (tabla 1), lo cual era esperable<sup>9,12</sup>, con lo que en los ejemplos se utilizó la actividad sobre PDZ3 como una medición de la selectividad. A todos los compuestos se les comprobó su

capacidad de fijación a PDZ3 y, a menos que se diga otra cosa, los compuestos no tenían ninguna afinidad por este dominio.

El péptido Tat-NR2B de 20 meros (3, **YGRKKRRQRRR-KLSSIESDV**) se describe que tiene un incremento de la afinidad de más de 100 veces por PDZ2 en comparación al péptido NR2B solo, tal y como se muestra mediante un ensayo basado en ELISA en fase sólida<sup>3</sup>. Sin embargo, el ensayo de FP revela que los valores de  $K_i$  por los dominios PDZ de PSD-95 son similares para NR2B (1) y Tat-NR2B (3) (tabla 1). Así pues, los efectos *in vivo* notables demostrados para este péptido Tat-NR2B<sup>1</sup> se deben lo más probablemente a la capacidad del resto Tat para mejorar la permeabilidad de los péptidos a través de la membrana en vez de para incrementar la afinidad entre el ligando peptídico y los dominios PDZ de la PSD-95.

- 10 Ejemplo 2. Identificación de los rasgos esenciales de un péptido de NR2B necesarios para la fijación a los dominios PDZ para obtener un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención.

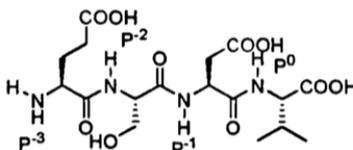
La secuencia mínima del péptido NR2B (1) necesaria para la fijación a PDZ1 y PDZ2 se identificó mediante el ensayo de FP. El péptido de NR2B se truncó secuencialmente desde el extremo amino y en especial era posible reducirlo a un pentapéptido, IESDV (7), sin perder afinidad (figura 2A). El truncamiento al tetrapéptido ESDV (8) 15 mostró un incremento de 3,1 y 6,8 veces de los valores de  $K_i$  por PDZ1 y PDZ2, respectivamente, y el tripéptido, SDV, mostró un incremento de >20 y >30 veces de la  $K_i$  en comparación con el péptido 1. Para examinar si se puede extender esta estrategia a las proteínas con dominio PDZ, la actividad de péptido de CRIPT (2) en PDZ3 se comparó con un pentapéptido de CRIPT truncado (KQTSV); a diferencia del péptido de NR2B (1) y PDZ1 y PDZ2, se observó una reducción de 14 veces de la  $K_i$  para este pentapéptido (datos sin mostrar).

- 20 Para estudiar la importancia de cada uno de los cinco aminoácidos del pentapéptido (7), se realizó un análisis de barrido con alanina en este péptido (figura 2B). Para PDZ1 y PDZ2, se observó una pérdida de afinidad casi completa al sustituir la Val de la posición  $P^0$  (14), lo que subraya la importancia crucial de la cadena lateral de isopropilo. Se observó un efecto similar por PDZ1 cuando se cambiaba la Ser ( $P^2$ ) (12), mientras que se observó un incremento de 7 veces del valor de  $K_i$  para PDZ2. Así pues, las posiciones  $P^0$  y  $P^2$  son particularmente decisivas 25 para la afinidad del pentapéptido, lo que corresponde a un péptido de NR2B truncado (1). Otras dos posiciones, Glu ( $P^3$ ) e Ile ( $P^4$ ) mostraban menos sensibilidad a las sustituciones de la Ala (10 y 11, respectivamente) pero los valores de  $K_i$  son aún algo más altos que 1 por PDZ1 y PDZ2. Por otra parte, el reemplazo del Asp ( $P^1$ ) (13) no afectó la afinidad por PDZ1 o PDZ2, aunque apareció cierta actividad con PDZ3. Aunque la afinidad de 13 por PDZ3 es baja ( $K_i > 30$  veces mayor que CRIPT), esto sugiere que el Asp ( $P^1$ ) es importante para determinar la selectividad 30 entre los dominios PDZ de la PSD-95.

Ejemplo 3. Mejora de la afinidad de los ligandos peptídicos por los dominios PDZ1 y 2 mediante modificaciones simples para obtener un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención.

Se analizaron las sustituciones en el ligando del péptido de NR2B truncado para mejorar la afinidad del ligando y, al mismo tiempo, reducir su polaridad. El tetrapéptido, ESDV (8), se utilizó como modelo en vez del pentapéptido 35 porque es un punto de partida mejor para el desarrollo de moléculas pequeñas y es todavía relativamente potente sobre PDZ1 y PDZ2. La introducción de aminoácidos D y N-metilados puede, a menudo, inducir resistencia a la escisión enzimática. Además, los aminoácidos D proporcionan información sobre la importancia de la distribución estereoquímica de las cadenas laterales de los aminoácidos, mientras que los aminoácidos N-metilados se sabe que estabilizan ciertas conformaciones de enlaces amida<sup>18</sup>.

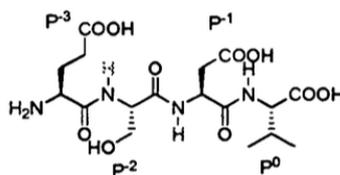
- 40 La introducción de D-Ser, D-Asp y D-Val en vez de sus respectivos aminoácidos L, de uno en uno, en ESDV (8) eliminó la afinidad por PDZ1 y por PDZ2, mientras que el D-Glu bajó la afinidad >25 veces por PDZ1 y PDZ2 respecto al péptido 1 (datos sin mostrar). Así pues, los aminoácidos L son esenciales para la afinidad. Se toleró mejor la sustitución por los aminoácidos N-metilados (tabla 2). La N-metilación del Asp en  $P^1$  (16) mostró cierta pérdida en la afinidad en comparación con el péptido de NR2B (1) por PDZ1 y por PDZ2 (tabla 2), mientras que la N- 45 metilación de la Val ( $P^0$ ) (15) y de la Ser ( $P^2$ ) (17) dio lugar a péptidos inactivos. Sin embargo, la sustitución del aminoácido terminal Glu ( $P^3$ ) por Glu N-metilado (18) mejoró la afinidad respecto al tetrapéptido de referencia (8) y, en comparación con el péptido 1, el péptido 18 mostró unos valores de  $K_i$  sólo 1,3 y 3,7 veces más altos por PDZ1 y PDZ2, respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Valores de  $K_i$  de los análogos *N*-metilados de ESDV<sup>a</sup>

Compuesto	Posición de la modificación	Estructura de la modificación	PDZ1	PDZ2
NR2B (1)	-	-	18 ± 0,92	4,1 ± 0,17
ESDV (8)	-	-	56 ± 2,4	28 ± 0,92
15	P <sup>0</sup>	CH <sub>3</sub>	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>
16	P <sup>-1</sup>	CH <sub>3</sub>	87 ± 3,1	78 ± 4,5
17	P <sup>-2</sup>	CH <sub>3</sub>	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>
18	P <sup>-3</sup>	CH <sub>3</sub>	24 ± 1,8	15 ± 1,2

<sup>a</sup> Los valores de  $K_i$  se muestran como media ± EEM en  $\mu\text{M}$  basada en al menos cuatro mediciones independientes. <sup>b</sup> NA: ninguna actividad.

- 5 Los efectos de modificar las cadenas laterales de ESDV (8) se estudiaron mediante la sustitución con aminoácidos proteinógenos y no proteinógenos (tabla 3) prestando atención a los cambios de tamaño y/o de polaridad para intentar optimizar la fijación a PDZ y su idoneidad como fármaco. Inicialmente, la Val (P<sup>0</sup>) se sustituyó por análogos aminoacídicos no naturales relativamente conservativos. El reemplazo con ácido 2-aminobutanoico (Abu) o ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib) para dar 19 y 20, respectivamente, redujo la afinidad considerablemente (tabla 3). Al sustituir con *tert*-leucina (tLeu) (21), la afinidad por PDZ1 se redujo sólo 4,2 veces, mientras que la afinidad por PDZ2 se redujo aproximadamente 40 veces respecto al péptido de NR2B (1) (tabla 3), lo que proporciona medios para inhibir diferencialmente la actividad sobre PDZ1 y sobre PDZ2.

Tabla 3. Valores de  $K_i$  tras una única modificación del tetrapéptido, ESDV<sup>a</sup>.

Compuesto	Posición de la modificación	Estructura de la modificación	PDZ1	PDZ2
NR2B (1)	-	-	18 ± 0,92	4,1 ± 0,17
EDSV (8)	-	-	56 ± 2,4	28 ± 0,92
19		CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	230 ± 7,8	NA <sup>b</sup>
20	P <sup>0</sup>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>
21		C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	76 ± 3,2	160 ± 5,0
22		(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	57 ± 2,3	29 ± 4,1
23	P <sup>-1</sup>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	67 ± 3,6	29 ± 2,1
24		CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	88 ± 5,4	67 ± 7,1
25		(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>
26		CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>
27	P <sup>-2</sup>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NA <sup>b</sup>	NA <sup>b</sup>
28		CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH	22 ± 0,95	16 ± 0,85
29	P <sup>-3</sup>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	130 ± 11	100 ± 7,1

- 15 <sup>a</sup> Los valores de  $K_i$  se muestran como media ± EEM en  $\mu\text{M}$  basada en al menos cuatro mediciones independientes. <sup>b</sup> NA: ninguna actividad.

En la posición P<sup>-1</sup>, el Asp se sustituyó por Gln, Glu y Asn (22-24) y la extensión de la cadena lateral del ácido con un grupo metileno, como en el Glu (23), no redujo la afinidad significativamente, pero la amidación del ácido, como en la Asn (24), redujo la afinidad por PDZ1 y PDZ2. Sin embargo, una combinación de las dos modificaciones, sustituir el Asp por la Gln sin cargar (22), no alteró la afinidad por PDZ1 o bien por PDZ2, por lo que el péptido 22 tiene una

5 afinidad similar al ESDV (8) (tabla 3).

La sustitución de la Ser (P<sup>-2</sup>) por los aminoácidos no proteinógenos homoserina, alotreonina e hidroxivalina, compuestos 25-27, condujo a péptidos inactivos (tabla 3), pero la sustitución por Thr (28) incrementó la afinidad en comparación con el péptido inicial 8, y los valores de K<sub>i</sub> se incrementaron solo de 1,2 y 4 veces por PDZ1 y PDZ2, respectivamente, en comparación con el péptido de NR2B (1). La sustitución del Glu (P<sup>-3</sup>) por Gln (29) empeoró la

10 fijación (tabla 3).

