

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 573**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61P 25/04** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2012 E 12720862 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2707014**

54 Título: **Inhibidores diméricos de afinidad elevada de PSD-95 y su uso para el tratamiento del daño cerebral isquémico y del dolor**

30 Prioridad:

**13.05.2011 EP 11165994**

**13.05.2011 US 201161485898 P**

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

**01.09.2015**

73 Titular/es:

**KØBENHAVNS UNIVERSITET (UNIVERSITY OF COPENHAGEN) (100.0%)**

**Nørregade 10**

**1165 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**BACH, ANDERS y**

**STRØMGAARD, KRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 544 573 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

Inhibidores diméricos de afinidad elevada de PSD-95 y su uso para el tratamiento del daño cerebral isquémico y del dolor

**Campo de la invención**

- 5 La proteína estructural PSD-95 es un objetivo potencial para el tratamiento del ictus isquémico y lesión cerebral traumática, así como para afecciones de dolor crónico, tales como dolor neuropático e inflamatorio. La presente invención se dirige a la provisión de análogos de péptidos diméricos que actúan como inhibidores de las interacciones proteína-proteína relacionadas con PSD-95.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Las interacciones proteína-proteína (IPPs) son esenciales para procesos celulares vitales, y están implicadas en numerosos estados fisiopatológicos, en los que sirven como objetivos potenciales para la intervención terapéutica. Las IPPs en general se han considerado difíciles de seleccionar como objetivo con las moléculas terapéuticas, ya que a menudo se caracterizan por interfases grandes, planas, e hidrófobas.

- 15 Una clase de IPPs es una que implica dominios PDZ [PDZ es una abreviatura de proteína de densidad postsináptica-95 (PSD-95), homólogo del supresor de tumores Discs-large de *Drosophila* (DlgA) y proteína Zonula occludens-1 (ZO-1)]. Los dominios PDZ funcionan a menudo como módulos en proteínas estructurales que están implicadas en el ensamblaje de grandes complejos de proteínas en la célula, y son muy abundantes en los organismos eucarióticos. Los dominios PDZ comprenden alrededor de 90 aminoácidos, y en general interactúan con el extremo C-terminal de la proteína interaccionante. PSD-95 contiene tres dominios PDZ, PDZ 1-3, que se unen a ligandos peptídicos con la secuencia consenso Glu/Gln-Ser/Thr-X-Val-COOH.

- 20 La base estructural para la interacción de los dominios PDZ con los péptidos C-terminales se dilucidó primero mediante una estructura cristalográfica de rayos X de PDZ3 de PSD-95 complejada con un ligando peptídico nativo, CRIPT (Secuencia: YKQTSV). PDZ3 contiene seis cadenas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta$ A- $\beta$ F) y dos hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A y  $\alpha$ B), y el ligando peptídico C-terminal se une como una cadena  $\beta$  antiparalela adicional en una hendidura entre la cadena  $\beta$ B y la hélice  $\alpha$ B. Se consideran especialmente importantes dos residuos del ligando peptídico para la afinidad y la especificidad, el primer ( $P^0$ ) y el tercer ( $P^{-2}$ ) aminoácidos (contando desde el extremo C-terminal). La cadena lateral del aminoácido de la posición  $P^0$  se proyecta en un bolsillo hidrófobo, y es necesario un aminoácido con cadenas laterales alifáticas (Val, Ile y Leu). En la estructura PDZ3-CRIPT, el oxígeno del hidroxilo de Thr ( $P^{-2}$ ) forma un enlace de hidrógeno con el nitrógeno de una cadena lateral de imidazol de His372. Un motivo Gly-Leu-Gly-Phe (posición 322-325 en PDZ3) conservado y un residuo cargado positivamente (Arg318 en PDZ3) de los dominios PDZ actúan como mediadores en la unión al grupo carboxilato C-terminal.

- 25 Los dominios PDZ1 y PDZ2 de PSD-95 interactúan con varias proteínas, lo que incluye la unión simultánea de los receptores ionotrópicos de glutamato de tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y la enzima productora de óxido nítrico, la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Figura 1). Los receptores de NMDA son los mediadores principales de la excitotoxicidad, que está implicada en las enfermedades neurodegenerativas y las lesiones cerebrales agudas, y aunque los antagonistas del receptor de NMDA reducen de manera eficaz la excitotoxicidad previniendo el flujo de iones mediado por glutamato, también impiden procesos fisiológicos importantes. Así, los antagonistas de receptores de NMDA han fracasado en los ensayos clínicos de ictus debido a la baja tolerancia y a la carencia de eficacia. En su lugar, se puede obtener la inhibición específica de la excitotoxicidad alterando el complejo intracelular nNOS/PSD-95/receptor de NMDA con inhibidores de PSD-95 (Figura 1). PSD-95 se une de manera simultánea al receptor de NMDA, principalmente a las subunidades GluN2A y GluN2B, y nNOS por medio de PDZ1 y PDZ2. La activación del receptor de NMDA provoca la entrada de iones de calcio, que activa nNOS, lo que conduce a la generación de óxido nítrico (NO). Así, PSD-95 actúa como mediador en una asociación específica entre la activación del receptor de NMDA y la producción de NO, que puede ser perjudicial para las células si se mantiene durante un periodo más largo, y es un facilitador clave de la neurotoxicidad mediada por glutamato (Figura 1). Se sabe que la inhibición del complejo ternario de la interacción nNOS/PSD-95/receptor de NMDA seleccionando como objetivo PSD-95 previene el daño cerebral isquémico en ratones, afectando a la unión funcional entre la entrada iones de calcio y la producción de NO, mientras permanece intacta la función fisiológica del receptor de NMDA, tal como el flujo de iones y las rutas de señalización favorables a la supervivencia.

- 30 La inhibición del complejo nNOS/PSD-95/receptor de NMDA se ha conseguido previamente con un nonapéptido, que corresponde al extremo C-terminal de GluN2B, fusionado al péptido Tat de VIH-1, conocido por su capacidad de facilitar la permeabilidad de membranas y de la barrera hematoencefálica. Este péptido 20-mérico (Tat-NR2B9c; Secuencia: YGRKKRRQRRRKLSSIESDV) ha mostrado propiedades neuroprotectoras prometedoras en modelos en rata de daño cerebral isquémico (Aarts et al, Science 298, 2002, págs. 846-850, 2002; Sun et al, Stroke 39, 2008, págs. 2544-2553), y está actualmente en ensayos clínicos como fármaco potencial para el tratamiento de la isquemia cerebrovascular, tal como se observa en el ictus. Sin embargo, este compuesto tiene una afinidad baja ( $K_i = 4,6 \mu\text{M}$ ; véase más adelante) hacia PDZ1-2 de PSD-95, lo que potencialmente lo hace un compuesto ineficaz y no selectivo.

El documento WO2010/004003 describe ligandos de péptidos diméricos unidos mediante un ligador de polietilén glicol (PEG) que se unen de manera simultánea a los dominios PDZ1 y PDZ2 de PSD-95 y su uso para el tratamiento de la isquemia cerebrovascular. Sigue existiendo la necesidad de inhibidores de PSD-95 con una afinidad superior hacia los dominios PDZ1 y PDZ2, y que tengan un efecto terapéutico mejorado *in vivo* para el tratamiento del ictus isquémico y la lesión cerebral traumática.

El dolor neuropático está provocado por el daño del sistema nervioso periférico o central debido a una lesión traumática, cirugía, o enfermedades tales como diabetes o trastornos autoinmunitarios. Tal daño conduce a una respuesta de fase aguda caracterizada por "dolor nociceptivo" e inflamación. En una gran proporción de pacientes, el dolor persiste a pesar de la curación de la lesión, lo que da como resultado un estado de dolor neuropático crónico. Además de la implicación de la inflamación tras una lesión neuronal, el dolor crónico se puede iniciar también por la inflamación inducida por mediadores liberados por las células inmunitarias, lo que provoca una sensibilización de las rutas del dolor. La sensibilización de las neuronas sensoriales medulares ("sumación temporal") es una característica compartida del dolor neuropático y del dolor inflamatorio crónico, y está provocada por una activación prolongada de los nociceptores. Los síntomas se presentan como dolor urente espontáneo, una respuesta exagerada a estímulos dolorosos (hiperalgesia), y dolor en respuesta a estímulos que normalmente no son dolorosos (alodinia). El dolor crónico, en particular como resultado de una lesión neuronal, se trata mal mediante los fármacos actuales, tales como opioides y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs). Los antagonistas del receptor de NMDA bloquean la sensibilización de las respuestas de dolor y exhiben buenas propiedades analgésicas en modelos animales y en situaciones clínicas, pero están asociados a efectos secundarios inaceptables, y por lo tanto no se pueden usar clínicamente. Por lo tanto, existe la necesidad de fármacos alternativos capaces de proporcionar tratamientos mejorados para el dolor, en particular los síntomas de dolor relacionados con el receptor de NMDA, a la vez que se evitan los efectos secundarios inaceptables de los fármacos actuales.

#### Compendio de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. Una primera realización de la presente invención proporciona un compuesto que comprende un primer péptido unido a un segundo péptido mediante un ligador, en el que el primer y el segundo péptido comprenden al menos cuatro residuos unidos por amida que tienen una secuencia YTXV o YSXV, en la que

a. Y se selecciona de E, Q, y A, y

b. X se selecciona de A, Q, D, N, *N*-Me-A, *N*-Me-Q, *N*-Me-D, y *N*-Me-N, y

en el que un tercer péptido que tiene la función de un péptido de penetración celular (CPP) está unido al ligador mediante un enlace amida, y en el que el tercer péptido comprende al menos 4 residuos de aminoácidos seleccionados de arginina y/o lisina, y en el que el ligador comprende PEG, en el que al menos un átomo de oxígeno del PEG está sustituido por un átomo de nitrógeno para proporcionar *N*PEG.

En un caso de la presente descripción, se proporciona un compuesto que comprende un primer péptido o análogo de péptido unido a un segundo péptido o análogo de péptido mediante un ligador, en el que el ligador comprende PEG y en el que el primer y el segundo péptido o análogo de péptido comprenden al menos cuatro residuos unidos por amida que tienen una secuencia YTXV o YSXV, en la que

a. Y se selecciona de E, Q, y A, o un análogo de los mismos, y

b. X se selecciona de A, Q, D, N, *N*-Me-A, *N*-Me-Q, *N*-Me-D, y *N*-Me-N o un análogo de los mismos, caracterizado porque un tercer péptido está unido a una cadena lateral de uno de los residuos del primer y segundo péptido o análogo de péptido, en el que el tercer péptido comprende al menos 4 residuos de aminoácidos seleccionados de arginina y/o lisina y tiene la función de un péptido de penetración celular (CPP).

En una realización adicional de los compuestos anteriores de la invención, el ligador es un ligador de PEG que comprende 4-28 restos de etilén glicol ( $N=4-28$ ). En una realización adicional del compuesto de la invención, el ligador es un PEG-diácido o un *N*PEG-diácido, y en el que cada grupo carboxilo del ligador está unido al grupo amino terminal de un residuo terminal del primer o el segundo péptido o análogo de péptido por medio de un enlace amida.

En una realización adicional de los compuestos anteriores de la invención, el CPP comprende un péptido retroinverso. En una realización adicional de los compuestos anteriores de la invención, el tercer péptido (CPP) es el péptido Tat (YGRKKRRQRRR) o péptido Retroinverso-D-Tat (rrrqrkr).

En una realización adicional de los compuestos anteriores de la invención, el péptido tiene una longitud de 5 a 10 residuos unidos por amida. En una realización adicional de los compuestos anteriores de la invención, el péptido está compuesto de al menos 4 residuos de L-aminoácidos. En una realización adicional de los compuestos anteriores de la invención, el péptido o análogo de péptido está *N*-alquilado.

La presente descripción que comprende la invención proporciona además un compuesto ligador que comprende un

PEG-diácido, en el que un átomo de oxígeno del PEG está sustituido por un átomo de nitrógeno para proporcionar MPEG-diácido. En un caso adicional del compuesto ligador de la descripción, el átomo de nitrógeno está unido a un grupo protector.

5 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores de la invención para el uso como un medicamento. En una realización adicional, la composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores de la invención es para el uso en la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad relacionada con la excitotoxicidad en un sujeto.

10 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores de la invención para el uso en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor en un sujeto.

La presente invención incluye además proporcionar profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad relacionada con la excitotoxicidad o el dolor en un sujeto, que comprende administrar la composición farmacéutica anterior al sujeto, en la que dicha enfermedad puede ser una lesión isquémica o traumática del SNC.

15 En una realización adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento del dolor en un sujeto, y dicha composición comprende un compuesto activo, dicho compuesto activo comprende un primer péptido unido a un segundo péptido mediante un ligador, en el que el primer y el segundo péptido comprenden al menos cuatro residuos unidos por amida que tienen una secuencia YTXV o YSXV, en la que  
 20 (a) Y se selecciona de E, Q, y A, y (b) X se selecciona de A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D, y N-Me-N. En una realización adicional, el ligador en dicho compuesto activo es un ligador de PEG y comprende 4 a 28 restos de etileno glicol (N=4-28). En una realización adicional, el grupo carboxilo del ligador en dicho compuesto activo está unido a un residuo terminal del primer o el segundo péptido. En una realización adicional, dicho compuesto activo se selecciona de PEG4(IETAV)<sub>2</sub>, MPEG4(IETAV)<sub>2</sub>, PEG6(IESDV)<sub>2</sub>, y PEG4(IESDV)<sub>2</sub>.

25 Dicho compuesto activo puede tener además un tercer péptido que comprende al menos 4 residuos de aminoácidos seleccionados de arginina y/o lisina, y que tiene la función de un CPP, en el que el tercer péptido está unido al ligador o está unido a una cadena lateral de un aminoácido del primer y segundo péptido o análogo de péptido.

### Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1. PSD-95 se une de manera simultánea al receptor de NMDA y nNOS por medio de sus dominios PDZ1 y PDZ2. De ese modo, PSD-95 facilita la unión funcional entre la activación del receptor de NMDA y la producción de NO, ya que la entrada de calcio (Ca<sup>2+</sup>) desde el receptor de NMDA activa nNOS. Los inhibidores de PSD-95, tales como el ligando dimérico ilustrado que selecciona como objetivo PDZ1-2 de PSD-95, inhiben la formación del complejo ternario nNOS/PSD-95/receptor de NMDA y desacoplan la unión entre la actividad del receptor de NMDA y la producción NO, por lo que se consigue la neuroprotección contra la excitotoxicidad.

35 Figura 2. Estructuras químicas de los ligadores de PEG4-diácido y MPEG4-diácido, y de los compuestos diméricos AB125 y AB141.

Figura 3. Estructuras químicas de los ligandos diméricos AB144 y AB147, que proporcionan su estructura completa y una presentación alternativa en la que los restos de pentapéptidos, la secuencia Tat y la secuencia Retroinversa-D-Tat se escriben en el código de aminoácidos de 1 letra.

40 Figura 4. Estructura química de los ligandos diméricos fluorescentes, AB143 y AB145, que se usan como sondas en el ensayo de polarización de fluorescencia, y/o que se usan para estudiar la permeabilidad del SNC.

45 Figura 5. Afinidad hacia PDZ1-2 de PSD-95 medida mediante polarización de fluorescencia (izquierda) y estabilidad en plasma sanguíneo humano *in vitro* a 37 °C (derecha). Las constantes de afinidad *K<sub>i</sub>* y las semividas de estabilidad (*T*<sub>1/2</sub>) se enumeran en la tabla. Los datos de la tabla y el gráfico de polarización de fluorescencia (izquierda) representan ≥3 medidas individuales, mientras se muestran los datos representativos de un experimento en el gráfico de plasma sanguíneo (gráfico derecho).

Figura 6. Espectros (RMN) de correlación de <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de AB140 libre (Contornos: I1, E2, T3, A4, V5) y AB140 en el complejo con PDZ1-2 de PSD-95 (contornos a/b restantes). Las asignaciones se muestran en el espectro. Para la forma unida del dipéptido no se ha intentado determinar a qué dominio PDZ están asociados los picos "a" y los picos "b", respectivamente.

50 Figura 7. Propensiones de la estructura secundaria de la forma unida de AB140 calculadas mediante el uso del programa SSP. Un valor de uno indica una hélice α completamente formada y un valor de menos uno indica una estructura completamente extendida, mientras un valor cercano a cero es indicativo de una cadena aleatoria. Las barras negras corresponden a residuos marcados "a" y las barras grises a residuos marcados "b" en la Figura 6.

Figura 8. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica de análogos fluorescentes en ratones sin manipular. (A)

Gráfico de barras de la intensidad de fluorescencia media de compuestos marcados con 5-FAM (*F*), 2 horas después de la inyección intravenosa (i.v.) en comparación con los ratones tratados con disolución salina. (B) Detección de *F*-Tat-NPEG4(IETDV)<sub>2</sub> (AB145) (n=2), *F*-Retroinverso-D-Tat-NPEG4(IETDV)<sub>2</sub> (AB148) (n=2), y *F*-Tat-NR2B9c (MS23) (n=2) pero no *F*-NPEG4(IETAV)<sub>2</sub> (AB143) (n=2), en comparación con los ratones tratados con disolución salina (n=2). *F* = 5-FAM; Re = Retroinverso. Los datos se presentan como la media ± EEM; \*/\*\*/\*\*\*; p<0,05/0,01/0,001 (Mann-Whitney no paramétrica). Barra de escala: 100 μm.

Figura 9. Cronología de los experimentos de pMCAO. Todos los compuestos se administraron i.v. (3 nmol/g) 30 minutos tras la cirugía, seguido de un periodo de supervivencia de 5,5 ó 47,5 horas.

Figura 10. Efecto neuroprotector de los compuestos después de un periodo de supervivencia posquirúrgica de 6 horas. El gráfico de barras muestra los volúmenes de infarto medios 6 horas después de pMCAO. El tratamiento con AB144 redujo significativamente el daño cerebral isquémico en comparación con los ratones de control tratados con disolución salina, un efecto que no se consiguió mediante un tratamiento con Tat-NR2B9c monomérico (n = 16-19). Los datos se muestran como la media ± EEM; \*/\*\*/\*\*\*; p<0,05/0,01/0,001; Prueba de Mann-Whitney no paramétrica.

Figura 11. Efecto neuroprotector de los compuestos después de un periodo de supervivencia posquirúrgica de 48 horas. Tinción con azul de toluidina que muestra el daño cerebral isquémico 48 horas tras pMCAO. Barra de escala: 1 mm.

Figura 12. Efecto neuroprotector de los compuestos después de un periodo de supervivencia posquirúrgica de 48 horas. Gráfico de barras que muestra un efecto reductor de infarto más duradero de AB144 en comparación con los ratones de control tratados con disolución salina, e infartos significativamente más pequeños en comparación con los ratones tratados con Tat-NR2B9c monomérico (n = 16-19). Además, AB147 produjo una reducción del infarto más duradera, de manera similar a AB144. Los datos se muestran como la media ± EEM; \*/\*\*/\*\*\*; p<0,05/0,01/0,001; Prueba de Mann-Whitney no paramétrica.

Figura 13. Se registraron parámetros fisiológicos tales como la temperatura (izquierda) y el peso corporal (derecha) antes y después de pMCAO (experimento de 48 horas). Los puntos de tiempo (eje x) indican el tiempo respecto de la cirugía (0 h). (Izquierda) Gráfico que muestra una caída inducida por la anestesia de la temperatura corporal, 30 min después de pMCAO, que sin embargo se registró antes de las inyecciones i.v. No se registraron diferencias inducidas por fármacos entre grupos 1 y 3 horas tras la cirugía. (Derecha) Gráfico que no muestra diferencias en el peso corporal entre grupos, 3 días antes y 24 horas y 48 horas después de pMCAO (0 h). Datos mostrados como media ± EEM. Anova bidireccional.

Figura 14. Estudio de la función motora de ratones con supervivencia posquirúrgica de 48 horas. (A) Gráfico de barras que muestra la fuerza de agarre media de ambas patas delanteras antes (valor inicial) y después de pMCAO. Los ratones tratados con disolución salina y Tat-NR2B9c mostraron una fuerza de agarre significativamente reducida en comparación con el valor inicial, 48 horas después de pMCAO. No se observó ninguna diferencia en comparación con el valor inicial en los ratones tratados con AB144 y AB147. (B) Gráfico de barras que muestra la asimetría inducida por isquemia en las patas delanteras, observada aquí en los ratones tratados tanto con disolución salina como con Tat-NR2B9c monomérico, pero no en los ratones tratados con AB144 y AB147. (C) Ensayo de rendimiento Rotarod de cuatro ensayos (T1-T4), que muestra las habilidades de aprendizaje motor a corto plazo de los ratones 48 horas después de pMCAO. Los datos revelan un componente de aprendizaje a lo largo de los ensayos en todos los grupos de ratones, no obstante el tratamiento con AB144 y AB147 proporcionó una mejora más pronunciada (cf. T2) en comparación con la disolución salina, y una resistencia incrementada en comparación con Tat-NR2B9c (véase el texto). (A-C) Todos los datos se muestran como media ± EEM; \*/\*\*/\*\*\*; p<0,05/0,01/0,001; (A-B) Prueba t de Student para datos emparejados; (C) Prueba de Wilcoxon para datos emparejados.

Figura 15. Estructuras químicas de los análogos de AB144: AB144\_B, AB144\_C, AB144\_D, AB144\_E, AB144\_H, AB144\_I; Mismo estilo de representación estructural que en la Figura 3 anterior.

Figura 16. Esquema 1. Síntesis del NPEG-ligador A-C en una forma N-prottegida (Ns) (Ns-NPEG4-diácido-ligadores), que se usa en el proceso de dimerización para producir los compuestos diméricos basados en NPEG. El Ns-NPEG4-diácido-ligadorA se usa para AB141, AB144, AB147, AB144\_D, AB144\_E, AB143, AB145, y AB148. El Ns-NPEG4-diácido-ligadorB se usa para AB144\_B. El Ns-NPEG4-diácido-ligadorC se usa para AB144\_C.

Figura 17. Efecto de AB125 en el modelo de adyuvante completo de Freund de dolor inflamatorio. Los animales se trataron con CFA intraplantar y AB125 intraperitoneal (0, 3, 10, o 30 mg/kg) 24 horas antes del ensayo. La hiperalgesia/alodinia mecánica se midió con el método de von Frey. Los datos se expresan como la media ± EEM, que muestra el umbral de retirada de la pata respecto de los valores iniciales (es decir, < 1,0 corresponde a hiperalgesia/alodinia). Los ratones tratados con disolución salina mostraron una respuesta notable a CFA, con un umbral mecánico reducido al 36% del valor inicial (####; p < 0,001). Esta reducción no se observó en los ratones tratados con 3, 10, o 30 mg/kg de AB125. El umbral en los ratones tratados con 3, 10 ó 30 mg/kg de AB125 difirió significativamente de los ratones tratados con disolución salina (\*\*\*; p<0,001).

Figura 18. Efecto de AB125 (a) y MK-801 (b) sobre la hiperalgesia inducida por CFA cuando se administraron simultáneamente con CFA. Para AB125, el ANCOVA reveló un efecto principal significativo del valor inicial

(F1,47=4,61; p=0,037), un efecto principal significativo del tratamiento (F3,47=5,00; p=0,004), un efecto principal significativo del tiempo (F1,48=42,02; p<0,001), y ninguna interacción tratamiento-tiempo significativa (F3,48=0,71; p=0,552). Las comparaciones planificadas revelaron que AB125 invirtió significativamente la hiperalgesia inducida por CFA a 3 mg/kg (p=0,012) y 10 mg/kg (p=0,03) después de 1 hora. Todavía se observó una inversión significativa después de 24 horas en los grupos tratados con 3 mg/kg (p=0,008) y 10 mg/kg (p=0,003). Para MK-801, el ANCOVA no reveló un efecto principal significativo del valor inicial (F1,27=0,03; p=0,86), un efecto principal significativo del tratamiento (F3,27=9,60; p<0,001), un efecto principal significativo del tiempo (F1,28=31,14; p<0,001), y ninguna interacción tratamiento-tiempo significativa (F3,28=0,90; p=0,452). Las comparaciones planificadas revelaron que MK-801 invirtió significativamente la hiperalgesia inducida por CFA a 0,1 mg/kg (p=0,004) después de 1 hora. Todavía se observó una inversión significativa después de 24 horas en el grupo tratado con 0,1 mg/kg (p<0,001).

Figura 19. Efecto de AB125 cuando se administró 24 horas después de la inyección de CFA. El ANCOVA reveló un efecto principal significativo del valor inicial (F1,34=15,67; p<0,001), un efecto principal significativo del tratamiento (F4,34=7,98; p<0,001), un efecto principal significativo del tiempo (F2,70=24,41; p<0,001), pero ninguna interacción tratamiento-tiempo significativa (F1,70=1,31; p=0,253). Las comparaciones planificadas revelaron una inversión de la hiperalgesia inducida por CFA mediante 3 mg/kg (p=0,002) y 10 mg/kg (p=0,001) después de 1 hora. Todavía se observó una inversión significativa después de 24 horas en los grupos tratados con 3 mg/kg (p=0,015) y 10 mg/kg (p=0,001). A las 72 horas, la hiperalgesia se invirtió significativamente a todas las dosis (1, 3, y 10 mg/kg) (p<0,001).

Figura 20. Efecto de AB125 y MK-801 sobre el consumo de alimentos (a-b) y el índice de discriminación (c-d) en el ensayo de transmisión social de preferencia alimentaria para la memoria de referencia a largo plazo. Para AB125, el ANOVA unidireccional sobre el índice de discriminación no reveló un efecto principal significativo del tratamiento (F2,22=0,108; p=0,898). Las comparaciones planificadas no mostraron un efecto significativo de las dosis de AB125 ensayadas (30 y 60 mg/kg mostrados). Para MK-801, el ANOVA unidireccional reveló un efecto principal significativo del tratamiento (F2,21=5,28; p=0,014). Las comparaciones planificadas sobre la media predicha revelaron que 0,1 mg/kg de MK-801 redujo significativamente el índice de discriminación (p=0,005).

Figura 21. Efecto de AB125 y MK-801 sobre el tiempo pasado en el brazo familiar y nuevo en el laberinto en Y modificado (a-b), y sobre el índice de discriminación, ID=(nuevo-familiar)/(nuevo+familiar) (c-d). Para AB125, el ANOVA unidireccional no reveló un efecto principal significativo de AB125 sobre el índice de discriminación (F3,29=0,85; p=0,478). Las comparaciones planificadas no mostraron un efecto significativo de las dosis de AB125 ensayadas (30 y 60 mg/kg mostrados). Para MK-801, el ANOVA unidireccional reveló un efecto significativo del tratamiento (F3,23=15,43; p<0,001). Las comparaciones planificadas revelaron que el índice de discriminación se redujo mediante 0,05 (p=0,019) y 0,1 mg/kg de MK-801 (p<0,001).

Figura 22. Efecto de AB125 y MK-801 sobre el rendimiento motor en el ensayo Rotarod. Para AB125 (30 y 60 mg/kg mostrados), el RM ANOVA bidireccional no mostró un efecto principal significativo del tratamiento (F2,48=1,18; p=0,333), ni un efecto principal significativo del tiempo (F3,48=0,84; p=479), ni una interacción tratamiento-tiempo significativa (F6,48=1,26; p=0,293). Para MK-801, el ANOVA bidireccional mostró un efecto principal significativo del tratamiento (F2,66=55,72; p<0,001), un efecto principal significativo del tiempo (F3,66=3,69; p=0,016), y una interacción tratamiento-tiempo significativa (F6,66=2,25; p=0,049). La comparación planificada reveló que 0,1 mg/kg de MK-801 disminuyó significativamente el tiempo en el Rotarod a los 15 min (p<0,001), 30 min (p<0,001), 45 min (p<0,001), y 60 min (p=0,006).

Figura 23. Efecto de AB144 en el modelo de adyuvante completo de Freund de dolor inflamatorio. Los animales se trataron de manera concurrente con CFA intraplantar y AB144 intraperitoneal (0, 3, 10, o 30 mg/kg), y se midió la hiperalgesia/alodinia mecánica con el método de von Frey 1 y 24 horas después. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM, que muestra el umbral de retirada de la pata respecto de los valores iniciales (es decir, < 1,0 corresponde a hiperalgesia/alodinia). Los ratones tratados con disolución salina mostraron una respuesta notable a CFA, con un umbral mecánico reducido al 25% del valor inicial (###; p < 0,001). Esta reducción no se observó 1 hora después de la administración de AB144/CFA en los ratones tratados con 30 mg/kg de AB144, y a las 24 horas después de la administración de AB144/CFA en los ratones tratados con 10 y 30 mg/kg de AB144 (\*: p < 0,05).

### Descripción detallada de la invención

#### I. Definición de las abreviaturas y expresiones:

"Un" o "uno", tal como se usa en la presente memoria, puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el que se use.