Está muy consolidado que uno de los primeros problemas cuando se buscan nuevos ligandos para las PPI es la aparición de positivos falsos. Por lo tanto, se validaron las afinidades relativas por NR2B (1), Tat-NR2B (3), IESDV (7), ESDV (8) y E<sub>Me</sub>TAV (40) analizadas con el ensayo de FP en los presentes ejemplos y se confirmaron mediante un ensayo de arrastre (figura 3) con el protocolo que se describe a continuación (véase también el apartado

15 Metodología). Como cebo, se sintetizó un péptido silvestre de NR2B con polihistidina con la secuencia HHHHHHYEKLSSIESDV. Este péptido se fija a la resina (quelato de cobalto inmovilizado optimizado para la fijación a polihistidina) mediante lo cual se inmoviliza a sí mismo. El dominio PDZ2 de la PSD-95 sin la etiqueta de His se produjo como se describe más arriba en el apartado Metodología (proteína presa). La concentración del cebo y la presa se optimizó a 25 µg y 100 µg por vial de la muestra, respectivamente. A continuación, se analizó cada

20 análogo peptídico (por triplicado) a una concentración final de 200 µM (excepto para Tat-NR2B, que se analizó a 150 µM) por su capacidad para desplazar el cebo y la proteína presa el uno de la otra, seguido de un procedimiento de lavado. Finalmente, la PDZ2 unida a la resina (fijada a través del cebo) se eluyó con imidazol a 250 mM. La PDZ2 eluida se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con plata. La figura 3 muestra el gel de SDS teñido con plata del dominio PDZ2 eluido, en donde el control negativo indica la cantidad de PDZ2 fijada al cebo en ausencia de un

25 inhibidor peptídico análogo. El inhibidor de NMDAR/PSD-95 E<sub>Me</sub>TAV (40) se muestra que es un inhibidor muy eficaz de las interacciones de NMDAR/PSD-95.

Ejemplo 4. Mejora de la afinidad de los ligandos peptídicos por los dominios PDZ1 y 2 mediante una combinación de sustituciones para obtener un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención.

Los análisis anteriores para mejorar la afinidad del ligando peptídico demostraron que son favorables la Thr (28) y el

30 Glu *N*-metilado (E<sub>Me</sub>) (18) en las posiciones P<sup>-2</sup> y P<sup>-3</sup>, respectivamente, del tetrapéptido ESDV (8). Las modificaciones en la posición P<sup>0</sup> no suelen estar permitidas, mientras que se permite un grado de libertad mayor para la modificación de la posición P<sup>-1</sup>. Basándose en estas observaciones, se diseñaron y sintetizaron tres series de compuestos: dos series de compuestos, ETXV y E<sub>Me</sub>SXV, en donde X es Gln, Asn o *N*-Me-Asp, y una serie de compuestos, E<sub>Me</sub>TXV, en donde X es Gln, Asn, *N*-Me-Asp, Ala o Asp.

Una combinación de las dos modificaciones favorables, E<sub>Me</sub> en P<sup>-3</sup> y Thr en P<sup>-2</sup>, produjo compuestos con valores de K<sub>i</sub> significativamente más bajos por PDZ1 que el péptido de NR2B (1), y sólo ligeramente más altos por PDZ2 (figura 4). En particular, los tetrapéptidos modificados, E<sub>Me</sub>TDV (36) y E<sub>Me</sub>TQV (39), son aproximadamente 3 veces más potentes sobre PDZ1 que el péptido silvestre 1, y sólo ligeramente menos potente sobre PDZ2. La introducción del aminoácido no polar y pequeño Ala en P<sup>-1</sup> para dar E<sub>Me</sub>TAV (40) proporcionó un inhibidor que era más potente que 1

40 sobre PDZ1 y sólo 2 veces menos potente sobre PDZ2. Aunque 40 mostró cierta actividad sobre PDZ3, el valor de K<sub>i</sub> para PDZ3 era aún considerablemente más alto (aproximadamente 79 µM) respecto al de PDZ1 y PDZ2, con lo que 40 se considera que es selectivo por PDZ1 y PDZ2 respecto a PDZ3. La sustitución de la posición P<sup>-1</sup> por *N*-Me-Asp (37) o Asn (38) redujo la afinidad en comparación con E<sub>Me</sub>TDV (36), pero estos péptidos eran aún igualmente potentes sobre PDZ1 en comparación con el péptido 1 (figura 4). En conclusión, la metilación del extremo amino de los tetrapéptidos incrementa su afinidad de fijación por los dominios PDZ1 y PDZ2, tal y como se observa para todos los ligandos *N*-metilados en la figura 4, en comparación con sus correspondientes ligandos sin *N*-metilar. Además, el incremento de la afinidad debido a la metilación de la amina del extremo amino de los tetrapéptidos es suficientemente grande para poder compensar la introducción de análogos aminoácidos, p. ej., posición P<sup>-1</sup> que incrementa la estabilidad *in vivo* del ligando, tal como *N*-Me-Asp, incluso cuando esto reduce la afinidad del ligando.

50 Ejemplo 5: Modelado molecular y acoplamiento de un ligando peptídico en el bolsillo de fijación del dominio PDZ.

Se generaron modelos por homología de PDZ1 y PDZ2 mediante Prime basado en la estructura cristalográfica de rayos X de PDZ3 en complejo con el péptido CRIPT<sup>10</sup> y el acoplamiento flexible de los péptidos clave se realizó con Glide. Inicialmente, el pentapéptido IESDV (7) se acopló en PDZ1, lo que dio lugar a un modo de fijación en donde el esqueleto de 7 se superpone con el esqueleto del péptido de CRIPT en PDZ3. Sin embargo, una interacción electrostática que no aparecía en la estructura de PD3-CRIPT emerge entre el grupo amino del extremo amino de 7

55 y la Asp90 en el bucle grande βB-βC de PDZ1 (figura 5A). Se forma un bolsillo hidrófobo mediante la Thr 83, la Gly89 y la His130 en PDZ1 (PDZ2: His225, Val178 y Pro184), que se llena parcialmente con la cadena lateral de la Ile en la posición P<sup>-4</sup>. El resto de Glu en P<sup>-3</sup> interacciona con la Thr97 y la Lys98 de la hebra βC de PDZ1 (PDZ2: Thr192 y Lys193) a través de puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas, lo que explica la importancia de este

60 resto para la afinidad (figura 5A). El grupo hidroxilo de la Ser en P<sup>-2</sup> forma un puente de hidrógeno con la His130,

similar al observado en la estructura de PDZ3-CRIPT. El reemplazo de la Ser ( $P^2$ ) por Thr permite que el grupo metilo adicional interactúe con un área hidrófoba creada por la Val134 en PDZ1 (PDZ2: Val229); lo que puede explicar el incremento de afinidad de la sustitución de Ser por Thr. Es muy probable que no estén permitidas las sustituciones con aminoácidos no naturales más grandes en  $P^2$  debido a impedimentos estéricos con los restos de PDZ.

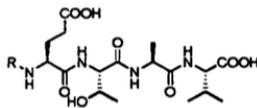
En la estructura de PDZ3-CRIPT, la cadena lateral de  $P^1$  no interactúa con un resto en PDZ3<sup>10</sup>. En nuestro modelo, vemos una interacción electrostática entre el Asp ( $P^1$ ) y la Lys98 (figura 5A). Observamos que el Asp se podría reemplazar por Gln o Ala, lo que indica que ninguna carga ni ningún puente de hidrógeno es decisivo para la afinidad. Por otra parte, la introducción de Asn en la posición  $P^1$  redujo la afinidad con más intensidad, lo que demuestra que no todas las sustituciones de cadenas laterales están igualmente permitidas.

La metilación del grupo amino del extremo amino mejoró la afinidad de los tetrapéptidos. El acoplamiento de  $E_{Me}TAV$  (40) en PDZ1 revela que el grupo amino del extremo amino está muy cerca de la His130, lo que crea una interacción favorable de catión- $\pi$  (figura 5B). La interacción se estabiliza además mediante el grupo *N*-metilo, que se sitúa en el sistema  $\pi$  del anillo imidazol de la His130 (figura 5B), lo que explica el incremento de afinidad tras la *N*-metilación. Los grupos de cadena lateral de la posición  $P^0$ ,  $P^2$  y  $P^3$  y el esqueleto de ligando se fijan al PDZ en la misma configuración que el pentapéptido 7. El acoplamiento de TAV (49) en el modelo de homología de PDZ1 muestra que el grupo amino del extremo amino interviene en el puente de hidrógeno asistido por carga hacia el oxígeno del hidroxilo de la Ser78 (PDZ2: Ser173) y un grupo de carbonilo de esqueleto (figura 5C).

Ejemplo 6: Mejora de la afinidad del ligando peptídico ETAV por los dominios PDZ1 y 2 mediante la modificación del extremo amino para obtener un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención.

Los estudios de modelado molecular sugieren que el grupo metilo de  $E_{Me}TAV$  (40) sólo se solapa parcialmente con la cadena lateral aromática de la His130 de PDZ1 (figura 5B), lo que indica que reemplazar el grupo metilo por grupos más grandes podría mejorar la afinidad a través del incremento de las interacciones hidrófobas y/o las interacciones de apilamiento aromáticas. Por lo tanto, se diseñaron y sintetizaron una serie de análogos de ETAV (51) en donde el grupo *N*-metilo está reemplazado por sustituyentes alifáticos y aromáticos más grandes (tabla 4). La *N*-alquilación de ETAV estaba facilitada por una reacción de Mitsunobu con el protocolo de Fukuyama<sup>6</sup>, tal y como se aplicó previamente para la preparación de los péptidos *N*-alquilados<sup>7</sup>. El grupo amino terminal de ETAV se activó como un sulfonamida de nitrobenzilo y posteriormente se hizo reaccionar con un abanico de alcoholes mediado por el azadicarboxilato de diisopropilo (DIAD) y  $Ph_3P$  para dar los productos protegidos y fijados a la resina (esquema 1 en la figura 6). Los productos finales se obtuvieron por desprotección de la sulfonamida y la escisión de la resina, lo que proporciona los productos deseados, los compuestos 52-56 y 58-63, con una pureza excelente y por lo general con un rendimiento alto (tabla 4).

Inicialmente, el grupo metilo de  $E_{Me}TAV$  (40) se reemplazó por etilo (52), propilo (53) y butilo (54); los estudios de acoplamiento molecular sugerían específicamente que el ETAV etilado (52) tendría una afinidad parecida a la del  $E_{Me}TAV$  (40), mientras que el ETAV propilado y butilado (53 y 54) deberían incrementar su afinidad. La evaluación biológica de los compuestos confirmó esta predicción, en concreto para la afinidad por PDZ2 (tabla 4).

Tabla 4. Valores de  $K_i$  de péptidos ETAV modificados en el extremo amino<sup>a</sup>.

Compuesto	R	$\square \pm \sigma \square$	PDZ2	PDZ3
NR2B (1)	-	18 ± 0,92	4,1 ± 0,17	NA <sup>b</sup>
CR IPT (2)	-	97 ± 18	25 ± 1,6	2,1 ± 0,15
ETAV (51)	-	29 ± 1,6	22 ± 0,92	260 ± 20
40	CH <sub>3</sub>	11 ± 0,47	8,9 ± 0,50	78 ± 1,5
52	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	9,3 ± 0,55	9,6 ± 0,80	69 ± 2,8
53	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	7,0 ± 0,28	4,2 ± 0,20	35 ± 1,0
54	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	8,4 ± 0,37	4,0 ± 0,36	35 ± 0,82
55		1,0 ± 0,24	1,3 ± 0,094	21 ± 0,64
56		0,94 ± 0,13	0,45 ± 0,13	11 ± 0,43
57		6,3 ± 0,38	2,3 ± 0,27	35 ± 1,3
58		7,2 ± 0,39	5,2 ± 0,22	63 ± 2,4
59		4,4 ± 0,49	1,6 ± 0,19	14 ± 0,54
60		2,1 ± 0,35	3,1 ± 0,31	44 ± 2,5
61		2,4 ± 0,25	1,1 ± 0,11	6,7 ± 0,20
62		0,98 ± 0,06	1,0 ± 0,043	7,8 ± 0,34
63		1,0 ± 0,33	0,95 ± 0,05	10 ± 0,22

<sup>a</sup> Los valores de  $K_i$  se muestran como la media ± EEM en  $\mu\text{M}$  basada en al menos cuatro mediciones independientes.