El enlace amida se forma mediante una reacción entre un ácido carboxílico y una amina (y la eliminación concomitante de agua). Cuando la reacción es entre dos residuos de aminoácidos, el enlace formado como resultado de la reacción se conoce como una unión peptídica (enlace peptídico);

Los aminoácidos, que son proteogénicos, se denominan en la presente memoria mediante el uso de su código de 1 letra o de 3 letras según 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 de 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 de forma L, mientras

un código de 3 letras en letras minúsculas indica un aminoácido de forma D;

"que comprende" se debería 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 compuestos adicionales;

CFA, adyuvante completo de Freund;

5 SNC, sistema nervioso central;

CPP, péptido de penetración celular; caracterizado por la capacidad de atravesar la membrana plasmática de las células de mamífero, y de ese modo puede dar lugar a la administración intracelular de moléculas de carga, tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos a los que esté unido;

DCM, Diclorometano;

10 Inhibidor de PSD-95 dimérico, es un inhibidor de PSD-95 que comprende dos péptidos o análogos de péptidos, que están unidos de manera covalente por medio de un ligador, capaz de unirse a, o interactuar con, PDZ1 y PDZ2 de PSD-95 de manera simultánea, por lo tanto;

P<sup>0</sup>, Definido como el primer residuo de aminoácido o análogo que corresponde al aminoácido C-terminal del péptido/análogo de péptido;

15 P<sup>1</sup>, Definido como el segundo residuo de aminoácido o análogo del mismo contando desde el aminoácido C-terminal del péptido/análogo de péptido;

P<sup>2</sup>, Definido como el tercer residuo de aminoácido o análogo del mismo contando desde el aminoácido C-terminal del péptido/análogo de péptido;

20 P<sup>3</sup>, Definido como el cuarto residuo de aminoácido o análogo del mismo contando desde el aminoácido C-terminal del péptido/análogo de péptido;

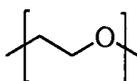
P<sup>4</sup>, Definido como el quinto residuo de aminoácido o análogo del mismo contando desde el aminoácido C-terminal del péptido/análogo de péptido;

P<sup>5</sup>, Definido como el sexto residuo de aminoácido o análogo del mismo contando desde el aminoácido C-terminal del péptido/análogo de péptido;

25 DIPEA, diisopropiletilamina;

DMF, *N,N*-Dimetilformamida;

Resto de etilen glicol, en la presente memoria se refiere a la unidad estructural que constituye un ligador de PEG o MPEG. Un nombre más técnico de un "resto de etilen glicol" es "oxietileno", y la fórmula química de la unidad se muestra aquí:



30 PF, polarización de fluorescencia;

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

35 Célula de mamífero, pretende indicar cualquier célula de origen mamífero. La célula puede ser una línea celular establecida, muchas de las cuales están disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, EE.UU.) o una célula primaria con una vida limitada obtenida de un tejido de mamífero, que incluye los tejidos obtenidos de un animal transgénico, o una línea celular inmortal recién establecida obtenida de un tejido de mamífero, que incluye los tejidos transgénicos, o una célula o línea celular híbrida obtenida fusionando tipos celulares diferentes de origen mamífero, p.ej., líneas celulares de hibridoma. Las células pueden expresar  
40 opcionalmente uno o más productos de genes que no son nativos, p.ej. receptores;

MCAO, oclusión de la arteria cerebral media;

nNOS, óxido nítrico sintasa neuronal;

NO, óxido nítrico;

NMDA, *N*-metil-D-aspartato;

RMN, resonancia magnética nuclear;

NPEG, es el nuevo tipo de ligador descrito en la presente memoria, que procede del ligador de PEG clásico, pero en el que uno o más de los átomos de oxígeno del esqueleto está sustituido por un átomo de nitrógeno;

Ns, *orto*-nitrobenzenosulfonilo (a veces abreviado oNBS);

- 5 PDZ, proteína de densidad postsináptica-95 (PSD-95), homólogo del supresor de tumores Discs-large de *Drosophila* (DlgA), proteína Zonula occludens-1 (zo-1);

PEG, polietilen glicol; PEG es un polímero de etilen glicol que tiene la fórmula química  $C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$ , y la estructura repetitiva:



- 10 en la que, por ejemplo, 12 restos de PEG, o PEG12, corresponden a un polímero de 12 restos de etilen glicol ( $n=12$ );

IPPs, interacciones proteína-proteína;

PSD-95, proteína de densidad postsináptica-95;

- 15 Inhibidor de PSD-95, es un compuesto que se une a PDZ1, PDZ2, o PDZ1 y PDZ2 de PSD-95 e inhibe las IPPs que facilitan estos dominios PDZ en la célula. Un ejemplo de una interacción que se inhibe mediante un inhibidor de PSD-95 es el complejo ternario de nNOS, PSD-95 y receptor de NMDA;

Retroinverso, los péptidos retroinversos están compuestos de D-aminoácidos ensamblados en el orden inverso de la secuencia de L-aminoácidos original;

- 20 Secuencia retroinverso-D-Tat, una secuencia de CPP 9-mérica hecha invirtiendo la secuencia Tat y usando D-aminoácidos (rrrqrkkrr), lo que facilita la permeabilidad a través de las membranas biológicas, lo que incluye la barrera hematoencefálica, y cuya estructura la hace estable hacia las enzimas proteasas;

EEM, error estándar de la media;

Secuencia Tat, una secuencia de CPP 11-mérica (YGRKKRRQRRR) derivada de la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), que facilita la permeabilidad a través de las membranas biológicas, lo que incluye la barrera hematoencefálica;

- 25 TFA, ácido trifluoroacético;

THF, tetrahidrofurano;

TIPS, triisopropilsilano;

I. Estructura química de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP

- 30 La descripción que comprende la invención proporciona un inhibidor de PSD-95 dimérico que comprende un primer péptido o análogo de péptido unido a un segundo péptido o análogo de péptido mediante un ligador, en el que el primer y el segundo péptido o análogo de péptido comprenden al menos cuatro residuos unidos por amida que tienen la secuencia YTXV o YSXV, en la que

Y se selecciona de E, Q, y A, o un análogo del residuo seleccionado, y

- 35 X se selecciona de A, Q, D, N, *N*-Me-A, *N*-Me-Q, *N*-Me-D, y *N*-Me-N o un análogo del residuo seleccionado. El inhibidor de PSD-95 dimérico se caracteriza además porque un tercer péptido está unido al inhibidor, y dicho tercer péptido es un CPP que tiene propiedades de penetración celular.

I.i El ligador del inhibidor de PSD-95 dimérico

- 40 El primer y segundo péptido o análogos de péptido del inhibidor de PSD-95 dimérico están unidos entre sí por medio de un ligador. Los ligadores adecuados incluyen un ligador que comprende NPEG, polietilen glicol (PEG); poliamina (Hervé F et al, AAPS J, 2008, pág. 455); ácido nucleico peptídico (ANP) (Egholm et al, 2005 Nature 365, pág. 566); ácido nucleico bloqueado (ANB) (Singh et al, 1998, Chem. Commun., pág. 455); triazoles, piperazinas, oximas, tiazolidinas, sistemas de anillos aromáticos, alcanos, alquenos, alquinos, alcanos cíclicos, alquenos cíclicos, amidas, tioamidas, éteres, e hidrazonas. Cuando el ligador es un ligador de PEG (o NPEG), puede comprender además un grupo funcional activo, tal como un grupo funcional electrófilo o nucleófilo (documento WO/2007/140282), que se puede usar para unir el ligador de PEG a cada inhibidor de péptido (o análogo de péptido). Los grupos funcionales adecuados para la unión incluyen grupos electrófilos amino-reactivos, seleccionados de éster de
- 45

*N*-hidroxisuccinimida (NHS), éster de *p*-nitrofenilo, carbonato de succinimidilo, carbonato de *p*-nitrofenilo, succinimidil uretano, isocianato, isotiocianato, acil azida, cloruro de sulfonilo, aldehído, carbonato, imidoéster o anhídrido; y grupos tio-reactivos seleccionados de maleimida, haloacetilo, derivados de haluro de alquilo, aziridina, agentes arilantes derivados de acrililo o reactivos de intercambio de tio-disulfuro. Los grupos funcionales nucleófilos adecuados incluyen amina, hidrazida, carbazato, acil hidrazida, semicarbamato o hidrazina, que pueden experimentar reacciones con grupos aldehído o carboxilo del inhibidor de péptido o de análogo de péptido.

La longitud óptima del ligador en el inhibidor de PSD-95 dimérico dependerá del ligador seleccionado. Cuando el ligador es PEG, el número de restos de etilen glicol (*n*) de PEG pueden ser *n*=1-28 o *n*=4-28, o el ligador puede tener una longitud de *n*= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12. Se pueden usar PEG-diácidos para unir ligandos (péptidos o análogos de péptidos), en los que, p.ej., el PEG4-ligador esté modificado de forma que haya presentes dos grupos de ácido carboxílico en cada extremo del ligador. Así, un ligador de PEG4-diácido antes del proceso de dimerización se denomina ácido 4,7,10,13,16-pentaoxanonadecan-1,19-dioico. Durante la dimerización del primer y segundo péptidos o análogos de péptidos del inhibidor con el ligador, los dos grupos de ácido carboxílico reaccionan con los grupos amino *N*-terminales de los péptidos (o análogos de péptidos) para crear enlaces amida. Los ligadores de PEG<sub>0,1,2,4,6,8</sub> y 12 están de acuerdo con esta descripción.

Según un primer caso del inhibidor de PSD-95 dimérico, el ligador comprende un derivado de un ligador de PEG-diácido, denominado *N*PEG, en el que un átomo de oxígeno del esqueleto del ligador de PEG-diácido está sustituido por un átomo de nitrógeno. El átomo de nitrógeno se puede sustituir en cualquiera de átomos de oxígeno del esqueleto del ligador de PEG. Los grupos carbonilo del ligador de *N*PEG-diácido están unidos al primer y segundo péptido o análogo de péptido, respectivamente, preferiblemente donde la unión es un enlace amida a un residuo terminal del péptido o análogo de péptido.

La Figura 2 ejemplifica un ligador de *N*PEG de la invención, es decir, el ligador de *N*PEG4-diácido, en el que el átomo de oxígeno central está sustituido por nitrógeno para generar un ligador de *N*PEG simétrico, para el uso en el inhibidor dimérico (p.ej. AB141). La Figura 15 ejemplifica un ligador de *N*PEG de un inhibidor dimérico de la invención en el que el átomo de oxígeno localizado en el esqueleto del ligador de PEG, que está sustituido por nitrógeno, está a uno o dos "restos de etilen glicol" del centro del ligador, lo que da un ligador de *N*PEG asimétrico (p.ej., como en AB144\_B y AB144\_C).

El ligador cumple dos funciones. Sirve para unir el primer y segundo péptidos o análogos de péptidos del inhibidor, cuya función es actuar como ligandos que se unen a PDZ1-2 de PSD-95. La afinidad de los péptidos/análogos de péptidos del inhibidor por PDZ1-2 de PSD-95 se incrementa enormemente mediante la dimerización. Además, el átomo de nitrógeno del ligador de *N*PEG sirve como un "asidero" químico para la derivatización adicional (Figuras 2 y 3).

Según un segundo caso del inhibidor de PSD-95 dimérico, el ligador comprende PEG-diácido, que tiene una longitud de 1 a 28 restos de etilen glicol (*n*=1-28), preferiblemente de 1 a 12 restos de etilen glicol (*n*=1-12), más preferiblemente de 4 a 6 restos de etilen glicol (*n*=4-6). La Figura 2 ejemplifica el ligador de PEG, es decir, el ligador de PEG4-diácido.

#### I.ii El péptido o análogo de péptido del inhibidor de PSD-95 dimérico

Según el primer o segundo caso del inhibidor de PSD-95 dimérico, el péptido o análogo de péptido tiene una longitud de 10, 9, 8, 7 ó 6 residuos unidos por amida, más preferiblemente una longitud de 5 ó 4 residuos unidos por amida. El péptido o análogo de péptido puede comprender al menos 4 residuos de L-aminoácidos. Preferiblemente, el residuo X del inhibidor se selecciona de A, Q, y D. Los análogos adecuados del residuo Y o X, o los análogos de cualquiera de los 4 residuos unidos por amida (YTXV o YSXV), o los análogos de sus enlaces amida que los conectan, incluyen: D-aminoácidos, aminoácidos peptoides, β-aminoácidos, enlaces dobles olefínicos (E-vinilo), retroamidas, α-azapéptidos, tioésteres, ésteres (depsipéptidos), carba-sustitución de carbonilo (metilaminas), grupos metiltio, alcanos, cetometilenos, hidroxietilenos, hidroxietilaminas, hidroxietilureas, fluoruros de vinilo (Chemistry & Biochemistry of amino acids, peptides, and proteins, vol. 7, 1983, Boris Weinstein, cap. 5, de Arno F. Spatola); tioamidas (Bach et al, J. Med. Chem., 2011, pág. 1333); la unidad aza (resto de 5-dihidro-2(3H)-pirazona), en particular la posición P<sup>-1</sup> o P<sup>-3</sup> que corresponde al residuo X o Y (Hammond et al, Chem. Biol., 2006, pág. 1247); en donde la elección del análogo se puede facilitar mediante el uso de las herramientas y ensayos para una aproximación de moléculas peptidomiméticas como se describe en la presente memoria. Además, un residuo del primer y/o segundo péptido o análogo de péptido del inhibidor de PSD-95 dimérico puede estar *N*-alquilado, en el que el residuo *N*-alquilado está en la posición P<sup>-3</sup> que corresponde al residuo Y (documento WO2010/004003). El grupo *N*-alquilo se puede seleccionar de *N*-metilo, *N*-etilo, *N*-propilo, *N*-butilo, y *N*-bencilo. Un grupo *N*-alquilo especialmente adecuado se puede seleccionar de *N*-ciclohexilmetilo, *N*-ciclohexiletilo, *N*-feniletilo, *N*-fenilpropilo, *N*-(3,4-diclorofenil)propilo, *N*-(3,4-difluorofenil)propilo, *N*-(naftalen-2-il)etilo.

La Figura 2 ejemplifica un inhibidor de PSD-95 dimérico que tiene un ligador según el primer o segundo caso de la descripción, que comprende un pentapéptido IETAV dimerizado y un ligador de PEG, como en PEG4(IETAV)<sub>2</sub> (AB125) o un ligador de *N*PEG, como en *N*PEG4(IETAV)<sub>2</sub> (AB141).

## I.iii El péptido CPP del inhibidor de PSD-95 dimérico

El inhibidor de PSD-95 dimérico, según el primer o segundo caso, comprende además un tercer péptido que tiene las propiedades de un CPP. Este tercer péptido CPP comprende al menos 4 residuos de D- o L-aminoácidos, pero puede tener una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más residuos de D- o L-aminoácidos. Un CPP preferido tiene una estructura policatiónica y comprende al menos 4 residuos de lisina, o al menos 4 residuos de arginina, o al menos 4 residuos que comprenden residuos tanto de lisina como de arginina (p.ej., péptido Tat; péptidos de poliarginina, tal como 8 argininas; SynB1: RGGRLSYSRRRFSTSTGRA), o al menos 4 aminoácidos que tienen cadenas laterales catiónicas o básicas que son análogos a arginina o lisina, tales como, por ejemplo, 5-hidroxisilisina, ornitina, ácido 2-amino-3 (o -4)-guanidinopropiónico, y homoarginina. Un CPP alternativo tiene una estructura anfipática y comprende un patrón alternante de aminoácidos polares/cargados y aminoácidos apolares, hidrófobos (p.ej. penetratina: RQIKIWFAQNRRMKWFF; retroinverso-penetratina: kkwkmrrnqfwvrqr; péptido de modelo anfipático: KLALKLALKLAKAALKA).

La Figura 3 ejemplifica un inhibidor dimérico que tiene un ligador según el segundo caso de la invención, que comprende un pentapéptido IETDV dimerizado, un ligador de NPEG, y un péptido CPP. El CPP es Tat (Secuencia: YGRKKRRQRRR; código de aminoácidos de 1 letra), como en Tat-NPEG4(IETDV)<sub>2</sub> (AB144), o Retroinverso-D-Tat (Secuencia: rrrqrkkkr; código de D-aminoácidos de 1 letra), como en Retroinverso-D-Tat-NPEG4(IETDV)<sub>2</sub> (AB147).

## I.iv Unión del péptido CPP al inhibidor de PSD-95 dimérico

El inhibidor de PSD-95 dimérico, según el primer caso, comprende un CPP que está unido al inhibidor por medio de un enlace químico directamente o indirectamente al átomo de nitrógeno del esqueleto del ligador de NPEG, en el que el átomo de nitrógeno puede estar colocado de manera simétrica o asimétrica en el ligador. La unión del CPP al nitrógeno del ligador de NPEG puede estar mediada por un enlace amida, un acoplamiento de maleimida, un enlace disulfuro, o grupos electrófilos amino-reactivos, seleccionados de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), éster de p-nitrofenilo, carbonato de succinimidilo, carbonato de p-nitrofenilo, succinimidil uretano, isocianato, isotiocianato, acil azida, cloruro de sulfonilo, aldehído, carbonato, imidoéster o anhídrido; y grupos tio-reactivos seleccionados de haloacetilo, derivados de haluro de alquilo, aziridina, agentes arilantes de derivados de acrililo.

De manera alternativa, la unión del CPP al nitrógeno del ligador puede estar mediada por un grupo espaciador, en el que un grupo espaciador adecuado puede ser, por ejemplo, cualquier aminoácido tal como cisteína, glicina, alanina; cadenas cortas de alcano o cadenas cortas de PEG/NPEG.

Las Figuras 3 y 15 ejemplifican inhibidores diméricos que comprenden un pentapéptido IETDV dimerizado, un ligador de NPEG, y un CPP. El CPP puede estar unido mediante un enlace amida a un ligador de NPEG simétrico, como en AB144 y AB147; o puede estar unido mediante un enlace amida a un ligador de NPEG asimétrico, como en AB144\_B y AB144\_C. De manera alternativa, un CPP que comprende una Cys C-terminal puede estar unido por medio de un acoplamiento de maleimida a un grupo maleimida que se prolonga desde el átomo de nitrógeno de NPEG, como en AB144\_D. De manera alternativa, un CPP que comprende una Cys C-terminal puede estar unido por medio de un enlace disulfuro (S-S) a un grupo sulfhidrilo que se prolonga desde el átomo de nitrógeno de NPEG, como en AB144\_E.

El inhibidor de PSD-95 dimérico, según el segundo caso, comprende un ligador de PEG, y el CPP que está unido a una cadena lateral del primer o segundo péptido o análogo de péptido. El CPP puede estar unido a una cadena lateral de un residuo (p.ej., un aminoácido) en la posición P<sup>-1</sup> del primer o segundo péptido o análogo de péptido. Preferiblemente, el CPP está unido a la cadena lateral de un residuo >P<sup>-4</sup>, o más preferiblemente un residuo P<sup>-5</sup> o P<sup>-6</sup> (p.ej., aminoácido) de un primer o segundo péptido o análogo de péptido. La unión del CPP a la cadena lateral del residuo puede estar mediada por un enlace amida, un acoplamiento de maleimida, un enlace disulfuro, o grupos electrófilos amino-reactivos, seleccionados de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), éster de p-nitrofenilo, carbonato de succinimidilo, carbonato de p-nitrofenilo, succinimidil uretano, isocianato, isotiocianato, acil azida, cloruro de sulfonilo, aldehído, carbonato, imidoéster o anhídrido; y grupos tio-reactivos seleccionados de haloacetilo, derivados de haluro de alquilo, aziridina, agentes arilantes de derivados de acrililo.

La Figura 15 ejemplifica inhibidores diméricos que comprenden un pentapéptido KETDV dimerizado, un ligador de PEG, y un CPP unido a un aminoácido en P<sup>-4</sup> (lisina) de un primer péptido (pentapéptido), como en AB144\_H. En AB144\_I, el CPP está unido a la cadena lateral del aminoácido de P<sup>-5</sup> de un primer péptido (KIETDV, hexapéptido).

## II. Afinidad del ligando de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP

Todos los inhibidores de PSD-95 diméricos de la presente invención tienen una afinidad por PDZ1-2 de PSD-95 en el intervalo nanomolar (Ejemplo 5), lo que los hace inhibidores sumamente potentes (Figura 5 y Tabla 2). Se introduce un CPP, unido a los inhibidores de PSD-95 diméricos de la invención, para mejorar el transporte del inhibidor a través de la barrera hematoencefálica. Sorprendentemente, la unión de un CPP al inhibidor de PSD-95 dimérico también aumenta su afinidad hacia PDZ1-2 de PSD-95. Esto se ejemplifica mediante AB144 y AB147 (K<sub>i</sub> = 4,6 ± 0,3 y 5,1 ± 0,4 nM, respectivamente), que mostraron una afinidad incrementada al doble respecto de AB141 (K<sub>i</sub> = 9,3 ± 1 nM), y una afinidad incrementada 1000 veces respecto del péptido Tat-NR2B9c monomérico (K<sub>i</sub> = 4600 ± 300 nM). La afinidad del inhibidor de PSD-95 dimérico hacia PDZ1-2 de PSD-95 es un factor crítico para reducir la

concentración umbral de fármaco necesaria para alcanzar un efecto terapéutico, lo cual es especialmente importante cuando el fármaco debe atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) para alcanzar su objetivo, debido a que la BBB tenderá a limitar la acumulación de concentración de fármaco en el objetivo. Sorprendentemente, una comparación de los inhibidores de PSD-95 diméricos revela que la posición y el tipo de acoplamiento del CPP al inhibidor de PSD-95 dimérico es un factor determinante clave para obtener el grado más alto de afinidad hacia PDZ1-2 de PSD-95. Así, la unión del CPP por medio de un enlace amida a un átomo de nitrógeno de un sustituyente de NPEG del ligador de PEG aumenta la afinidad hacia PDZ1-2 de PSD-95 al doble respecto de otras formas de unión al sustituyente de NPEG del ligador de PEG, tal como la unión mediante un enlace disulfuro o un acoplamiento de maleimida. Además, la unión mediante un enlace amida del CPP a un átomo de nitrógeno de un sustituyente de NPEG del ligador de PEG también aumenta la afinidad hacia PDZ1-2 de PSD-95 más del doble respecto de la unión mediante un enlace amida del CPP al primer o segundo péptido.

Los inhibidores de PSD-95 diméricos de la presente invención se unen a PDZ1 y PDZ2 de manera simultánea, lo que puede explicar su afinidad elevada hacia estos dominios. Los estudios de RMN (Ejemplo 7) confirman una estequiometría de unión 1:1 y demuestran de manera inequívoca que el primer y segundo péptido del inhibidor de PSD-95 dimérico se unen a PDZ1 o PDZ2 en PDZ1-2 con un modo de unión auténticamente bivalente.

Se puede usar la *N*-alquilación en la posición P<sup>3</sup> del primer o segundo péptido o análogo de péptido del inhibidor de PSD-95 dimérico para incrementar adicionalmente la afinidad de un péptido o análogo de péptido hacia uno o más dominios PDZ seleccionados como objetivo, y de ese modo se aumenta la capacidad de impedir las interacciones IPP que se dan con dicho objetivo.

### III. Estabilidad en plasma sanguíneo de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP

Los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP de la presente invención muestran una susceptibilidad enormemente reducida a la degradación en el plasma sanguíneo humano. Esta excelente estabilidad mejorada se observa para los inhibidores que comprenden el CPP Tat nativo, y el CPP Retroinverso-D-Tat, que de hecho no fue degradable, lo que ilustra el efecto de introducir un CPP estable a proteasas en el inhibidor de PSD-95 dimérico (Ejemplo 6).

### IV. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP

Los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP de la presente invención, a pesar del tamaño molecular relativamente grande de estos inhibidores peptídicos, tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, lo cual es importante para su función terapéutica como agentes neuroprotectores en el cerebro de un mamífero. Esta propiedad se ejemplifica para los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP, AB144 y AB147, que contienen un CPP Tat o retroinverso-D-Tat (Ejemplo 8).

### V. Propiedades neuroprotectoras *in vivo* de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP

V.i Los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP reducen los volúmenes de infarto en sujetos con isquemia cerebral focal.

Los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP de la presente invención, cuando se administran a un sujeto que padece isquemia cerebral focal, pueden reducir significativamente el daño del tejido isquémico. El efecto terapéutico de estos inhibidores de PSD-95 diméricos se ha demostrado en un modelo pMCAO de isquemia cerebral focal en ratones adultos, en el que los inhibidores se inyectaron de manera intravenosa tras la lesión, seguido de un periodo de supervivencia posquirúrgica de 6 horas o 48 horas, tras lo cual se midió el volumen del infarto (Ejemplo 9). La eficacia demostrada de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP como agente neuroprotector *in vivo* se debe al efecto sinérgico de su afinidad elevada hacia su objetivo (afinidad nanomolar hacia el dominio PDZ1-2 de PSD-95), su permeabilidad a la barrera hematoencefálica, y su elevada estabilidad *in vivo*.

Los estudios de control confirmaron que el efecto terapéutico observado tras la administración de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP a ratones que tenían isquemia cerebral focal no se debe a efectos secundarios debidos a la manipulación de los ratones y a su tratamiento (Ejemplo 9).

V.ii Los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP mejoran la función motora en sujetos con isquemia cerebral focal.

La isquemia cerebral focal inducida mediante pMCAO en ratones afecta a áreas cerebrales corticales que controlan las extremidades delanteras y traseras contralaterales, lo que incluye las patas. La administración de inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP de la invención a ratones sometidos a pMCAO preserva su función motora. Se observó que los ratones tratados mantenían toda su fuerza de agarre (ambas patas), y el análisis de su fuerza de agarre no mostró asimetría entre la pata delantera derecha e izquierda, lo que es coherente con un efecto neuroprotector. Además, los ensayos de rendimiento Rotarod demostraron que los ratones tratados mostraron una habilidad de aprendizaje a corto plazo mejorada, y el tiempo total pasado sobre la barra fue significativamente más largo (Ejemplo 10). Esta función motora mejorada y las habilidades de aprendizaje conferidas mediante el tratamiento con los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP de la invención proporcionan pruebas

adicionales del valor terapéutico de estos fármacos.

VI. Herramientas para monitorizar y evaluar las propiedades de inhibición de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP de la invención

5 VI.i Ensayo de polarización de fluorescencia (PF): como se describe más adelante, el Ejemplo 1 proporciona una manera adecuada y fiable de monitorizar y evaluar las propiedades de inhibición de un inhibidor de PSD-95 de la invención. El ensayo PF permite ensayar una amplia diversidad de análogos de péptidos y compararlos con respecto a su interacción con los dominios PDZ, y su especificidad con respecto al tándem PDZ1-2 de PSD-95. PDZ1-2 se expresa mediante el uso de tecnología de ADN recombinante habitual conocida para los expertos en la técnica. La purificación del dominio PDZ1-2 expresado se puede facilitar mediante la inclusión de un marcador de afinidad (p.ej., 10 marcador de poli-histidina, marcador de Glutation-S-transferasa, o marcador de anticuerpo, tal como marcador 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 de manera selectiva las proteínas de dominios PDZ marcados.

15 De manera más específica, el ensayo se basa en un ensayo de unión competitiva heteróloga, en el que se mide la afinidad como la  $CI_{50}$  de un análogo peptídico dado (no fluorescente) hacia un dominio PDZ en presencia de una concentración fija de un ligando dimérico con marcador fluorescente (AB143; Figura 4). Los valores de  $CI_{50}$  determinados se convierten en valores de  $K_i$  (Nikolovska-Coleska et al, Anal. Biochem. 2004, 332, pág. 261-273). El fluoróforo 5-FAM se puede unir al ligando dimérico mediante acoplamiento con HATU o HBTU. AB143 es una sonda de afinidad elevada ( $K_d = 7,8$  nM), que permite así las medidas precisas de  $K_i$  de ligandos sin marcar con afinidades en el mismo intervalo (afinidades nanomolares bajas).

20 VI.ii. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Compuestos marcados con fluorescencia para atravesar la barrera hematoencefálica, y de ese modo entrar en el cerebro. Tras la inyección de los compuestos, los ratones se perfunden con paraformaldehído, y los cerebros se extraen con cuidado, se fijan en paraformaldehído, se procesan hasta cortes frontales, y se cuantifica la fluorescencia (Ejemplo 8).

25 VI.iii. pMCAO. El ictus experimental, es decir, la oclusión permanente de MCA (pMCAO), pretende provocar una afección patológica similar a la observada en seres humanos, con el objetivo principal de estudiar los procesos celulares básicos o desarrollar terapias nuevas para el tratamiento del ictus. Los estudios han demostrado que la oclusión directa de la parte distal de la MCA en ratones es una técnica muy reproducible, y asociada a una mortalidad baja. La MCA se electrocoagula por medio de una pequeña craneotomía, que da como resultado un infarto cortical unilateral dentro de la lámina I-VI de la corteza frontal y parietal. Los volúmenes de infarto obtenidos tras pMCAO son muy reproducibles, lo que hace que este modelo sea muy adecuado para investigar el efecto terapéutico de las nuevas estrategias de tratamiento.

30 VI.iv. Ensayos de comportamiento. Un ensayo de comportamiento tiene que ser lo suficientemente sensible como para detectar las minusvalías de los animales, y proporcionar resultados que se puedan reproducir y explicar a partir de lo que se conoce sobre la afección. La lesión por ictus inducido mediante pMCAO sobre los ratones afecta a áreas cerebrales corticales que controlan las extremidades delanteras y traseras contralaterales, que incluyen las patas, por lo que se pueden usar ensayos de comportamiento (p.ej. ensayo Rotarod y de agarre) para determinar la función motora de los ratones.

VII. Métodos para la síntesis y caracterización de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP de la invención

40 VII.i Síntesis de péptidos: La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) basada en Fmoc proporciona un procedimiento adecuado para la síntesis de los restos de péptidos de unión a PDZ y CPPs, por lo que se puede preparar un inhibidor de PSD-95 dimérico de la invención, y para la producción de compuestos de control monoméricos. Los péptidos con un residuo de aminoácido C-terminal natural, tal como Val, se pueden sintetizar partiendo de resinas Wang precargadas. En el caso de los péptidos que tienen una cisteína C-terminal, se puede 45 usar una resina de cloruro de 2-clorotritilo, en la que el residuo se carga en la resina mediante el uso de diisopropiletilamina (DIPEA) (resina/aminoácido/DIPEA en 1:3:10) en DCM durante 2 horas, después se bloquea con metanol, antes de la desprotección de Fmoc y el acoplamiento del residuo de aminoácido consecutivo. Se proporciona una descripción detallada de un protocolo de SPPS basado en Fmoc adecuado más adelante en el Ejemplo 1. Los métodos para la *N*-alquilación de péptidos se describen en el documento WO2010/004003.