<sup>b</sup> NA: ninguna actividad.

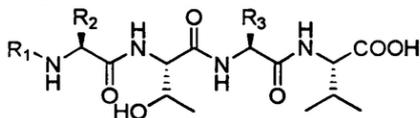
- 5 Por lo general, el incremento de la afinidad fue más pronunciado por PDZ2 que por PDZ1, y los compuestos 53 y 54 eran igual de potentes que el péptido NR2B (1) sobre PDZ2 y aproximadamente 2 veces más potentes sobre PDZ1. Además, también se incrementó la afinidad por PDZ3, aunque permanece una selectividad significativa por PDZ1 y PDZ2 (tabla 4). El incrementar todavía más el volumen y la hidrofobia de los sustituyentes *N*-alquilados, mediante la modificación de ETAV con metilén- y etilenciclohexano (55 y 56), produjo un incremento considerable de la afinidad.
- 10 En comparación con el punto de partida, el péptido de NR2B (1), los compuestos 55 y 56 muestran un incremento de aproximadamente 19 veces de la afinidad por PDZ1 y 56 muestra un incremento de 9 veces de la afinidad por PDZ2. Así pues, el derivado peptídico 56 es un inhibidor muy potente de la interacción de PSD-95/receptor de NMDA y un compuesto significativamente más potente que los descritos hasta la fecha.

- 15 A la vista de esta mejora de la afinidad, la atención se centró en las sustituciones con un grupo aromático, que los estudios de modelado sugieren que también mejorarían la afinidad en comparación con 40 y 51-54. Inicialmente, el pentapéptido FETAV (57) se preparó con una cadena lateral aromática en la posición  $P^4$ . El pentapéptido 57 incrementó 3 y 2 veces su afinidad por PDZ1 y PDZ2, respectivamente, en comparación con el péptido de NR2B (1), lo que confirma que es favorable un sustituyente aromático en  $P^4$ . Esto llevó a sintetizar derivados peptídicos, en donde el extremo amino de ETAV estaba alquilado con sustituyentes aromáticos como en los compuestos 58-63 (tabla 4). Los seis derivados peptídicos (58-63) tenían más afinidad que el péptido de NR2B (1) y que  $E_{Me}$ TAV (40).
- 20 La longitud del espaciador entre el grupo aromático y el grupo amino terminal es importante, y se observa un incremento gradual de la afinidad por PDZ1 cuando se extiende desde el espaciador metileno (58), etileno (59) al propileno (60), mientras que el espaciador de etileno (59) es el más potente en PDZ2 (tabla 4).

- A continuación se investigó el efecto de sustituir el anillo aromático; la sustitución con dos átomos de cloro (61) incrementó la afinidad en comparación con 59 tanto por PDZ1 como por PDZ2. El reemplazo del cloro por flúor (62) incrementó la afinidad todavía más, y 62 mostró valores de  $K_i$  de alrededor de 1  $\mu\text{M}$  por PDZ1 y PDZ2, lo que es casi igual de potente que el derivado de etilenciclohexano 56. Así pues, cambiar las propiedades electrónicas del anillo aromático afecta a la afinidad, que ya lo sugieren los estudios de modelado, lo que se debe a la interacción del grupo aromático con la His130 de PDZ1. El acoplamiento de los compuestos 59 y 61-62 en el modelo por homología de PDZ1 sugiere un apilamiento perpendicular entre el grupo aromático de los péptidos y la His130. El incrementar aún más el volumen del grupo aromático a un resto de naftalén-2-ilo (63) dio lugar a un compuesto igual de potente que 62. Para todos los compuestos, se observó un considerable incremento de la afinidad por PDZ3. Sin embargo, se conserva una selectividad significativa y, para el inhibidor más potente, el compuesto (56), se observa una selectividad de 10 y 20 veces por PDZ1 y PDZ2 respecto a PDZ3 (tabla 3). En resumen, mediante el diseño racional guiado por las técnicas de acoplamiento molecular fue posible optimizar el grupo alquilo utilizado para *N*-alquilar los tetrapéptidos, mediante lo cual se generaron ligandos sorprendentemente potentes por los dominios PDZ1 y PDZ2 de PSD-95.
- 15 Ejemplo 7. Sustitución de los aminoácidos en la posición  $P^{-1}$  y  $P^{-3}$  de los ligandos tetrapeptídicos alquilados para obtener un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención.

- Se estudiaron los tetrapéptidos y los tetrapéptidos alquilados en los cuales el aminoácido en  $P^{-3}$  era E, Q o bien A, y el aminoácido en  $P^{-1}$  era D o bien A, para determinar si los aminoácidos con una carga y/o hidrofobia menor se podían combinar en el tetrapéptido alquilado YTXV, y si la alquilación compensaría cualquier posible reducción de la afinidad debido a estas sustituciones aminoacídicas (tabla 5). Tal y como se observa en la tabla 5, es posible sustituir el Glu en  $P^{-3}$  y el Asp en  $P^{-1}$  cargados negativamente en el tetrapéptido *N*-alquilado por aminoácidos neutros o incluso hidrófobos, tales como Gln y Ala, incluso en combinación, y mantener una afinidad por los dominios PDZ1 y 2 cercana a la del péptido de control (1). Esto es un hallazgo importante ya que la membrana celular es más permeable a los tetrapéptidos menos cargados y menos hidrófilos, lo que mejorará su captación por una célula.

- 25 Tabla 5. Valores de  $K_i$  de los péptidos modificados con la estructura general:<sup>a</sup>

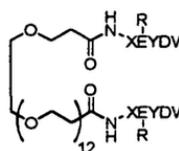


Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	PDZ1	PDZ2	PDZ3
NR2B (1)	-	-	-	18 ± 0,92	4,1 ± 0,17	NA <sup>b</sup>
CRIP (2)	-	-	-	97 ± 18	25 ± 1,6	2,1 ± 0,2
ETDV (64)	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	CH <sub>2</sub> COOH	22 ± 0,95	16 ± 0,88	NA <sup>b</sup>
QTDV (65)	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOH	58 ± 3,5	60 ± 1,9	NA <sup>b</sup>
ATDV (66)	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> COOH	30 ± 0,72	38 ± 4,2	NA <sup>b</sup>
ETAV (51)	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	CH <sub>3</sub>	29 ± 1,6	22 ± 0,92	260 ± 20
QTAV (67)	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	112 ± 4,4	108 ± 6,3	> 400
ATAV (68)	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	64 ± 1,7	73 ± 3,8	400
ETDV (69)	Ciclohexiletilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	CH <sub>2</sub> COOH	1,8 ± 0,23	0,75 ± 0,1	NA <sup>b</sup>
QTDV (70)	Ciclohexiletilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> COOH	6,2 ± 0,93	4,4 ± 0,59	NA <sup>b</sup>
ATDV (71)	Ciclohexiletilo	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> COOH	5,8 ± 0,33	3,6 ± 0,30	> 400
ETAV (56)	Ciclohexiletilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	CH <sub>3</sub>	0,94 ± 0,1	0,45 ± 0,1	11 ± 0,43
QTAV (72)	Ciclohexiletilo	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	21 ± 1,1	12 ± 0,36	141 ± 14
ATAV (73)	Ciclohexiletilo	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	8,9 ± 1,0	8,1 ± 0,12	89 ± 3,3

<sup>a</sup> Los valores de  $K_i$  se muestran como la media ± EEM en  $\mu\text{M}$  basada en al menos tres mediciones independientes. <sup>b</sup> NA: ninguna afinidad.

Ejemplo 8. Mejora de la afinidad por PDZ1-2 al conectar los ligandos peptídicos modificados con un conector de PEG, mediante lo cual se incrementa la afinidad por este motivo PDZ, pero no los dominios PDZ por separado.

- La dimerización de los ligandos peptídicos modificados de la invención con un conector de PEG proporciona un inhibidor de NMDAR/PSD-95 con varias ventajas farmacocinéticas. El PEG (polietilenglicol) se selecciona para hacer de conector porque es una sustancia química atóxica y cuando se une a los ligandos peptídicos modificados servirá para disminuir su eliminación por el riñón, para proporcionar protección contra la escisión enzimática, para reducir la inmunogenia y para mejorar su solubilidad y su permeabilidad en la membrana celular. Además, estos ligandos diméricos, unidos por PEG, se ha demostrado que han incrementado enormemente la afinidad por PDZ1-2 de la PSD-95. Inicialmente, esto se demuestra mediante el uso de moléculas de PEG para unir químicamente dos ligandos peptídicos idénticos (IESDV) como en el compuesto 74 o el pentapéptido alquilado GE(R)TDV (R = ciclohexiletilo; N-alquilado en P<sup>3</sup>) como en el compuesto 75 (véanse las estructuras en la figura 7). En estos dos ejemplos se observa un incremento considerable en la afinidad por la construcción en tándem PDZ1-2 (véase la figura 8 y los valores de  $K_i$  de la tabla 6), lo que refleja el efecto sinérgico que se obtiene al conectar dos ligandos juntos.
- 15 Tabla 7. Valores de  $K_i$  para los ligandos peptídicos diméricos medidos mediante FP<sup>a</sup>.



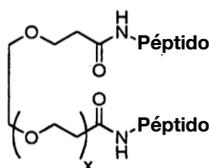
Compuesto	R, X, Y	PDZ1	PDZ2	PDZ1-2	PDZ3
NR2B (1)	-	18 ± 0,92	4,1 ± 0,17	6,8 ± 0,20	NA <sup>b</sup>
(IESDV) <sub>2</sub> -PEG12 (74)	R = H X = Ile Y = Ser	22 ± 1,4	2,8 ± 0,32	~ 0,1 <sup>c</sup>	NA <sup>b</sup>
(GE[R]TDV) <sub>2</sub> -PEG12 (75)	R = Ciclohexiletilo X = Gly Y = Thr	83 ± 6,2	55 ± 2,1	5,5 ± 0,46	NA <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Los valores de  $K_i$  se muestran como la media ± EEM en  $\mu\text{M}$  basada en al menos tres mediciones independientes. <sup>b</sup> NA: ninguna afinidad. <sup>c</sup> Debido a la muy baja afinidad de este ligando, no se puede calcular un valor exacto de  $K_i$  en el ensayo de FP (véase el texto).

- 20 No se pudo calcular un valor exacto de  $K_i$  para 74 con el ensayo de FP debido a que su  $K_i$  era muy baja. Sin embargo, se halló que la  $K_i$  era de aproximadamente 100 nM en un ensayo de titulación de fluorescencia (ensayo de fijación de flujo detenido<sup>25</sup>).

- 25 Para optimizar la longitud del conector de PEG, se dimerizó adicionalmente el IESDV con un conector que comprende PEG8-, 6-, 4-, 2-, 1- o 0-diácidos (76-81) y se comprobó por FP e ITC. Se halló que el intervalo de tamaño óptimo del conector se encuentra de PEG4 a PEG6 (en donde PEG 4 (78) tiene una  $K_d$  = 32 nM por PDZ1-2) y que el acortamiento adicional del conector daba lugar a una afinidad más baja (figura 9, tabla 8). También se observó que el ligando dimérico y PDZ1-2 se fijan en una proporción 1:1 como era de esperar.