50 VII.ii Síntesis del ligador de NPEG: Los *N*s-NPEG4-diácido-ligadores se sintetizan mediante química en fase sólida como se describe en el Ejemplo 1. La presente invención proporciona un ligador que comprende un PEG-diácido, en el que un átomo de oxígeno del esqueleto del ligador de PEG-diácido está sustituido por un átomo de nitrógeno para proporcionar NPEG-diácido. En un caso adicional, el átomo de nitrógeno del NPEG-diácido está unido a un grupo protector. Los grupos protectores adecuados incluyen *o*-nitrobenenosulfonilo (Abreviado: *o*NBS o *N*s), 55 *p*-nitrobenenosulfonilo (*p*NBS), 2,4-Dinitrobenenosulfonilo (*d*NBS). Además, se pueden usar otros grupos *N*-protectores tales como  $\alpha,\alpha$ -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxycarbonilo (Ddz), 2-nitrofenilsulfenilo (*N*ps), 2-(4-bifenil)isopropoxycarbonilo (Bpoc), trifenilmetilo (tritulo, *Trt*), benciloxycarbonilo (*Z*), 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-etilo (Dde), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo

(ivDde), 2,2,2-tricloroetiloxycarbonilo (Troc), aliloxycarbonilo (Alloc), *p*-nitrobenciloxycarbonilo (*p*NZ), *o*-nitrobenciloxycarbonilo (*o*NZ) y 6-nitroveratriloxy-carbonilo (NVOC), azidometoxycarbonilo (Azoc), *tert*-butiloxycarbonilo (Boc), carbamato de 2-trimetilsililetilo (Teoc) y 2-clorobenciloxycarbonilo (Cl-Z).

5 El número de restos de etilen glicol (n) en el PEG y NPEG-diácido puede ser de n1-28, o el ligador puede tener una longitud de n= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 restos de etilen glicol.

VII.iii Síntesis de ligandos diméricos: Los ligandos diméricos se pueden producir activando los Ns-NPEG4-diácido-ligadores o el PEG4-diácido-ligador *in situ* con reactivos de acoplamiento, tales como HBTU y HATU, seguido de la incubación con el grupo amino *N*-terminal del ligando peptídico unido a la resina. Mediante el uso de este procedimiento, se limita el procedimiento de dimerización a una reacción de una etapa.

10 VII.iv Análisis químico: Los compuestos se analizan mediante ESI-LC/MS, HPLC analítica, y espectrometría de masas de alta resolución, mediante el empleo de técnicas muy conocidas para el experto, y ejemplificadas en el Ejemplo 1.

15 VIII. Inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP según el primer o segundo caso de la descripción que comprende la invención para el tratamiento terapéutico de trastornos relacionados con la excitotoxicidad tales como ictus isquémico o lesión traumática

20 En las sinapsis neuronales, los extremos C-terminales de las subunidades de los receptores de NMDA interactúan con los dominios PDZ de PSD-95 asociándolos a moléculas de señalización neurotóxicas posteriores (p.ej., nNOS), lo que conduce a la producción de NO y a la excitotoxicidad. La presente invención proporciona inhibidores que pueden bloquear los receptores de NMDA y la interacción de nNOS en una célula, sin afectar a las corrientes iónicas del receptor de NMDA y a las funciones de señalización del calcio del receptor de NMDA. Así, un inhibidor de PSD-95 dimérico que contiene CPP de la invención actúa como un agente neuroprotector de una o más células o tejidos, lo que proporciona una estrategia específica para tratar trastornos excitotóxicos, que incluyen lesión de la médula espinal, ictus, lesión cerebral traumática, lesión isquémica del sistema nervioso central (SNC), epilepsia, enfermedades neurodegenerativas del SNC.

25 El tratamiento terapéutico de sujetos en riesgo o que padecen en el presente los trastornos y enfermedades anteriores se puede dar como un tratamiento profiláctico para reducir el riesgo de inicio del trastorno o enfermedad, o como un tratamiento terapéutico tras el inicio del trastorno o enfermedad. El sujeto puede ser un mamífero o paciente humano.

IX. Inhibidores de PSD-95 diméricos para el tratamiento terapéutico del dolor

30 Se demuestra sorprendentemente que los inhibidores de PSD-95 diméricos de la presente invención son eficaces en la reducción del dolor en un sujeto (mamífero o paciente humano) y, además, que se pueden usar estos inhibidores en el tratamiento terapéutico, ya que no provocan ningún efecto secundario perjudicial simultáneo sobre la función cognitiva y motora del sujeto. El dolor a tratar puede ser dolor crónico, que puede ser dolor neuropático crónico o dolor inflamatorio crónico. El dolor neuropático puede estar inducido por el daño del sistema nervioso periférico o central como resultado de una lesión traumática, cirugía, o enfermedades tales como diabetes o trastornos autoinmunitarios. Cuando el dolor persiste, la afección es dolor neuropático crónico. El dolor inflamatorio crónico se puede inducir por la inflamación tras una lesión neurológica, así como iniciarse por la inflamación inducida por materia exógena, en la que los mediadores liberados por las células inmunitarias provocan una sensibilización de las rutas del dolor, es decir, una "sumación temporal" de las neuronas sensoriales localizadas en la médula espinal. Así, un fármaco analgésico eficaz debe ser capaz de alcanzar el tejido de la médula espinal y hallar su objetivo, en este caso PSD-95, para tener un efecto analgésico. De ese modo, los compuestos deben ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y/o la barrera hematomedular para poder alcanzar el tejido de la médula espinal. Un inhibidor de PSD-95 dimérico adecuado para tratar el dolor crónico comprende un primer péptido o análogo de péptido unido a un segundo péptido o análogo de péptido mediante un ligador, en el que el primer y el segundo péptido o análogo de péptido comprenden al menos cuatro residuos unidos por amida que tienen la secuencia YTXV o YSXV, en la que Y se selecciona de E, Q, y A, o un análogo del residuo seleccionado, y X se selecciona de A, Q, D, N, *N*-Me-A, *N*-Me-Q, *N*-Me-D, y *N*-Me-N o un análogo del residuo seleccionado. Los ejemplos de inhibidores de PSD-95 diméricos adecuados incluyen AB125 y AB122 que tienen la estructura PEG6(IESDV)<sub>2</sub> [que corresponde al compuesto 77 del documento WO2010/004003] y AB123 que tiene la estructura PEG4(IESDV)<sub>2</sub> [que corresponde al compuesto 78 del documento WO2010/004003] y AB141 [que tiene un ligador de NPEG]. Estos compuestos son capaces sorprendentemente de alcanzar su objetivo, PSD-95, en la médula espinal (Ejemplo 12), a pesar de tener estructuras químicas hidrófilas y grandes, y a pesar de no estar unidos a un CPP - ya que éstas son propiedades que normalmente impiden que los compuestos atraviesen la barrera hematoencefálica y/o la barrera hematomedular, y así impiden que los compuestos entren en el SNC. Además, el inhibidor puede comprender adicionalmente un tercer péptido, en el que dicho tercer péptido es un CPP que tiene propiedades de penetración celular unido al inhibidor, lo que proporciona un inhibidor de la presente invención.

X. Efectos analgésicos in vivo de los inhibidores de PSD-95 diméricos para el tratamiento terapéutico del dolor crónico

El antagonismo de los receptores de NMDA muestra una acción anti-nociceptiva en seres humanos y modelos animales de dolor crónico, pero está asociado a alteraciones graves de la función cognitiva y motora.

5 La ausencia de efectos secundarios perjudiciales de AB125 y AB144 en comparación con el antagonista selectivo de receptores de NMDA, MK-801, en la hiperalgesia mecánica se demuestra en el modelo de adyuvante completo de Freund (CFA) de dolor inflamatorio crónico. Una reducción de los efectos secundarios de los inhibidores de PSD-95 diméricos se demuestra comparando los efectos de AB125 y MK-801 en el ensayo de transmisión social de preferencia alimentaria (STFP) de memoria a largo plazo y el ensayo de laberinto en Y modificado de atención, así como en el ensayo Rotarod de rendimiento motor.

10 Cuando se administraron de manera concurrente con CFA, MK-801, AB125, y AB144 previnieron el desarrollo de hiperalgesia mecánica inducida por CFA 1 hora y 24 horas después del tratamiento (Figura 17, 18, 23; Ejemplo 11). Además, se descubrió que AB125 invertía la hiperalgesia inducida por CFA cuando se administró 24 horas después del tratamiento con CFA, un efecto que duró durante al menos 3 días (Figura 19; Ejemplo 11). A la dosis que reducía la hiperalgesia, MK-801 indujo déficits cognitivos en los ensayos de laberinto en Y modificado y STFP, así como déficits motores en el ensayo Rotarod. Sorprendentemente, incluso las dosis elevadas de AB125 estuvieron desprovistas de efectos secundarios en estos ensayos (Figura 20-22; Ejemplo 11). Los datos demuestran que los inhibidores de PSD-95 diméricos, sin (AB125) y con (AB144) un CPP, son eficaces en la prevención e inhibición del desarrollo de dolor inflamatorio crónico, mientras se evitan los efectos secundarios relacionados con el antagonismo del receptor de NMDA sobre la función cognitiva y motora.

XI. Fabricación de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de PSD-95

Las formulaciones de un inhibidor de PSD-95 dimérico o un inhibidor de PSD-95 dimérico que contiene CPP de la presente invención en composiciones farmacéuticas es muy conocida en la técnica, y se describe 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 en general de alrededor del 0,1 al 90% en peso (tal como alrededor del 1 al 20% o alrededor del 1 al 10%) del inhibidor de PSD-95 de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

Las composiciones adecuadas para administración oral se pueden formular combinando un inhibidor de PSD-95 dimérico o un inhibidor de PSD-95 dimérico que contiene CPP de la invención con un vehículo adecuado en forma de un comprimido, pildora, gragea, cápsula, líquido, gel, jarabe, suspensión espesa, suspensión para ingestión oral por parte del sujeto a tratar. Para las formulaciones orales/rectales sólidas, los excipientes adecuados incluyen rellenos tales como carbohidratos (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 de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidina; agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Opcionalmente, se pueden incluir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidina reticulada, agar, o ácido algínico o una sal de alginato sódico. La formulación sólida puede incluir además un revestimiento entérico.

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

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

55 También se puede formular un inhibidor de PSD-95 dimérico o un inhibidor de PSD-95 dimérico que contiene CPP de la invención en forma de una preparación de liberación lenta de acción prolongada. 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 en forma de un derivado escasamente soluble, tal como una sal escasamente

soluble.

También se pueden usar liposomas y emulsiones para administrar el inhibidor de PSD-95 dimérico o un inhibidor de PSD-95 dimérico que contiene CPP. Además, el inhibidor se puede administrar por medio de un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semi-permeables de polímeros sólidos que comprenden el inhibidor.

- 5 El porcentaje óptimo del agente terapéutico en cada formulación farmacéutica varía según la formulación propiamente dicha y el efecto terapéutico deseado en las patologías específicas y los regímenes terapéuticos correlacionados.

## XII. Modo de administración de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de PSD-95

- 10 Se pueden usar métodos convencionales, conocidos para los expertos habituales en la técnica de la medicina, para administrar las composiciones al sujeto o paciente, y se pueden suministrar para el uso en forma de un equipo. Estos incluyen, pero sin limitación, las vías subcutánea, intrapulmonar, transmucosa, intravenosa, intraperitoneal, intrauterina, sublingual, intratecal, o intramuscular, mediante el uso de métodos/medios habituales para la administración [lo que incluye inyección, catéter, en el que el equipo puede incluir un dispositivo de inyección, un dispositivo para administrar una preparación de liberación lenta inyectable, o un catéter]. Además, las formulaciones farmacéuticas se pueden administrar al paciente por medio de vías de administración de liberación lenta inyectables tales como mediante el uso de materiales y métodos inyectables o biodegradables de liberación lenta de 1, 3, o 6 meses.

- 20 Independientemente de la vía de administración, un inhibidor de PSD-95 dimérico o un inhibidor de PSD-95 dimérico que contiene CPP de la presente invención se administra en general a una dosis diaria de alrededor de 0,01 mg a alrededor de 120 mg/kg de peso corporal del paciente (p.ej., 1 mg/kg a 20 mg/kg). La formulación farmacéutica se puede administrar en dosis múltiples por día, si se desea, para alcanzar la dosis diaria total deseada.

- 25 Se pueden usar métodos convencionales, conocidos para los expertos habituales en la técnica de la medicina, para administrar la(s) formulación(es) farmacéutica(s) de la presente invención al paciente. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar solas, o en combinación con otros agentes terapéuticos o intervenciones. De manera específica, las composiciones de la presente invención pueden comprender además una diversidad de agentes de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Síntesis de inhibidores diméricos de PSD-95

#### 1.1 Síntesis del Ns-NPEG4-diácido-ligadorA-C (Esquema 1 - Figura 16)

- 30 Para la síntesis de Ns-NPEG4-diácido-ligadorA (3; Esquema 1), se lavó una resina de cloruro de 2-clorotritilo (3 mmol, 1,90 g) y se dejó hinchar (20 min) en DMF. Se cargó Fmoc-NH-PEG<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (1, Esquema 1; Biomatrik Inc., Jiaxing, China) en la resina añadiendo 1 (2 mmol, 800 mg) en DMF (8 mL) a la resina drenada, seguido de DIPEA (10 mmol, 1,75 mL). Después de agitar durante 60 min, se añadió metanol (1 mL, 25 mmol), y se continuó con la agitación durante otros 5 min. La resina cargada se drenó y se lavó a fondo con DMF (10-15 lavados, cada uno de 10 mL), y el grupo Fmoc se desprotegió con un 20% de piperidina en DMF durante 5 min y 15 min con un lavado con DMF en medio, seguido de un lavado con DMF y THF. La resina se dejó hinchar en DIPEA (12 mmol, 2,1 mL) y THF (8 mL) durante 15 min, y se añadió cloruro de *orto*-nitrobenzenosulfonilo (NsCl, 8 mmol, 1,78 g) en DCM (5 mL) lentamente mientras se agitaba suavemente la resina. Después de 4 horas, la resina se drenó y se lavó consecutivamente con THF, MeOH, DCM, y THF. El grupo amino libre unido a la resina se alquiló con el alcohol HO-PEG<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu (2, Esquema 1; Biomatrik Inc., Jiaxing, China) comenzando por vaciar el recipiente de reacción y añadiendo un globo de nitrógeno. La resina (1 eq., 2 mmol) se trató con trifetilfosfina (PPh<sub>3</sub>, 10 mmol, 2625 mg) en THF (5 mL) y 2 (10 mmol, 2,34 g) en THF (5 mL). El azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) (10 mmol, 2,02 g, 1,97 mL) se añadió gota a gota, y se retiró el globo antes de agitar durante 1 hora. La resina se lavó a fondo con THF y DCM, se secó a vacío y se trató con TFA/triisopropilsilano/H<sub>2</sub>O (90/5/5, 20 mL) durante 2,5 horas. Se recogió la mezcla en TFA y la resina se lavó con TFA y DCM antes de evaporar y co-evaporar las fracciones combinadas de TFA/DCM con éter (2x30 mL). El material resultante se disolvió en agua/MeCN (75/25, 100 mL) y se liofilizó para obtener Ns-NPEG4-diácido-ligadorA (3, Esquema 1) en forma de un aceite naranja, que se usó directamente en la síntesis de ligandos de NPEG4 diméricos. Rendimiento: 80%. m/z (ESI) 540,1 (22%), 523,1 (M<sup>+</sup>+H, 100), 505,1 (11), 433,0 (7,3), 365,2 (7,4).

- 50 El procedimiento usado para la síntesis de Ns-NPEG4-diácido-ligadorA se usó también para sintetizar Ns-NPEG4-diácido-ligadorB y Ns-NPEG4-diácido-ligadorC (6 y 9, respectivamente; Esquema 1). Para producir Ns-NPEG4-diácido-ligadorB (6), se usaron bloques de Fmoc-NH-PEG<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (4; Biomatrik Inc., Jiaxing, China) y HO-PEG<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu (5; Biomatrik Inc., Jiaxing, China) (Esquema 1). Rendimiento: 54%. m/z (ESI) 596,2 (22%), 523,2 (M<sup>+</sup>+H, 100), 505,1 (15), 433,1 (8).

- 55 Para producir Ns-NPEG4-diácido-ligadorC (9), se usaron bloques de Fmoc-beta-alanina (7; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) y HO-PEG<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu (8; IRIS Biotech, Marktredwitz, Alemania) (Esquema 1). Rendimiento: 45%.

m/z (ESI) 596,2 (51%), 523,1 ( $M^+ + H$ , 100), 506,1 (14), 433,1 (55).

### 1.2 Síntesis de los restos peptídicos de los inhibidores diméricos de PSD-95

Los péptidos (p.ej. IETDV o IETAV) se sintetizaron mediante química de péptidos en fase sólida basada en Fmoc mediante el uso de una resina precargada Fmoc-Val-Wang (0,6-0-7 mmol/g, malla 100-200), HBTU/DIPEA para los acoplamientos, y DMF seco como disolvente. Cada acoplamiento se llevó a cabo durante 40 min con una estequiometría 1/4/3,9/8 de resina/Fmoc-aminoácido/HBTU/DIPEA, y se analizó de manera cualitativa mediante el ensayo de ninhidrina. La desprotección de Fmoc se llevó a cabo en un 20% de piperidina en DMF durante 5 min, seguido de lavado con DMF y un segundo tratamiento con piperidina/DMF durante 15 min.

### 1.3 Síntesis de los ligandos diméricos basados en NPEG4 AB141, AB144 y AB147 (Figura 2 y 3)

El Ns-NPEG4-diácido-ligadorA (3, Esquema 1; 0,1 eq., 0,025 mmol) se pre-activó con HBTU (0,2 eq, 0,05 mmol) y DIPEA (0,4 eq, 0,1 mmol) y se añadió a IETDV unido a resina Wang desprotegida de Fmoc (1 eq, 0,25 mmol) en un volumen total de 4 mL de DMF. La reacción se agitó durante 45 min y se repitió 5 veces. El grupo Ns se eliminó añadiendo DBU (0,5 mmol) en DMF (2 mL) seguido de mercaptoetanol (0,5 mmol) en DMF (2 mL). La reacción se agitó durante 30 min y se lavó en DMF. El tratamiento con mercaptoetanol/DBU se repitió una vez, y la resina se lavó consecutivamente con DMF, DCM, MeOH y DCM para proporcionar AB141 unido a la resina. Para AB144 y AB147, el primer aminoácido del CPP (L- o D-Arg, respectivamente) se acopló al nitrógeno mediante seis acoplamientos consecutivos de Fmoc-Arg(Pbf)-OH. Para cada acoplamiento, se activó Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0,5 mmol) mediante HATU en DMF (2 mL, 0,244 M) y colidina (132  $\mu$ L), antes de añadirlo a la resina drenada. Después de 40 minutos de agitación y un lavado con DMF, se repitió el acoplamiento y el lavado con DMF 5 veces, seguido de un lavado a fondo con DMF. Se eliminó Fmoc con un 20% de piperidina en DMF, se sintetizó la secuencia Tat- o Retroinverso-D-Tat restante como se describió para la síntesis de péptidos, y se eliminó el grupo Fmoc final.

### 1.4 Síntesis de los ligandos diméricos basados en NPEG4 AB144-B y AB144-C (Figura 15)

Se sintetizaron AB144\_B y AB144\_C como se describió para AB144, excepto porque se usó Ns-NPEG4-diácido-ligadorB y Ns-NPEG4-diácido-ligadorC, respectivamente, en vez de Ns-NPEG4-diácido-ligadorA.

### 1.5 Síntesis de los ligandos diméricos basados en NPEG4 AB144-D y AB144-E (Figura 15)

La síntesis de AB144\_D y AB144\_E fue como se describió para AB144 hasta el punto en el que se proporciona AB141 unido a la resina. Se acopló Fmoc-Gly-OH al átomo de nitrógeno del ligador de NPEG4 mediante seis acoplamientos consecutivos con HBTU/DIPEA como se describió anteriormente en la sección de síntesis de péptidos, 1.2. Tras la eliminación de Fmoc con piperidina/DMF, se acopló *N*-Maleoil- $\beta$ -alanina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) (HBTU/DIPEA) a la mitad de la resina, que se secó posteriormente a vacío y se trató con mezcla de escisión TFA/tioanisol/ $H_2O$ /anisol 90/5/3/2 (v/v/v/v) para proporcionar un intermedio de dímero de maleimida en bruto. En paralelo, el péptido 12-mérico Tat-Cys (Secuencia: YGRKKRRQRRRC) se preparó mediante síntesis de péptidos basada en Fmoc estándar partiendo de una resina de cloruro de 2-clorotritilo cargada con Fmoc-Cys(Trt)-OH, seguido de la escisión de la resina. AB144\_D se sintetizó a continuación mezclando 0,05 mmol de intermedio de dímero de maleimida en bruto con 0,06 mmol de Tat-Cys en bruto en 10 mL de acetonitrilo y 50 mL de tampón TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, desgasificado) a temperatura ambiente, el pH se ajustó a 7 con NaOH (0,2 M), y la mezcla de reacción se incubó durante 90 minutos. La mezcla se liofilizó después y se proporcionó AB144\_D puro mediante purificación por HPLC.

Para AB144\_E, se acopló Boc-Cys(Npys)-OH con HBTU/DIPEA en el residuo de glicina del ligando dimérico unido a la resina, en vez de *N*-Maleoil- $\beta$ -alanina como para AB144\_D (véase anteriormente). La resina se secó a vacío y se trató con mezcla de escisión de TFA/tioanisol/ $H_2O$ /anisol 90/5/3/2 (v/v/v/v) para proporcionar el intermedio de dímero de Cys(Npys) en bruto. Este intermedio (0,026 mmol) se hizo reaccionar con Tat-Cys (0,030 mmol) en 50 mL de tampón Tris-HCl/EDTA (Tris-HCl 0,5 M, EDTA 5 mM, pH 7,5, desgasificado) a temperatura ambiente durante 60 min. La mezcla se liofilizó y se proporcionó AB144\_E puro mediante purificación por HPLC.

### 1.6 Síntesis de los ligandos diméricos basados en PEG4 AB144-H y AB 144-I

Los compuestos AB144\_H y AB144\_I se sintetizaron a partir de una resina Val-Wang precargada partiendo de la producción de las secuencias de péptidos unidas a la resina, K(Dde)ETDV y K(Dde)IETDV, respectivamente [las cadenas laterales de E, T, D se protegen con grupos *terc*-butilo mientras el compuesto está unido a la resina; K se protege con Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etilo], como se describe en la sección de "Síntesis de péptidos (General)". El proceso de dimerización en la resina se llevó a cabo con el ligador de PEG4-diácido (IRIS Biotech, Marktredwitz, Alemania) como se describió previamente (documento WO2010/004003). A continuación, se eliminó Dde tratando la resina con monohidrato de hidrazina recién preparado (2% en DMF) durante 5 minutos, seguido de un lavado con DMF y otro tratamiento con hidrazina durante 10 minutos. La resina se lavó a fondo con DMF, 10% de DIPEA en DMF (5x2 minutos), DCM, y DMF consecutivamente. La secuencia Tat se sintetizó a partir del grupo amino liberado en la cadena lateral de lisina mediante el uso de HATU/Colidina y eliminación estándar de Fmoc con piperidina/DMF.

Ejemplo 2. Síntesis de análogos marcados de los inhibidores diméricos de PSD-95

2.1 Síntesis de análogos marcados con fluoróforo (AB143, AB145, AB148, MS23)

Se prepararon ligandos fluorescentes acoplado 5-FAM (5-carboxifluoresceína; Anaspec, San Jose, CA, EE.UU.) al grupo amino *N*-terminal del AB144, AB147, o Tat-NR2B9c finales y desprotegidos de Fmoc, mientras estaban unidos a la resina, para producir AB145, AB148, y MS23, respectivamente. De forma similar, se acopló 5-FAM a AB141 unido a la resina, desprotegido de Ns, para producir AB143. 5-FAM se acopló en una proporción 1/2/2/3 de sitios *N* de resina/5-FAM/HATU/colidina en un total de 2 mL de DMF a una escala 0,07 mmol (molar de *N*PEG-ligador). Para AB145, AB148, o MS23, el tiempo de acoplamiento fue 6 horas. Para AB143, 5-FAM se acopló mediante dos acoplamientos consecutivos de 6 y 16 horas, respectivamente.

2.2 Síntesis de ligando dimérico marcado con <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C de PSD-95

Se sintetizó [<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C]-PEG4(IETAV)<sub>2</sub> (AB140) mediante el uso de aminoácidos protegidos con Fmoc que contenían átomos de aminoácidos completamente marcados con <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, EE.UU.). Los bloques de construcción de aminoácidos para Thr y Glu se protegieron en la cadena lateral con grupos *tert*-butilo. Se disolvió Fmoc-Val-OH marcado (0,125 mmol, 43 mg) en DMF (1,5 mL) y se cargó en la resina de cloruro de 2-clorotritilo (0,1875 mmol, 119 mg) que se había dejado hinchar en DMF (2 mL) durante 20 min y se había drenado. Se añadió DIPEA (0,625 mmol, 109 µL) y se continuó con la agitación durante 60 min. Se añadió MeOH (100 µL), y se continuó con la agitación durante 15 min, y la resina se lavó con DMF. Fmoc se eliminó con piperidina/DMF, y se sintetizó adicionalmente IETAV marcado mediante el uso de condiciones de acoplamiento y estequiometrías de 1/2/2/3 de resina/Fmoc-aminoácido/HATU/colidina en DMF (1 mL) durante 40 min. Tras la eliminación final de Fmoc, la resina se lavó con DMF y DCM, se secó a vacío y se usó adicionalmente para preparar AB140 mediante el proceso de dimerización en resina con el ligador de PEG4-diácido (sin marcar) (IRIS Biotech, Marktredwitz, Alemania) descrito previamente (documento WO2010/004003).

Ejemplo 3. Purificación y caracterización de los inhibidores de PSD-95 diméricos de PSD-95 y los derivados marcados de los mismos

Los compuestos sintetizados, que incluyen los inhibidores de PSD-95 diméricos y los derivados de los mismos, se obtuvieron en forma de sales de TFA tratando los productos unidos a la resina con ácido trifluoroacético (TFA)/trisisopropilsilano/H<sub>2</sub>O (90/5/5) durante 2 horas (a menos que se especifique de otra manera), evaporación a vacío, precipitación con éter frío, liofilización, y purificación con cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) preparativa. Los compuestos se caracterizaron mediante HPLC analítica y espectrometría de masas (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización de compuestos. <sup>1</sup>Se indica el ión más abundante (ESI-LC/MS). <sup>2</sup>Se llevó a cabo HPLC analítica (UV<sub>218</sub>) y ESI-LC/MS (ELSD) para todos los compuestos para determinar la pureza. <sup>3</sup>La parte del péptido, IETAV, está marcada con [<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C].

Compuestos	Fórmula	PM	m/z <sup>1</sup>	Pureza <sup>2</sup>
IETDV	C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>11</sub>	575,6	576,4 [M+H] <sup>+</sup>	>98%
AB141	C <sub>60</sub> H <sub>105</sub> N <sub>11</sub> O <sub>24</sub>	1364,5	1364,7 [M+H] <sup>+</sup>	>98%
AB144	C <sub>126</sub> H <sub>221</sub> N <sub>43</sub> O <sub>41</sub>	2994,4	599,8 [M+5H] <sup>+</sup>	>98%
AB147	C <sub>115</sub> H <sub>209</sub> N <sub>41</sub> O <sub>38</sub>	2774,1	555,9 [M+5H] <sup>+</sup>	>98%
Tat-NR2B9c	C <sub>105</sub> H <sub>188</sub> N <sub>42</sub> O <sub>30</sub>	2518,9	504,7 [M+5H] <sup>+</sup>	>98%
AB143	C <sub>81</sub> H <sub>115</sub> N <sub>11</sub> O <sub>30</sub>	1722,8	862,1 [M+2H] <sup>+</sup>	>98%
AB145	C <sub>147</sub> H <sub>231</sub> N <sub>43</sub> O <sub>47</sub>	3352,7	671,5 [M+5H] <sup>+</sup>	>98%
AB148	C <sub>136</sub> H <sub>219</sub> N <sub>41</sub> O <sub>44</sub>	3132,4	627,5 [M+5H] <sup>+</sup>	>98%
MS23	C <sub>126</sub> H <sub>198</sub> N <sub>42</sub> O <sub>36</sub>	2877,2	576,4 [M+5H] <sup>+</sup>	>98%
AB140 <sup>3</sup>	C <sub>60</sub> H <sub>104</sub> N <sub>10</sub> O <sub>25</sub>	1421,1	711,2 [M+2H] <sup>+</sup>	>98%
AB144_B	C <sub>126</sub> H <sub>221</sub> N <sub>43</sub> O <sub>41</sub>	2994,4	599,8 [M+5H] <sup>+</sup>	95%
AB144_C	C <sub>126</sub> H <sub>221</sub> N <sub>43</sub> O <sub>41</sub>	2994,4	599,8 [M+5H] <sup>+</sup>	95%
AB144_D	C <sub>138</sub> H <sub>236</sub> N <sub>46</sub> O <sub>47</sub> S	3323,7	665,7 [M+5H] <sup>+</sup>	>98%
AB144_E	C <sub>134</sub> H <sub>234</sub> N <sub>46</sub> O <sub>45</sub> S <sub>2</sub>	3273,7	655,8 [M+5H] <sup>+</sup>	96%
AB144_H	C <sub>190</sub> H <sub>338</sub> N <sub>76</sub> O <sub>55</sub>	4567,2	508,4 [M+9H] <sup>+</sup>	96%
AB144_I	C <sub>202</sub> H <sub>360</sub> N <sub>78</sub> O <sub>57</sub>	4793,5	533,5 [M+9H] <sup>+</sup>	95%

Para los experimentos *in vivo*, los compuestos se prepararon en forma de sales de HCl incubando las sales de TFA de los compuestos con HCl ac. helado (50 mM; exceso molar de 3 veces de HCl respecto de TFA) durante 20 min seguido de liofilización.

### 3.1 RP-HPLC preparativa:

- 5 Los compuestos se purificaron en un sistema Agilent 1200 con una columna de fase inversa C18 (Zorbax 300 SB-C18, 21,2x250 mm) mediante el uso de un gradiente lineal de H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA (A: 95/5/0,1 y B: 5/95/0,1) y un caudal de 20 mL/min.