Tabla 8. Mediciones de FP e ITC para los ligandos peptídicos diméricos con la estructura general:



Compuesto	Péptido	X	FP ( $K_i/\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>		ITC ( $K_d/\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	
			PDZ2	PDZ12	PDZ2	PDZ12
7	IESDV	Monomérico	3,1 ± 0,15	3,9 ± 0,12	2,6 ± 0,19	3,2 ± 0,16
8	ESDV	Monomérico	28 ± 0,92	28 ± 2,9	ND	ND
82	IETAV	Monomérico	1,7 ± 0,2	2,5 ± 0,13	ND	1,9 ± 0,11
86	IATAV	Monomérico	16 ± 0,33	18 ± 0,47	ND	ND
89	IATA <sub>Me</sub> V	Monomérico	104 ± 9	142 ± 5	ND	ND
74	IESDV	12	3,1 ± 0,13	~ 0,1 <sup>b</sup>	ND <sup>c</sup>	0,09± 0,014
76	IESDV	8	2,6 ± 0,13	~ 0,1 <sup>b</sup>	ND	0,12± 0,027
77	IESDV	6	2,0 ± 0,02	~ 0,1 <sup>b</sup>	ND	0,039± 0,01
78	IESDV	4	2,7 ± 0,12	~ 0,1 <sup>b</sup>	3,3 ± 0,02	0,032± 0,01
79	IESDV	2	4,7 ± 0,21	0,27± 0,03	ND	0,22± 0,01
80	IESDV	1	4,7 ± 0,16	0,56± 0,06	ND	0,46± 0,02
81	IESDV	0	3,1 ± 0,17	1,5 ± 0,09	ND	1,1 ± 0,09
83	IETAV	4	1,1 ± 0,07	~ 0,1 <sup>b</sup>	ND	0,011± 0,01
84	ESDV	12	22 ± 0,18	0,92± 0,03	ND	ND
85	ESDV	8	19 ± 1,2	1,0 ± 0,05	ND	ND
87	IATAV	12	13 ± 1,1	1,0 ± 0,06	ND	ND
88	IATAV	4	25 ± 0,88	1,1 ± 0,07	ND	ND
90	IATA <sub>Me</sub> V	4	103 ± 1,1	13 ± 0,6	ND	ND

<sup>a</sup> Los valores de  $K_d/K_i$  se muestran como la media ± EEM basada en al menos tres mediciones independientes. <sup>b</sup> Debido a la muy baja afinidad de este ligando, no se puede calcular un valor exacto de  $K_i$  en el ensayo de FP (véase el texto). <sup>c</sup> ND: no determinado.

La potencia del ligando se mejoró adicionalmente mediante la combinación del conector de PEG4 con una secuencia peptídica optimizada, por ejemplo el ligando ((IETAV)<sub>2</sub>PEG4, 83) que tiene una  $K_d = 11$  nM por PDZ1-2 de PSD-95. La afinidad de fijación excepcionalmente fuerte de este ligando (estructura en la figura 10) por la construcción en tándem de PDZ1-2 se consiguió sin comprometer su afinidad por los dominios PDZ1 y PDZ2 por separado. En comparación con el ligando monomérico IETAV (82), la dimerización incrementó la afinidad del ligando en 176 veces (figura 9, tabla 8). En comparación con el candidato clínico Tat-NR2B (3, tabla 1), 83 tiene una afinidad aproximadamente 1000 veces mayor por PDZ1-2 de PSD-95, con lo que se demuestra que 83 tiene la afinidad necesaria para un candidato farmacológico fuerte (tabla 8).

Ya que la dimerización mejora la afinidad de fijación de un ligando por PDZ1-2, también se puede utilizar para transformar los ligandos de PDZ1/PDZ2 de baja afinidad en ligandos de PDZ1-2 de alta afinidad. Como consecuencia, los péptidos más pequeños (p. ej., ESDV), hidrófobos y más permeables a las células (p. ej., IATAV e IATA<sub>Me</sub>V) y los péptidos proteolíticamente estables (p. ej., IATA<sub>Me</sub>V) se pueden dimerizar para proporcionar ligandos potentes en los que se conservan sus respectivas propiedades beneficiosas (tabla 8).

En conclusión, la conexión dimerizadora de los ligandos peptídicos (*N*-alquilados o no) con moléculas de PEG facilita la fijación simultánea del ligando a PDZ1 y 2 de PSD-95, por lo que se incrementa la afinidad de fijación. Con lo cual, se obtiene un ligando potente, específico del motivo proteico PDZ1-2, que incrementa su selectividad por PSD-95, junto con una mejora de las propiedades farmacocinéticas.

Ejemplo 9. La dimerización de los ligandos peptídicos mediante PEG conduce a la estabilidad plasmática en la sangre humana.

La estabilidad es una preocupación general en relación con los fármacos de naturaleza peptídica, ya que las proteasas de la sangre humana facilitan la degradación de los péptidos. Por consiguiente, la estabilidad dependiente del tiempo que presentan los compuestos clave se analizó en un ensayo de estabilidad en el plasma sanguíneo humano. Los péptidos monoméricos se degradaron relativamente rápido (los compuestos 7, 29, 82 y 86 tenían una semivida de aproximadamente 17 a 55 minutos; tabla 9), pero la dimerización con PEG de estos ligandos peptídicos produce compuestos muy estables en el plasma (83, 87, 88) y en algunos casos (74, 76-78, 90) se consiguió una resistencia completa frente a la degradación, ya que no se pudo detectar ninguna degradación significativa durante un periodo de tiempo de 6 días (tabla 9 y figura 11). Tanto para los ligandos monoméricos como para los diméricos, se observa que la secuencia peptídica IESDV es más estable que IETAV e IATAV, y que la *N*-metilación de P<sup>-1</sup> incrementa la estabilidad, ya que el IATA<sub>Me</sub>V muestra una semivida más larga que el IATAV (tabla 9). Finalmente, se observa que los compuestos diméricos, 74-76-78 y 90 muestran una semivida más larga en comparación con el candidato clínico Tat-N2B (3) (tabla 9 y figura 11).

15 Tabla 9. Semivida en el plasma sanguíneo ( $T_{1/2}$ ) de los compuestos clave

Compuesto	$T_{1/2}$ (minutos)
Tat-N2B (3)	1468
IESDV (7)	53
IETAV (82)	50
IATAV (86)	17
IATA <sub>Me</sub> V (89)	32
(IESDV) <sub>2</sub> PEG12 (74)	> 8000
(IESDV) <sub>2</sub> PEG8 (76)	> 8000
(IESDV) <sub>2</sub> PEG6 (77)	> 8000
(IESDV) <sub>2</sub> PEG4 (78)	> 8000
(IETAV) <sub>2</sub> PEG4 (83)	409
(IATAV) <sub>2</sub> PEG12 (87)	183
(IATAV) <sub>2</sub> PEG4 (88)	123
(IATA <sub>Me</sub> V) <sub>2</sub> PEG4 (90)	> 8000
IESDV-PEG4 (91)	602

El ligando monomérico PEGilado (91) también muestra un incremento de la semivida (aproximadamente 10 veces) en comparación con el péptido 7 sin PEGilar (tabla 9), con lo que el conector de PEG es de importancia fundamental para este efecto. Sin embargo, 91 no es completamente resistente al tratamiento plasmático, como se observa para los ligandos diméricos de IESDV (74, 76-78; tabla 9), por lo que tener dos ligandos peptídicos en una molécula contribuye a mejorar la estabilidad en el plasma sanguíneo.

Ejemplo 10. Análisis del efecto neuroprotector de un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención sobre las neuronas de mamífero *ex vivo*.

Para evaluar el potencial terapéutico de los ligandos diméricos y de los tetrapéptidos *N*-alquilados, los compuestos clave de cada serie se analizaron en un ensayo *ex vivo* con células neuronales. Este ensayo evalúa la permeabilidad de la membrana junto con la especificidad del compuesto y su capacidad para atenuar la excitotoxicidad inducida por el NMDA. Por lo tanto, este ensayo constituye un modelo directo de la patología de, p. ej., el accidente cerebrovascular o de las lesiones traumáticas del cerebro, y mide las propiedades importantes del compuesto. Estos experimentos muestran que los tetrapéptidos *N*-alquilados (56, 63 y 73) y los ligandos diméricos (74), a una concentración de 500 nM, fueron capaces de atravesar la membrana plasmática neuronal e inhibir la excitotoxicidad neuronal, de una forma igual de eficiente que el candidato clínico Tat-N2B (3) (figura 12).

Ejemplo 11. Prevención de la activación de nNOS provocada por el NMDA.

El NMDA provoca cambios en la concentración de GMPc en las neuronas, lo que proporciona una medida sustitutiva de la producción de NO por la nNOS. Se preparan muestras de las neuronas corticales, cultivadas e incubadas según se describió previamente. A continuación se mide la concentración de GMPc en las muestras de neuronas, lo que proporciona una medida sustitutiva de la prevención de la activación de NOS debida al inhibidor de

NMDAR/PSD-95 de la invención.

Ejemplo 12. Análisis de la permeabilidad en la membrana de las células de mamífero que presenta un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención.

- Se utiliza un ensayo de BRET<sup>2</sup> para analizar la capacidad que tiene un inhibidor de NMDAR/PSD-95 para penetrar en las células de mamífero. En consecuencia, se inocularon 0,5 millones de células COS-7 por pocillo en una placa de 6 pocillos (por duplicado) y se hicieron crecer en suero de ternera fetal al 10%/medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y se transfectaron con 3,7 µg de cada construcción de ADN por pocillo con un reactivo de transfección de COS7 (Altogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las construcciones de ADN para la transfección comprenden una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión denominada como sigue:
- 5    ADN de GFP-NR2B [SEQ ID n.º 9] que codifica la proteína GFP-NR2B [SEQ ID n.º 10];  
 ADN de GFP-NR2B AA [SEQ ID n.º 11] que codifica la proteína GFP-NR2B AA [SEQ ID n.º 12]  
 ADN de GFP-PDZ2 [SEQ ID n.º 13] que codifica la proteína GFP-PDZ2 [SEQ ID n.º 14]  
 ADN de PDZ2-GFP [SEQ ID n.º 15] que codifica la proteína PDZ2-GFP [SEQ ID n.º 16]  
 ADN de Rluc-NR2B [SEQ ID n.º 17] que codifica la proteína Rluc-NR2B [SEQ ID n.º 18]
- 15   ADN de Rluc-NR2B AA [SEQ ID n.º 19] que codifica la proteína Rluc-NR2B AA [SEQ ID n.º 20]  
 ADN de Rluc-PDZ2 [SEQ ID n.º 21] que codifica la proteína Rluc-PDZ2 [SEQ ID n.º 22]  
 ADN de PDZ2-Rluc [SEQ ID n.º 23] que codifica la proteína PDZ2-Rluc [SEQ ID n.º 24],  
 cada una de las cuales está clonada individualmente en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen).