### 3.2 ESI-LC/MS:

- 10 Los espectros de masas se obtuvieron con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6410 mediante el uso de ionización por electronebulización (ESI), acoplado a un sistema de HPLC Agilent 1200 (ESI-HPLC-MS) con una columna de fase inversa C18 (Zorbax Eclipse XBD-C18, 4,6x50 mm), detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD, Sedere Sedex 85) y un detector de matriz de diodos (UV) mediante el uso de un gradiente lineal de H<sub>2</sub>O/MeCN/Ácido Fórmico (A: 95/5/0,1 y B: 5/95/0,086) con un caudal de 1 mL/min.

- 15 3.3 RP-HPLC analítica: Las purezas de los compuestos se determinaron mediante un sistema Agilent 1100 con una columna de fase inversa C18 (columna Zorbax 300 SB-C18, 4,6x150 mm) mediante el uso de un gradiente lineal de H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA (A: 95/5/0,1 y B: 5/95/0,1) y un caudal de 1 mL/min.

3.4 Espectros de masas de alta resolución (HRMS): Los HRMS se obtuvieron para AB144 y AB147 mediante el uso de ionización por electronebulización (ESI) y un instrumento Micromass Q-Tof2.

### Ejemplo 4. Expresión y purificación de PDZ1-2 de PSD-95

- 20 El cADN que codifica el tándem PDZ1-2 de PSD-95 (que corresponde a los residuos 61-249 de PSD95 $\alpha$  humano de longitud completa sin el exón 4b) se amplificó mediante PCR inversa y se clonó en un vector pRSET marcado con His modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El péptido PDZ1-2 codificado comprendió además la secuencia MHHHHHPRGS, que se usó como marcador para la purificación (marcador de His), y las secuencias codificantes de ADN y las proteínas codificadas se denominan como sigue: ADN de HIS-PDZ1-2 [SEQ ID N°: 1] que codifica la
- 25 proteína HIS-PDZ1-2 [SEQ ID N°: 2]. Se transformaron bacterias *E. coli* competentes (BL21 - DE3, pLysS) con una construcción que expresaba PDZ1-2 y se cultivaron durante la noche en placas de agar que contenía ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y cloranfenicol (35  $\mu$ g/mL) a 37 °C. Las colonias se recogieron y se usaron para inocular cultivos bacterianos (medio LB con 50  $\mu$ g/mL de ampicilina). Estos se agitaron mientras se incubaban a 37 °C hasta que la A<sub>600</sub> del cultivo alcanzó 0,45, en cuyo punto se añadió isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido 1 mM. Los cultivos inducidos se
- 30 incubaron durante la noche a 30 °C (PDZ1-2). Las células se recogieron centrifugando a 10.000 g durante 10 min a 4 °C, y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, PMSF 1 mM, 25  $\mu$ g/ml de ADNasa, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mM). Las células se destruyeron mediante el uso de un aparato de ruptura de células a 6,9 MPa. El lisado celular se centrifugó a 35.000 g durante 1 hora, y el sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45  $\mu$ m y de 0,22  $\mu$ m. La purificación del péptido PDZ1-2 expresado se llevó a cabo primero con una columna cargada con níquel (II) (HisTrap™ HP, GE Healthcare, R.U.) equilibrada con tampón Tris (tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,5), seguido de
- 35 filtración en gel. Para la filtración en gel, la muestra de PDZ1-2 se cargó en una columna Superdex™ 75 HR 10/30 (GE Healthcare, R.U.) equilibrada con tampón Tris (Tris/HCl 20 mM, pH 7,5) con un caudal constante de 0,5 mL/min. Las fracciones relevantes se analizaron en un gel de SDS-PAGE teñido mediante un protocolo estándar de tinción de plata. La purificación final se analizó mediante ionización por electronebulización-cromatografía
- 40 líquida-espectrometría de masas (ESI-LC/MS) para conseguir el peso molecular exacto, y de ese modo verificar la identidad del dominio PDZ1-2. Los coeficientes de extinción molar se hallaron mediante análisis de aminoácidos (Alphalyse, Odense, Dinamarca) y después se usaron para medir las concentraciones de proteínas. Para los estudios de RMN, se expresó [<sup>15</sup>N]PDZ1-2 marcado de manera uniforme realizando el cultivo bacteriano en medios M-9 seguido de purificación como se describió anteriormente.

- 45 Ejemplo 5. Inhibidores de PSD-95 diméricos de afinidad incrementada hacia el dominio PDZ de PSD-95

5.1 Ensayo de polarización de fluorescencia (PF) para determinar la afinidad de los ligandos (inhibidores de PSD-95 diméricos) hacia el dominio PDZ de PSD-95

- Se desarrolló un ensayo de medida de la afinidad *in vitro* basado en el principio de polarización de fluorescencia para proporcionar las constantes de afinidad (valores de  $K_i$ ) entre los ligandos sintetizados (p.ej., inhibidores
- 50 diméricos) y PDZ1-2 de PSD-95. En primer lugar, la afinidad entre la sonda de NPEG4(IETAV)<sub>2</sub> marcada con 5-FAM, denominada AB143 (Figura 4), y PDZ1-2 se estableció mediante un experimento de unión de saturación, en el que se añadieron concentraciones crecientes de PDZ1-2 a una concentración fija (0,5 nM) de la sonda. El ensayo se llevó a cabo en tampón TBS (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4) en placas de 384 pocillos negros, de fondo plano (Corning Life Sciences, NY, EE.UU.). Tras la incubación durante 10 min a temperatura ambiente, se midió la
- 55 polarización de fluorescencia de las muestras en un lector de placas Safire2 (Tecan, Mannedorf, Suiza) a valores de excitación/emisión de 470/525 nm. Los valores de polarización de fluorescencia se ajustaron a la ecuación  $Y = B_{\max} \times X / (K_d + X)$ , en la que  $B_{\max}$  es el valor de polarización de fluorescencia máxima,  $X$  es la concentración de PDZ1-2, e

Y es el valor de polarización de fluorescencia.  $K_d$  se obtuvo directamente de la curva de saturación por ser igual a la concentración de PDZ1-2 en la semi-saturación, y se halló que era  $7,8 \pm 0,11$  nM, que está de acuerdo con el valor de  $K_i$  hallado para su ligando no fluorescente ("frío") correspondiente, AB141 ( $K_i = 9,3 \pm 1$  nM). Las afinidades entre los compuestos no fluorescentes y PDZ1-2 se determinaron mediante competición heteróloga, en la que se añadieron concentraciones crecientes del compuesto a una concentración fija de sonda (0,5 nM) y PDZ1-2 (7,8 nM) en el mismo tampón TBS y condiciones descritas anteriormente. Los valores de PF se ajustaron a la ecuación general:  $Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / [1 + (10^{(X - \text{LogCl}_{50} \times \text{Coeficiente de Hill})})]$ , en la que X es el valor logarítmico de la concentración de péptido, y los valores de  $\text{Cl}_{50}$  resultantes se convirtieron en valores de  $K_i$ , constante de inhibición competitiva. Todos los valores informados son la media de al menos tres experimentos individuales. Se prepararon disoluciones de reserva de los ligandos en agua, y se verificaron las concentraciones mediante análisis de aminoácidos.

5.2 Los inhibidores de PSD-95 diméricos de la invención tienen una afinidad incrementada hacia el dominio PDZ1-2

Se empleó el ensayo de PF (véase 5.1) para determinar la afinidad de diversos inhibidores de PSD-95 diméricos hacia el dominio PDZ1-2 de PSD-95. El inhibidor dimérico AB141 difiere de AB125 en que el ligador de PEG4 se sustituye por un ligador de NPEG4. Esta diferencia no tiene un efecto significativo sobre la afinidad del inhibidor dimérico hacia PDZ1-2, ya que ambos exhibieron valores de  $K_i$  de alrededor de 9,5 nM (Figura 5). La adición de un CPP al inhibidor dimérico AB141, en el que el CPP está unido al ligador de NPEG4, da como resultado un incremento sorprendente en la afinidad hacia PDZ1-2. AB144 (CPP es Tat) y AB147 (CPP es Retroinverso-D-Tat) mostró un incremento del doble respecto de AB141 en el valor de  $K_i = 4,6 \pm 0,3$  y  $5,1 \pm 0,4$  nM, respectivamente (Figura 5), y una afinidad incrementada 1000 veces respecto del péptido Tat-NR2B9c monomérico ( $K_i = 4600 \pm 300$  nM hacia PDZ1-2 de PSD-95; Figura 5).

5.3 Los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP tienen una afinidad incrementada hacia el dominio PDZ1-2

Los análogos de AB144 (véase el Ejemplo 1 y la Figura 15) AB144\_B y AB144\_C, en los que el punto de unión de Tat al átomo de nitrógeno del ligador de NPEG es asimétrico (a una distancia de uno o dos "restos de etilen glicol" del centro del ligador), mostraron afinidades hacia PDZ1-2 de PSD-95 en el mismo intervalo que AB144, es decir, en el intervalo nanomolar bajo (Tabla 2). Aunque AB144\_C muestra una afinidad 2 veces mayor en comparación con AB144, ambos compuestos son ligandos muy potentes hacia el dominio PDZ1-2.

En los análogos de AB144 (véase el Ejemplo 1 y la Figura 15), AB144\_D y AB144\_E, Tat está unido de manera simétrica al ligador de NPEG, pero en AB144\_D, Tat está unido mediante un acoplamiento de maleimida, mientras en AB144\_E, Tat está unido por medio de un enlace disulfuro (S-S). Aunque AB144\_D y AB144\_E exhibieron una afinidad ~2-3 veces inferior que AB144 (Tabla 2), sus valores de  $K_i$  estuvieron todavía en el intervalo nanomolar inferior, y por lo tanto los compuestos todavía son agentes de unión muy fuertes a PDZ1-2 de PSD-95.

En los compuestos AB144\_H y AB144\_I (véase el Ejemplo 1 y la Figura 15), la secuencia Tat está unida a una cadena lateral de aminoácido de uno de los péptidos diméricos unidos a PEG, en vez de usar un ligador de NPEG. En AB144\_H, el Tat se prolonga desde el aminoácido de  $P^4$ , que en este caso es una lisina. Normalmente, se halla isoleucina (I) en esta posición (AB144), pero aquí se usa lisina, ya que proporciona un grupo funcional (grupo amino) desde el que se puede sintetizar el Tat, y todavía funciona como un análogo estructural para isoleucina (basado en alcano, sin carga tras la formación del enlace amida al primer aminoácido de Tat, de tamaño similar). AB144\_H conserva una afinidad nanomolar hacia PDZ1-2, aunque ligeramente menos óptima, ya que es ~5 veces inferior que la de AB144 (Tabla 2). En AB144\_I, el Tat está unido a la cadena lateral del aminoácido de  $P^5$  en un hexapéptido, y muestra una afinidad mayor hacia el dominio PDZ1-2 que AB144\_H, aunque aprox. 2 veces más débil que AB144 (Tabla 2).

Tabla 2. Constantes de afinidad  $K_i$  de los análogos de AB144 hacia PDZ1-2 de PSD-95 medida mediante polarización de fluorescencia. Los datos representan  $\geq 4$  medidas individuales.

Compuesto	$K_i \pm \text{EEM}$ (nM)
AB144_B	$5,2 \pm 0,3$
AB144_C	$2,3 \pm 0,2$
AB144_D	$9,9 \pm 0,5$
AB144_E	$16 \pm 0,6$
AB144_H	$24 \pm 2$
AB144_I	$12 \pm 1$

Ejemplo 6. Los inhibidores de PSD-95 diméricos modificados tienen una estabilidad incrementada en plasma sanguíneo humano

#### 6.1 Ensayo de estabilidad en plasma sanguíneo humano

5 Se disolvieron ligandos (inhibidores de PSD-95 diméricos) hacia el dominio PDZ de PSD-95 en plasma sanguíneo humano (270  $\mu$ L; 3H Biomedical, Suecia, n° de cat. 1300-1-P50) a una concentración de 0,25 mM (30  $\mu$ L de 2,5 mM) y se incubaron a 37 °C. Se extrajeron alícuotas (30  $\mu$ L) a diversos intervalos de tiempo (p.ej., 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 960, 1280, 2550, 4560 y 7240 min) y se inactivaron con 60  $\mu$ L de ácido tricloroacético (ac., 5%). Las alícuotas se agitaron en vórtex, y se incubaron 15 min a 4 °C antes de la centrifugación a 18.000 g durante 2 min. Los sobrenadantes se analizaron mediante RP-HPLC analítica (UV<sub>218</sub>) para cuantificar el compuesto respecto del tiempo cero, y también se estudiaron de manera cualitativa mediante ESI-LC/MS para identificar el compuesto (m/z) en la muestra. Se investigó procaina (control positivo) y procainamida (control negativo) a 50  $\mu$ M para validar el procedimiento. Las recuperaciones de ligandos tras el procedimiento de precipitación fueron del 85-95%.

#### 6.2 Estabilidad incrementada en plasma sanguíneo de los inhibidores diméricos que tienen un péptido Tat

15 Los inhibidores diméricos AB144 (CPP es Tat) y AB147 (CPP es Retroinverso-D-Tat) se incubaron en plasma sanguíneo humano, y se monitorizó su degradación *in vitro*. Al comparar la susceptibilidad a la degradación del pentapéptido monomérico IETDV y Tat-NR2B9c, que mostraron semividas ( $T_{1/2}$ ) de  $37 \pm 6$  y  $1100 \pm 300$  minutos, respectivamente, AB144 exhibió una  $T_{1/2} = 4900 \pm 100$ , que corresponde a una mejora de más de 100 veces de la estabilidad en comparación con el pentapéptido monomérico IETDV (Figura 5). No se observó una degradación detectable de AB147 en el periodo de medida (130 horas) (Figura 5), lo que ilustra el efecto de introducir un CPP estable a proteasas en el inhibidor dimérico.

Ejemplo 7. Los inhibidores de PSD-95 diméricos se unen a los dominios PDZ1 y PDZ2 de PSD-95

#### 7.1 Análisis mediante RMN de la unión de ligandos a los dominios PDZ1 y PDZ2 de PSD-95

25 Se preparó una muestra de RMN que comprendía [<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C]-PEG4(IETAV)<sub>2</sub> libre (AB140) 3,5 mM y 2,2 mM del mismo compuesto saturado con PDZ1-2 sin marcar en KPi 50 mM, pH 7,5 en un 90% de H<sub>2</sub>O/10% de D<sub>2</sub>O para los estudios de unión. Todos los experimentos se registraron a 25 °C en un campo magnético estático que correspondía a una frecuencia de Larmor de protón de 600 MHz. Se registraron experimentos de HNCA, HN(CA)CO y HSQC para asignar el esqueleto de los restos peptídicos del compuesto libre. Para el compuesto unido se registraron experimentos de HNCACB, HN(CA)CO y HSQC para fines de asignación.