Las células de cada pocillo se transfectan con una pareja de vectores, que codifican una de las siguientes parejas alternativas de proteínas de fusión:

- GFP-NR2B de tipo silvestre o GFP-NR2B AA mutante con Rluc-PDZ2 o PDZ2-Rluc;
- Rluc-NR2B de tipo silvestre o Rluc-NR2B AA mutante con GFP-PDZ2 o PDZ2-GFP;

La cantidad total del ADN a transfectar se mantiene constante por la adición del vector vacío pcDNA3.1 (Invitrogen). A continuación, las células se incuban durante 2 días, periodo durante el cual las muestras de un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención se añaden a los pocillos en placas por duplicado, a una concentración final de al menos 1 µM, más de 1 µM, o entre 5 µM y 1,0 mM. Las construcciones que codifican la fusión con el mutante NR2B AA se incluyen como controles, ya que el mutante es incapaz de fijarse a un dominio PDZ de PSD-95.

Al cabo de 2 días, las células se lavan, se desprenden y se resuspenden en 666 µl PBS a 1× (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada, ajustado a pH 7,4 con HCl). A continuación, las células se dividen en dos porciones en placas de 96 pocillos (1,5 × 10<sup>6</sup> células/pocillo):

La primera porción (en placas negras) se utiliza para determinar la cantidad de GFP y el nivel de expresión de RLUC con un lector de placas Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Se realiza la excitación fluorescente a 425/20 nm y la emisión se mide a 530/10 nm. Se analiza la luminiscencia mediante la adición de celenterazina h (Biotium Inc., Hayward CA, EE. UU.) a una concentración final de 5 µM. Se le sustraen los valores de fondo obtenidos con las células transfectadas sólo con el vector vacío pcDNA3.1 y se calcula la luminiscencia media de los pocillos por triplicado/muestra.

La segunda porción de las células (en placas blancas) se somete a excitación con DeepBlueC (celenterazina 400a; Biotium Inc., Hayward CA, EE. UU.) a una concentración final de 5 µM y la luminiscencia se mide en las bandas dobles (515/30 nm y 410/80) en el lector de placas Mithras LB 940. Se obtienen los valores de fondo con las células transfectadas solo con el vector vacío pcDNA3.1, y se calculan las medias de los pocillos por triplicado/muestra. Las proporciones de BRET se calculan como (emisión 515 nm – fondo 515 nm) / (emisión 410 nm – fondo 410 nm).

La señal de fondo de RLUC se determina mediante la coexpresión de la construcción de Rluc con el vector vacío y la proporción de BRET<sup>2</sup> generada de esta transfección se sustrae de todas las otras proporciones de BRET<sup>2</sup>.

Para los experimentos de saturación de BRET<sup>2</sup>, se hace un abanico de transfecciones con una cantidad estable de ADNc de PDZ2-RLUC y cantidades crecientes de ADNc que codifica la proteína GFP-NR2B. Todas las mediciones se realizan a temperatura ambiente.

Ejemplo 13. Los inhibidores de NMDAR/PSD-95 de la invención tienen un efecto neuroprotector *in vivo* contra el daño por accidente cerebrovascular en los mamíferos.

A. Neuroprotección contra el daño por accidente cerebrovascular mediante el tratamiento previo con inhibidores de NMDAR/PSD-95.

5 Las ratas Sprague-Dawley macho adultas se someten a una oclusión transitoria de la arteria cerebral media (OACM) durante aproximadamente 90 minutos mediante el procedimiento de sutura intraluminal, tal y como se presenta en (29). Los sujetos animales se tratan previamente con una sola inyección intravenosa en embolada con solución salina sola (control), solución salina complementada con el péptido NR2B o bien con un inhibidor de NMDAR/PSD-95 de la invención a una concentración final de 3 nM/g de masa corporal, 45 minutos antes de la OACM. En los sujetos animales se monitorizan y se mantienen la temperatura corporal, la tensión arterial y los gases sanguíneos. La extensión del infarto cerebral se mide transcurridas aproximadamente 24 horas después del comienzo de la OACM. Las pruebas incluyen la prueba del reflejo postural y la prueba de colocación de la extremidad anterior para establecer el grado de la funcionamiento neurológico de los sujetos animales durante y después de la OACM.

B. Atenuación del daño por accidente cerebrovascular mediante el tratamiento posterior con los inhibidores de NMDAR/PSD-95

15 Las ratas Sprague-Dawley macho adultas se someten a una OACM transitoria tal y como se describe más arriba (A), pero la única inyección intravenosa en embolada con solución salina sola o complementada con el péptido de NR2B o bien con un inhibidor de NMDAR/PSD-95 se administra primero una hora después del comienzo de la OACM. A continuación, los sujetos animales se monitorizan durante el periodo de 24 horas después del comienzo de la OACM, tal y como se describe más arriba.

## Referencias

1. Aarts, M.; Liu, Y.; Liu, L.; Besshoh, S.; Arundine, M.; Gurd, J. W.; Wang, Y. T.; Salter, M. W.; Tymianski, M. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. *Science* **2002**, *298*, 846-850.
2. Aarts, M. M.; Tymianski, M. Novel treatment of excitotoxicity: targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 877-886.
3. Cui, H.; Hayashi, A.; Sun, H. S.; Belmares, M. P.; Cobey, C.; Phan, T.; Schweizer, J.; Salter, M. W.; Wang, Y. T.; Tasker, R. A.; Garman, D.; Rabinowitz, J.; Lu, P. S.; Tymianski, M. PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors. *J. Neurosci* **2007**, *27*, 9901-15.
4. Thomson Current Drugs (<http://www.thomson.com>).
5. Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P. P.; Krajewski, K.; Saito, N. G.; Stuckey, J. A.; Wang, S. Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261-273.

6. Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Mui, C. 2- and 4-nitrobenzenesulfonamides: Exceptionally Versatile Means for Preparation of Secondary Amines and Protection of Amines. *Tetrahedron Lett* **1995**, *36*, 6373-6374.
7. Yang, L.; Chiu, K. Solid Phase Synthesis of Fmoc N-Methyl Amino Acids: Application of the Fukuyama Amine Synthesis. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 7307-7310.
8. Paduch, M.; Biernat, M.; Stefanowicz, P.; Derewenda, Z. S.; Szewczuk, Z.; Otlewski, J. Bivalent peptides as models for multimeric targets of PDZ domains. *Chembiochem*. **2007**, *8*, 443-452.
9. Niethammer, M.; Valtschanoff, J. G.; Kapoor, T. M.; Allison, D. W.; Weinberg, R. J.; Craig, A. M.; Sheng, M. CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* **1998**, *20*, 693-707.
10. Doyle, D. A.; Lee, A.; Lewis, J.; Kim, E.; Sheng, M.; MacKinnon, R. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **1996**, *85*, 1067-1076.
11. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web <http://www.pymol.org>
12. Lim, I. A.; Hall, D. D.; Hell, J. W. Selectivity and promiscuity of the first and second PDZ domains of PSD-95 and synapse-associated protein 102. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21697-21711.
13. Chi, C. N.; Gianni, S.; Calosci, N.; Travaglini-Allocatelli, C.; Engström, K.; Jemth, P. A conserved folding mechanism for PDZ domains. *FEBS Lett* **2007**, *581*, 1109-13.
14. Gianni, S.; Engström, A.; Larsson, M.; Calosci, N.; Malatesta, F.; Eklund, L.; Ngang, C. C.; Travaglini-Allocatelli, C.; Jemth, P. The kinetics of PDZ domain-ligand interactions and implications for the binding mechanism. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34805-12.
15. Stiffler, M. A.; Chen, J. R.; Grantcharova, V. P.; Lei, Y.; Fuchs, D.; Allen, J. E.; Zaslavskaja, L. A.; MacBeath, G. PDZ domain binding

- selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science* **2007**, *317*, 364-9.
16. Saro, D.; Li, T.; Rupasinghe, C.; Paredes, A.; Caspers, N.; Spaller, M. R. A thermodynamic ligand binding study of the third PDZ domain (PDZ3) from the mammalian neuronal protein PSD-95. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6340-52.
  17. Harris, B. Z.; Lau, F. W.; Fujii, N.; Guy, R. K.; Lim, W. A. Role of electrostatic interactions in PDZ domain ligand recognition. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2797-805.
  18. Hruby, V. J. Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 847-858.
  19. Clemons, P. A. Design and discovery of protein dimerizers. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 112-5.
  20. Hopfner, K. P.; Ayala, Y.; Szewczuk, Z.; Konishi, Y.; Di Cera, E. Chemical compensation in macromolecular bridge-binding to thrombin. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2947-53.
  21. Szewczuk, Z.; Gibbs, B. F.; Yue, S. Y.; Purisima, E.; Zdanov, A.; Cygler, M.; Konishi, Y. Design of a linker for trivalent thrombin inhibitors: interaction of the main chain of the linker with thrombin. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3396-404.
  22. Harris, J. M.; Martin, N. E.; Modi, M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **2001**, *40*, 539-51.
  23. Long, J. F.; Tochio, H.; Wang, P.; Fan, J. S.; Sala, C.; Niethammer, M.; Sheng, M.; Zhang, M. Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 203-214.
  24. Wen, W.; Wang, W.; Zhang, M. Targeting PDZ domain proteins for treating NMDA receptor-mediated excitotoxicity. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 711-721.
  25. Chi, C. N.; Engström, A.; Gianni, S.; Larsson, M.; Jemth, P. Two conserved residues govern the salt and pH dependencies of the binding reaction of a PDZ domain. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36811-8.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Universidad de Copenhagen

<120> Péptidos modificados como inhibidores potentes de la interacción entre el receptor de NMDA/PSD-95

<130> P80827341EP00

5 <160> 24

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 310

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (306)

<223> ADN de HIS-PDZ1

15 <400> 1

atg cac cac cac cac cac ccg cgc gga tcc atg gaa tac gag gaa atc	48
Met His His His His His Pro Arg Gly Ser Met Glu Tyr Glu Glu Ile	
1 5 10 15	
aca ttg gaa agg ggt aac tca ggt ctg ggc ttc agc atc gca ggt ggc	96
Thr Leu Glu Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly	
20 25 30	
act gac aac cca cac atc ggt gac gac cca tcc att ttc atc acc aag	144
Thr Asp Asn Pro His Ile Gly Asp Asp Pro Ser Ile Phe Ile Thr Lys	
35 40 45	
atc att cct ggt ggg gct gcg gcc cag gat ggc cgc ctc agg gtc aac	192
Ile Ile Pro Gly Gly Ala Ala Ala Gln Asp Gly Arg Leu Arg Val Asn	
50 55 60	
gac agc atc ctg ttt gta aat gaa gtg gac gtg cgc gag gtg acc cac	240
Asp Ser Ile Leu Phe Val Asn Glu Val Asp Val Arg Glu Val Thr His	
65 70 75 80	
tca gcg gcg gtg gaa gcc ctc aaa gag gca ggc tcc atc gtt cgc ctc	288
Ser Ala Ala Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ser Ile Val Arg Leu	
85 90 95	
tat gtc atg cgc cgg tga attc	310
Tyr Val Met Arg Arg	
100	

<210> 2

<211> 101

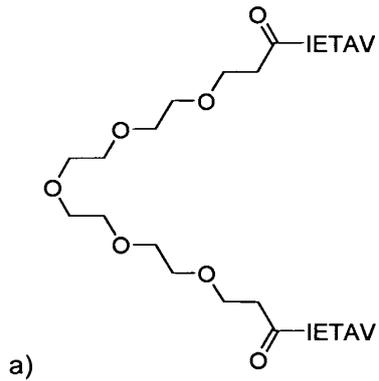
<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

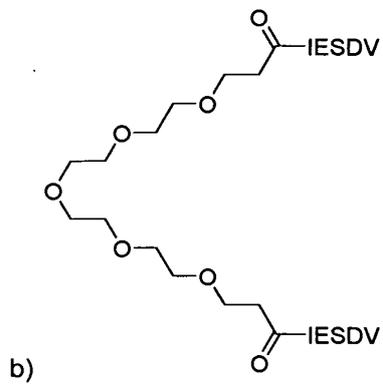
<400> 2

## REIVINDICACIONES

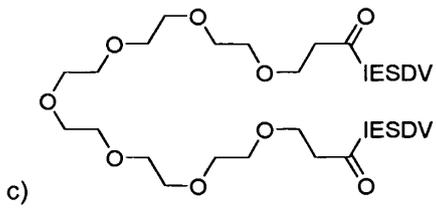
1. Compuesto que comprende un primer péptido o análogo peptídico conectado a un segundo péptido o análogo peptídico mediante un conector, en donde el primer y el segundo péptido o análogo peptídico comprende al menos cuatro restos unidos por amida que tienen una secuencia YTXV o YSXV, en donde
  - 5 a. Y se selecciona de entre E, Q y A, y
  - b. X se selecciona de entre A, Q, D, N, *N*-Me-A, *N*-Me-Q, *N*-Me-D y *N*-Me-N.
2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido o análogo peptídico está *N*-alquilado en la posición P<sup>-3</sup> de la secuencia.
3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1-2, en donde el conector es un conector de PEG que
  - 10 comprende de 1 a 28 restos (N = 1-28) de etilenglicol.
  4. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el conector de PEG comprende de 1 a 12 restos (N = 1-12) de etilenglicol.
  5. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el péptido o análogo peptídico es de 4 a 10 restos de longitud unidos por amida.
- 15 6. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el péptido comprende al menos 4 restos aminoácidos L.
  7. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde X se selecciona de entre A, Q y D.
  8. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde el péptido o análogo peptídico
    - 20 está *N*-alquilado con un sustituyente de ciclohexano, y además comprende un grupo espaciador entre el sustituyente y el grupo amino terminal del péptido o análogo peptídico, en donde el espaciador es un grupo alquilo, preferiblemente seleccionado de entre metileno, etileno, propileno y butileno.
    9. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde el péptido o análogo peptídico está *N*-alquilado con un sustituyente aromático, y además comprende un grupo espaciador entre el sustituyente y el
      - 25 grupo amino terminal del péptido, en donde el espaciador es un grupo alquilo, preferiblemente seleccionado de entre metileno, etileno, propileno y butileno.
      10. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el sustituyente aromático es un resto naftalén-2-ilo.
      11. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde el sustituyente aromático es un anillo aromático sustituido con uno o dos halógenos y/o grupos alquilo.
  - 30 12. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el péptido o análogo peptídico está unido covalentemente a una poliamina o a una diamina.
    13. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



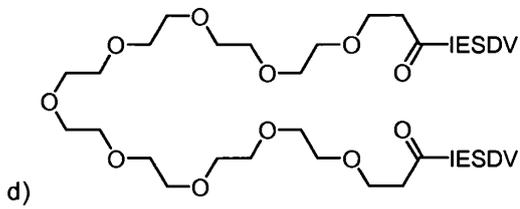
(83)



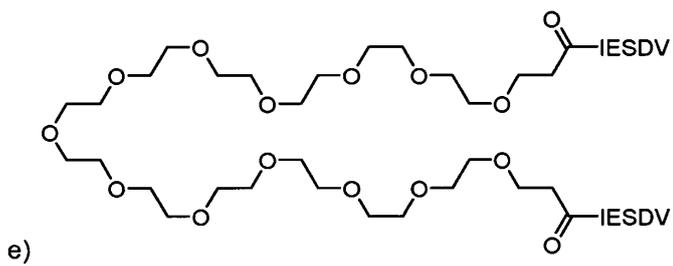
(78)



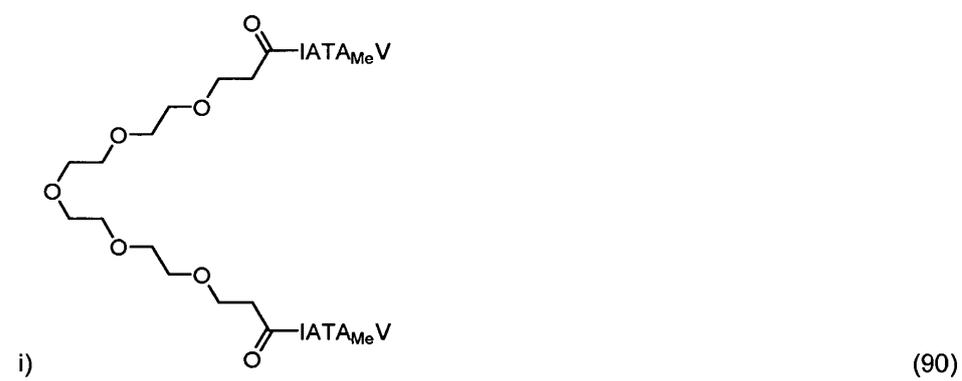
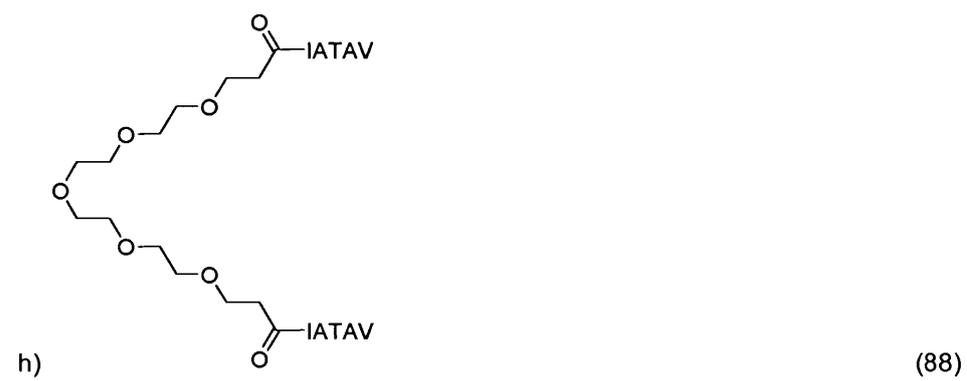
(77)

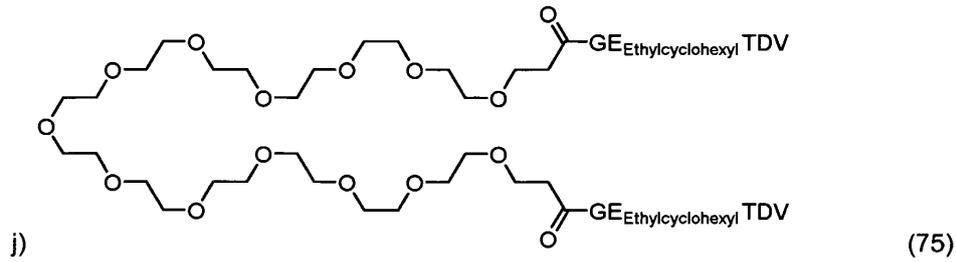


(76)



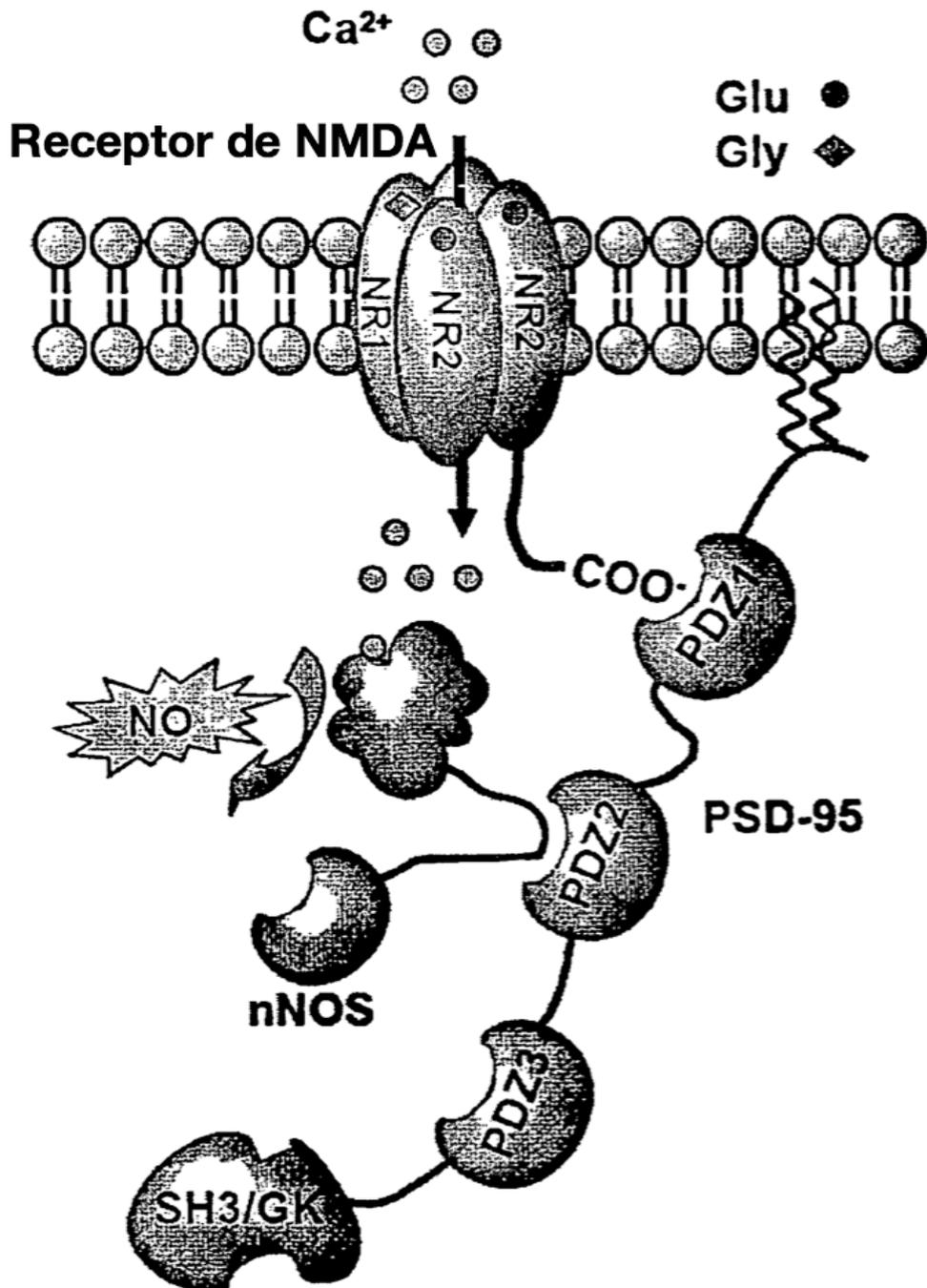
(74)



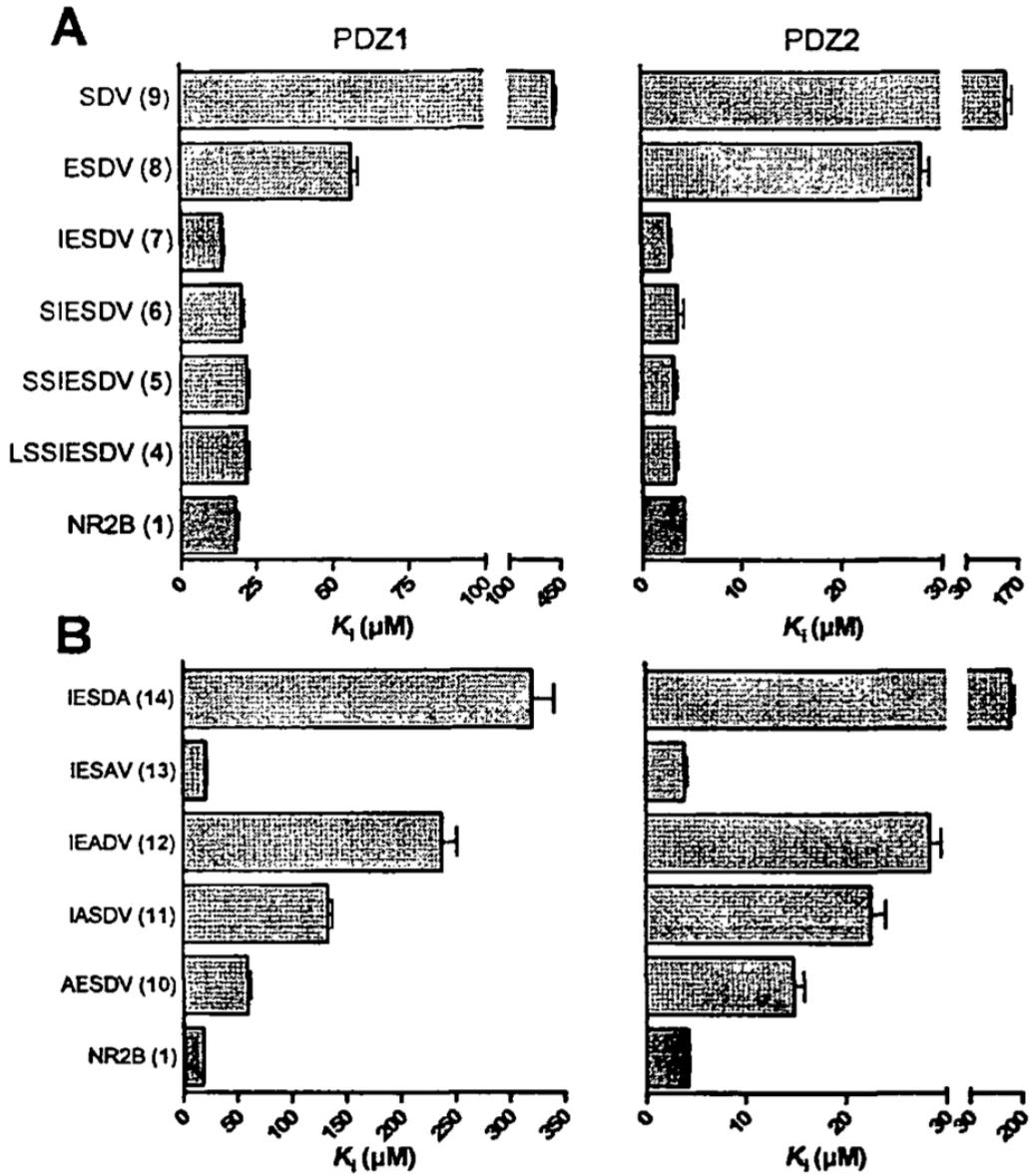


14. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para ser usada como un medicamento.
15. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para ser usada en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad relacionada con excitotoxicidad en un sujeto, en donde el trastorno excitotóxico se selecciona del grupo que consiste en accidente cerebrovascular, lesión encefálica traumática, lesión isquémica o traumática del sistema nervioso central (SNC), lesión de la médula espinal, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas del SNC.
16. Kit que comprende la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, que además comprende medios para administrar dicha composición a un sujeto.

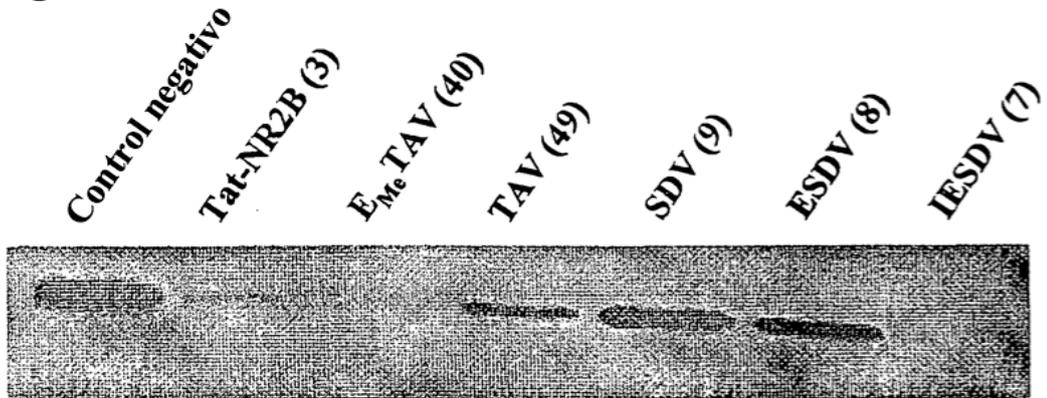
Figura 1



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

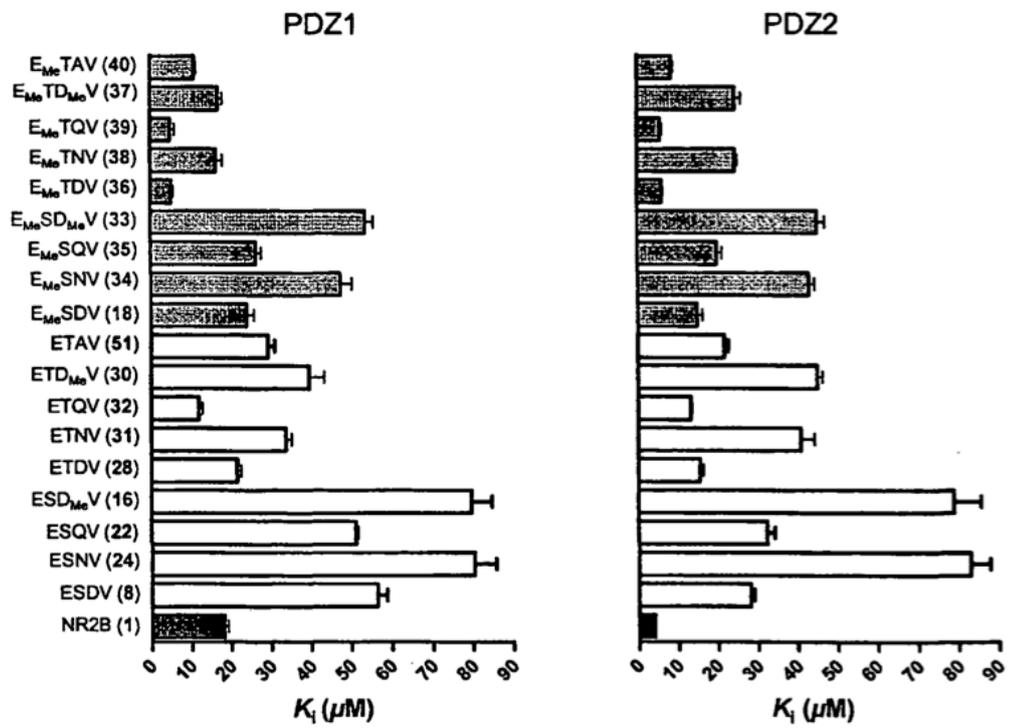
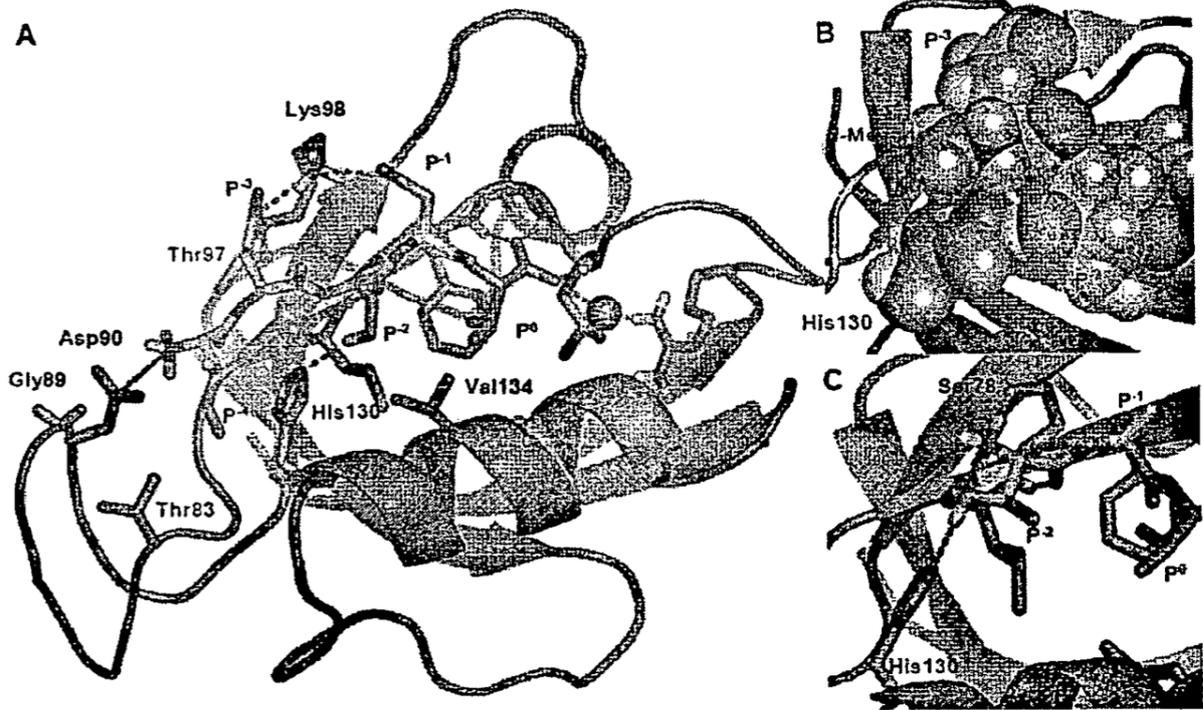
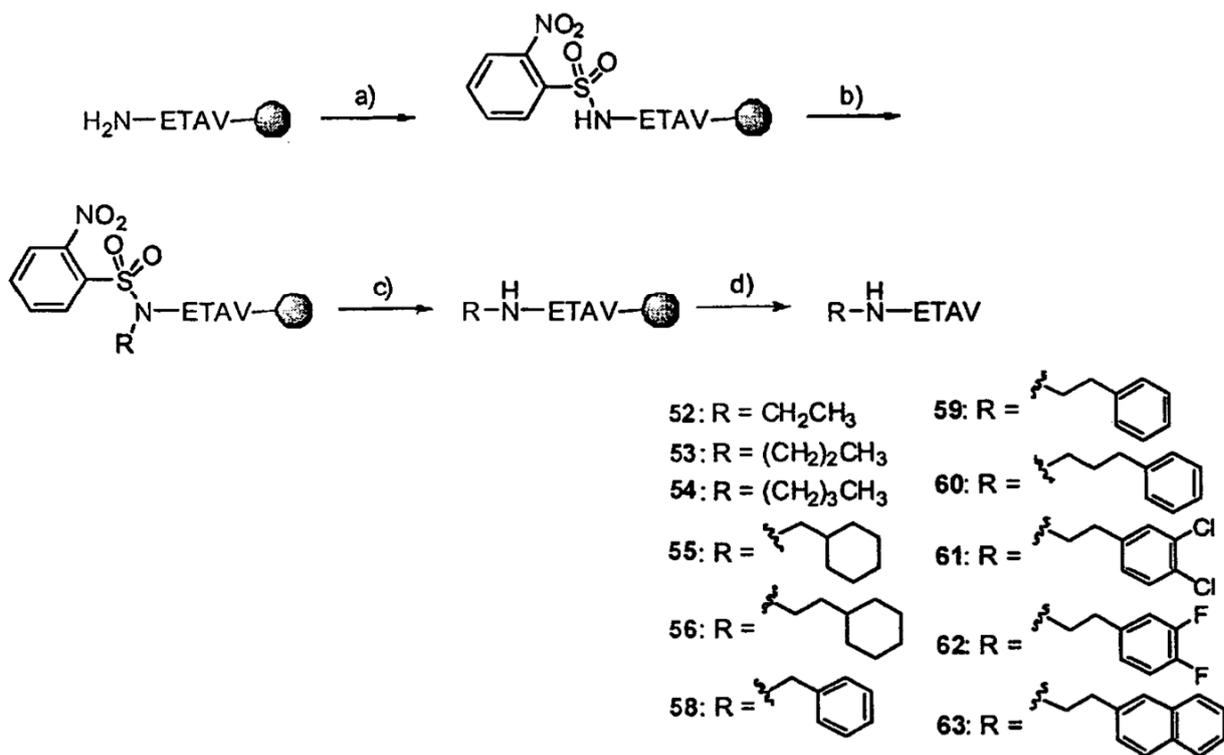


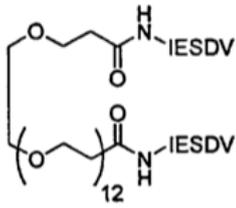
Figura 5



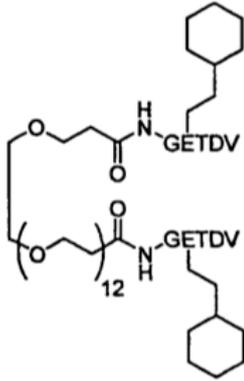
## Figura 6

Esquema 1<sup>a</sup>

**Figura 7**

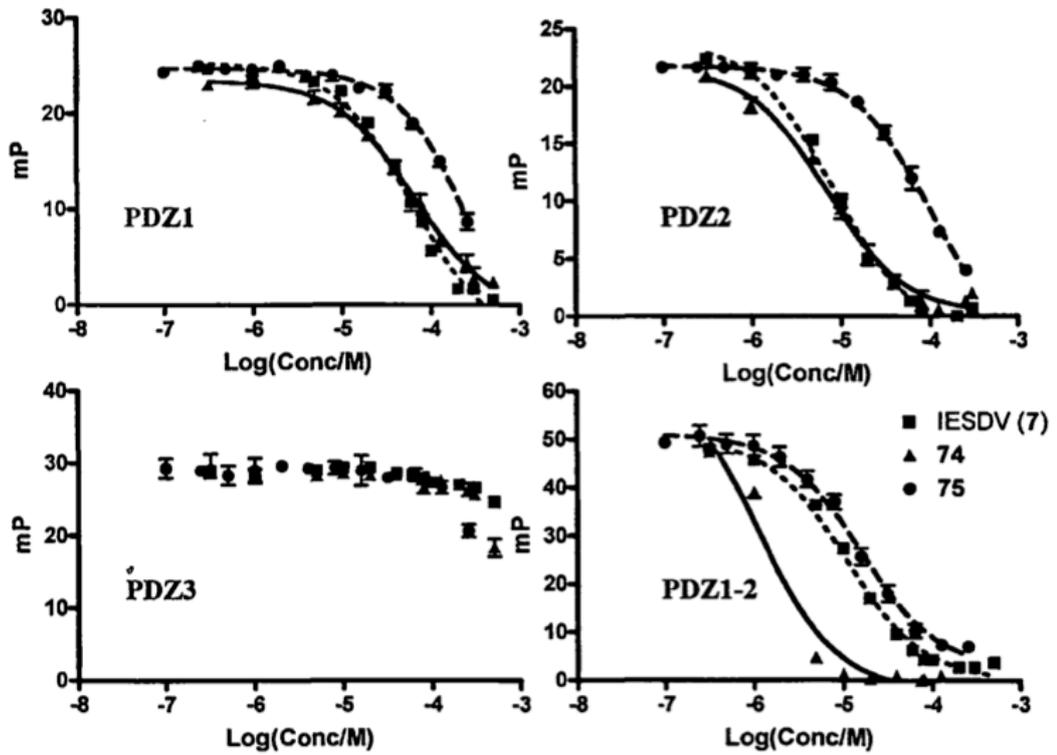


74: (IESDV)<sub>2</sub>PEG12

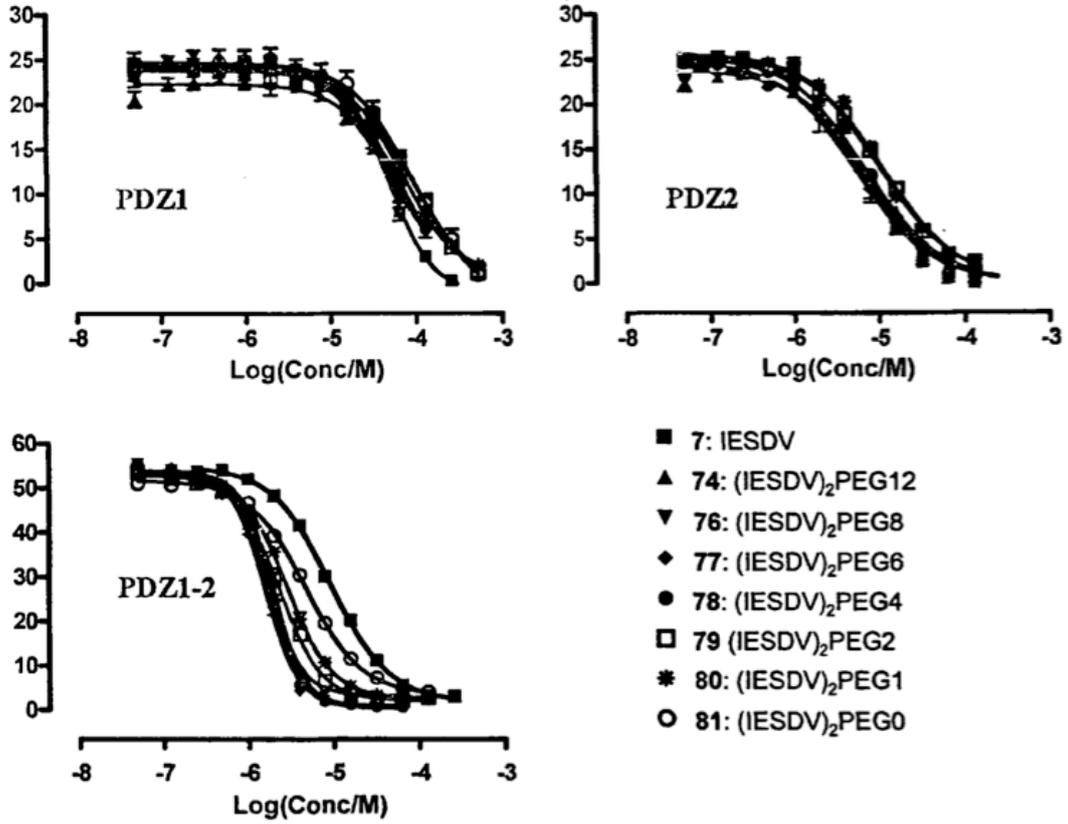


75: (GE[N-Etilciclohexil]TDV)<sub>2</sub>PEG12

**Figura 8**

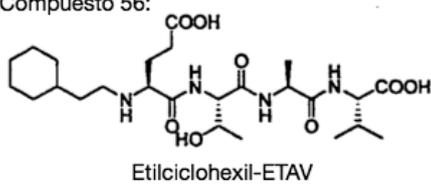


**Figura 9**



**Figura 10**

Compuesto 56:



Compuesto 83:

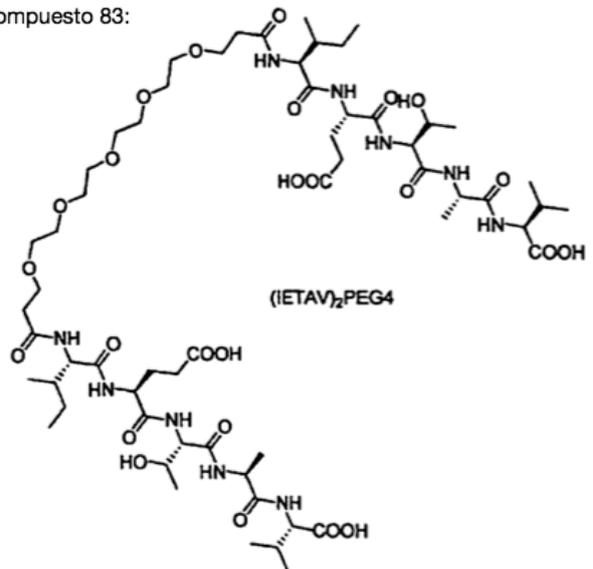


Figura 11

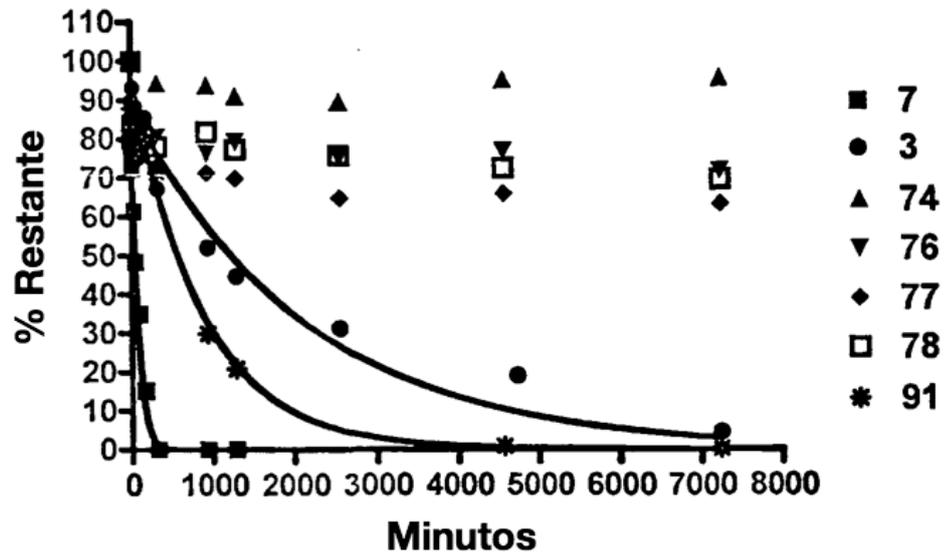


Figura 12