30 Las velocidades de relajación  $R_1$  y  $R_{1\rho}$  de <sup>15</sup>N, así como el NOE de <sup>15</sup>N-[<sup>1</sup>H], se midieron para [<sup>15</sup>N]-PDZ1-2 2,83 mM saturado con AB125 sin marcar mediante el uso de las secuencias de pulsos previamente descritas. Las condiciones de las muestras fueron como se describieron anteriormente. Para el experimento de  $R_1$ , se usaron los siguientes retardos de relajación: 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 seg. Las incertidumbres en las intensidades de los picos se estimaron a partir de cinco puntos de datos duplicados. El experimento de  $R_{1\rho}$  se registró con un campo de confinamiento de 1661 Hz, y el portador de radiofrecuencia se colocó a 119 ppm y retardos de relajación de 0,004, 0,008, 0,012, 0,016, 0,02, 0,024, 0,03, 0,036, 0,04, 0,05, 0,055, 0,06 seg. Se registraron cinco puntos de datos duplicados para la estimación de incertidumbres en los volúmenes de los picos. El NOE de <sup>15</sup>N-[<sup>1</sup>H] se registró tomando la proporción de los experimentos registrados saturando y sin saturar los protones. El retardo de recirculación total para ambos experimentos fue 12 seg, y el experimento sin los pulsos de saturación se duplicó para la estimación de las incertidumbres.

40 Todos los datos de RMN se procesaron con RMN pipe y se visualizaron mediante el uso de Sparky (Goddard y Kneller, Universidad de California en San Francisco). Las asignaciones para la forma unida de PDZ1-2 se obtuvieron transfiriendo las asignaciones a partir de PDZ1-2/cipina (Wang et al, J. Am. Chem. Soc. 131, 787, 2009). Debido a que se usó un compuesto diferente en este estudio, y debido a que las condiciones de las muestras fueron diferentes, solamente se pudieron transferir algo más de la mitad de las asignaciones con confianza. Los picos restantes de los espectros no se analizaron. Los picos se integraron y los volúmenes se convirtieron en velocidades de relajación mediante el uso del programa propio PINT. Se usó el mismo programa para convertir las velocidades de relajación  $R_{1\rho}$  en las velocidades de relajación  $R_2$ .

#### 7.2 Los inhibidores de PSD-95 diméricos se unen a PDZ1 y PDZ2

50 Se analizó la unión del ligando dimérico marcado con <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C (AB140) a PDZ1 y PDZ2 determinando su estructura mediante RMN en presencia/ausencia de PDZ1-2 sin marcar, como se describió en 7.1. Se detectaron cinco picos en un espectro de HSQC para el ligando simétrico [<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C]-PEG4(IETAV)<sub>2</sub> (AB140). Sin embargo, cuando el ligando se combinó con PDZ1-2, se observaron diez picos diferentes que correspondían a cada uno de los diez aminoácidos (Figura 6). Esto demuestra claramente que ambos restos de ligando interactúan con PDZ1-2, y que se orientan hacia diferentes entornos de la proteína, concretamente PDZ1 y PDZ2, respectivamente. A partir de los cálculos estructurales secundarios basados en los desplazamientos químicos para el ligando dimérico unido y sin unir, se puede deducir que el ligando sin unir exhibe un carácter de cadena aleatoria, mientras el ligando unido adopta una estructura de cadena  $\beta$  (Figura 7). Finalmente, las medidas de velocidad de relajación  $R_1$  y  $R_2$

confirmaron que PDZ1-2 en un complejo con los ligandos diméricos se desploma como una unidad, y así se descartan otros modelos potenciales tales como una estequiometría de unión 2:2 (Tabla 3). Por lo tanto, los estudios mediante RMN confirman una estequiometría de unión 1:1, y demuestran de manera inequívoca que cada resto de ligando del ligando dimérico se une a PDZ1 o PDZ2 en PDZ1-2 con un modo de unión auténticamente bivalente.

- 5 Tabla 3. Velocidades de relajación  $R_1$  y  $R_2$  de  $^{15}\text{N}$  y NOE de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  medidas para PDZ1-2 de [ $^{15}\text{N}$ ]-PSD95 en un complejo con AB125. Solamente se muestran los resultados para los residuos en los que se pudieron transferir las asignaciones con confianza de Wang et al., J. Am. Chem. Soc. 131, 787, 2009.

Residuo	$R_1$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$R_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )	NOE
I6	1,10 ± 0,02	15,0 ± 0,4	0,56 ± 0,02
T7	0,95 ± 0,03	15,2 ± 0,6	0,70 ± 0,08
G11	1,60 ± 0,49	15,4 ± 0,6	0,50 ± 0,01
G14	0,98 ± 0,05	13,3 ± 0,8	0,45 ± 0,01
G16	1,01 ± 0,03	16,8 ± 0,8	0,83 ± 0,02
F17	1,03 ± 0,02	19,7 ± 0,6	0,66 ± 0,06
T23	0,98 ± 0,02	18,7 ± 0,7	0,80 ± 0,00
D24	1,08 ± 0,04	18,7 ± 0,7	0,83 ± 0,01
N25	1,06 ± 0,03	17,0 ± 0,7	0,65 ± 0,01
H27	1,12 ± 0,04	17,6 ± 0,9	0,76 ± 0,01
S33	1,05 ± 0,04	21,3 ± 0,9	0,82 ± 0,07
I34	1,13 ± 0,05	16,8 ± 1,2	0,90 ± 0,06
I40	1,08 ± 0,03	15,5 ± 0,9	0,85 ± 0,02
G42	0,96 ± 0,04	14,2 ± 1,3	0,68 ± 0,07
G43	0,99 ± 0,02	19,2 ± 0,8	0,77 ± 0,02
A46	1,05 ± 0,02	19,0 ± 0,6	0,80 ± 0,04
Q47	0,88 ± 0,03	17,1 ± 0,4	0,84 ± 0,00
G49	1,07 ± 0,03	16,7 ± 0,8	0,86 ± 0,02
R50	1,03 ± 0,01	18,1 ± 0,4	0,82 ± 0,03
L51	1,02 ± 0,05	18,3 ± 0,7	0,68 ± 0,00
L58	1,16 ± 0,04	16,0 ± 1,1	0,84 ± 0,02
N61	1,07 ± 0,03	25,9 ± 0,9	0,62 ± 0,01
D64	1,01 ± 0,02	17,2 ± 0,6	0,87 ± 0,05
V65	1,07 ± 0,02	16,1 ± 0,5	0,76 ± 0,02
E67	1,02 ± 0,01	16,1 ± 0,4	0,75 ± 0,02
V68	1,04 ± 0,04	17,4 ± 0,6	0,77 ± 0,00
T69	0,95 ± 0,02	17,0 ± 0,4	0,92 ± 0,03
H70	1,07 ± 0,05	15,5 ± 1,0	0,56 ± 0,12
S71	1,06 ± 0,02	16,2 ± 0,5	0,80 ± 0,03
A72	1,10 ± 0,02	18,9 ± 0,7	0,77 ± 0,04
A73	1,12 ± 0,03	17,3 ± 0,6	0,76 ± 0,07
V74	1,07 ± 0,02	15,1 ± 0,5	0,65 ± 0,02
L77	1,01 ± 0,03	15,8 ± 0,5	0,73 ± 0,03
E79	1,01 ± 0,02	16,2 ± 0,7	0,69 ± 0,05
A80	1,02 ± 0,01	18,0 ± 0,4	0,57 ± 0,01
G81	1,13 ± 0,03	16,0 ± 1,1	0,68 ± 0,00
I83	1,04 ± 0,02	16,6 ± 0,6	0,72 ± 0,02
V84	1,08 ± 0,02	15,9 ± 0,6	0,71 ± 0,01
R85	1,02 ± 0,03	19,7 ± 1,0	0,88 ± 0,04
L86	1,17 ± 0,03	15,9 ± 0,7	0,64 ± 0,07

## ES 2 544 573 T3

M99	1,23 ± 0,04	16,0 ± 1,2	0,57 ± 0,01
K102	1,05 ± 0,03	13,5 ± 0,7	0,74 ± 0,02
I104	1,09 ± 0,02	13,8 ± 0,3	0,61 ± 0,03
K105	1,23 ± 0,02	14,2 ± 0,5	0,69 ± 0,03
G106	1,05 ± 0,03	14,6 ± 0,7	0,60 ± 0,01
G109	0,99 ± 0,02	15,3 ± 0,5	0,47 ± 0,01
G111	1,18 ± 0,02	15,9 ± 0,6	0,81 ± 0,01
F112	1,18 ± 0,01	15,6 ± 0,6	0,88 ± 0,01
G119	1,11 ± 0,04	16,5 ± 0,9	0,87 ± 0,07
Q121	1,09 ± 0,03	15,8 ± 0,7	0,85 ± 0,03
H122	1,04 ± 0,03	17,6 ± 0,5	0,73 ± 0,02
I123	1,05 ± 0,05	12,8 ± 1,5	0,64 ± 0,09
G125	1,11 ± 0,06	12,9 ± 0,5	0,70 ± 0,09
N127	1,12 ± 0,03	15,8 ± 1,6	0,64 ± 0,01
S128	1,00 ± 0,03	19,1 ± 0,6	0,75 ± 0,01
I135	1,18 ± 0,03	15,4 ± 0,8	0,69 ± 0,03
E136	1,12 ± 0,06	18,7 ± 1,0	0,72 ± 0,04
G137	1,06 ± 0,05	13,9 ± 1,2	1,27 ± 0,14
G138	1,06 ± 0,03	17,3 ± 0,6	0,67 ± 0,02
H141	1,27 ± 0,04	17,0 ± 1,4	0,69 ± 0,02
K142	1,11 ± 0,04	13,5 ± 0,7	0,71 ± 0,01
D143	1,16 ± 0,02	14,4 ± 0,5	0,90 ± 0,02
G144	1,02 ± 0,02	14,5 ± 1,2	0,82 ± 0,00
I148	1,11 ± 0,03	16,1 ± 0,4	0,70 ± 0,04
G149	1,10 ± 0,03	18,2 ± 0,8	0,74 ± 0,03
D150	1,15 ± 0,02	18,1 ± 0,5	0,81 ± 0,02
L153	1,12 ± 0,03	15,3 ± 0,9	0,76 ± 0,00
V155	1,14 ± 0,04	16,7 ± 0,5	0,68 ± 0,01
N156	1,19 ± 0,03	17,0 ± 0,7	0,76 ± 0,09
E166	1,03 ± 0,02	17,8 ± 0,5	0,74 ± 0,06
A168	1,00 ± 0,02	18,0 ± 0,4	0,71 ± 0,01
V169	1,02 ± 0,02	19,3 ± 0,6	0,75 ± 0,10
L172	1,03 ± 0,02	16,2 ± 0,6	0,63 ± 0,03
T175	1,05 ± 0,03	9,0 ± 0,4	0,40 ± 0,00
V178	1,02 ± 0,02	13,2 ± 0,3	0,68 ± 0,02
V179	1,12 ± 0,02	15,2 ± 0,7	0,71 ± 0,10
L181	1,06 ± 0,03	15,3 ± 0,6	0,93 ± 0,04

Ejemplo 8. Los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP atraviesan la barrera hematoencefálica

### 8.1 Análisis de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB)

5 Estos ligandos marcados con fluorescencia se usaron como medidas sustitutas de la capacidad de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP de atravesar la barrera hematoencefálica y entrar en el cerebro en ratones. Los ligandos fluorescentes se inyectaron de manera intravenosa (3 nmol/g), y se detectó la localización de los ligandos mediante microscopía de fluorescencia de cortes cerebrales frontales (n=8) de ratones, que se estudiaron 2 horas tras la inyección. Se seleccionaron dos cortes del cerebro antes y dos después de la comisura anterior (n=5) para el análisis de la permeabilidad de BBB. Se usó la comisura anterior (Bregma: -0,3) como punto fijo del cerebro para analizar cortes de cerebro anatómicamente idénticos. La intensidad del fluoróforo 5-FAM se midió de manera semi-cuantitativa mediante el uso de un sistema de microscopía de fluorescencia (Olympus System Microscope modelo BX-51, Dinamarca) con un objetivo 10x (Olympus 10x/0,15 UPlanApo) conectado a una cámara digital para

microscopio de alta resolución (Olympus modelo DP70), que transfirió imágenes a un programa informático de captura de imágenes (programa informático Imagen Pro Plus). Todas las imágenes se tomaron mediante el uso de los mismos ajustes del microscopio y con un tiempo de exposición constante de la cámara. Las intensidades se cuantificaron mediante el uso del programa informático ImageJ.

## 5 8.2 Permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) de los inhibidores de PSD-95 diméricos-CPP

Los inhibidores de PSD-95 diméricos AB143, AB145, AB148 son los derivados marcados con 5-FAM de AB141, AB144, AB147, respectivamente (Figura 4: se muestran AB143 y AB145 como ejemplos). El derivado marcado con 5-FAM de Tat-NR2B9c se denomina MS23. Tras la inyección de los compuestos, los ratones se perfunden con paraformaldehído, y los cerebros se extraen con cuidado, se fijan en paraformaldehído, se procesan hasta cortes frontales, y se cuantifica la fluorescencia. La microscopía de fluorescencia de los cortes de cerebro frontales demostró que AB145, AB148, y Tat-NPv2B9c entran en el cerebro, mientras AB143 no lo hace (Figura 8). Basándose en estos resultados se concluye que los compuestos que contienen Tat o Retroinverso-D-Tat (AB144, AB147, Tat-NR2B9c) son capaces de entrar en el cerebro, mientras AB125/AB141, que no contiene un CPP, no puede.

## 15 Ejemplo 9. Las propiedades neuroprotectoras de los inhibidores de PSD-95 diméricos-CPP reducen los volúmenes de infarto en ratones con isquemia cerebral focal

Las propiedades neuroprotectoras *in vivo* de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP se examinaron en el modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO) de ictus isquémico en ratones.

### 9.1 Ratones para estudios *in vivo*

20 El estudio pMCAO se llevó a cabo mediante el uso de 164 ratones C57BL/6 macho adultos jóvenes (7-8 semanas), de edades coincidentes (Taconic, Dinamarca). Los ratones se albergaron en jaulas distintas con iluminación diurna y se les proporcionó acceso libre a alimento (1314 Altromin, Brogård, Dinamarca) y agua. Los ratones se aclimataron durante 7 días antes de la cirugía de acuerdo con las directrices aprobadas por el Comité de Ética Animal Danés (J. n° 2005/561-1068). Se midió el grado de infarto isquémico en dos estudios controlados por placebo, aleatorizados, con enmascaramiento doble.

### 9.2 Oclusión permanente de la arteria cerebral media

Procedimiento quirúrgico: Se sometió a los ratones a isquemia cerebral focal mediante la oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO). Los ratones se anestesiaron mediante inyecciones subcutáneas de 0,18 mL por 10 gramos de peso corporal, de una mezcla 1:1:2 de Hypnorm™ (0,315 mg/mL de citrato de fentanilo y 10 mg/mL de fluanisón, VectaPharma Ltd), Midazolam (5 mg/mL, Hameln), y H<sub>2</sub>O destilada. El ratón se colocó sobre una placa de calentamiento a 37±0,5 °C y los ojos se revistieron con pomada (Viscotears; Novartis, Basilea, Suiza). Se realizó una incisión en la piel entre la parte lateral de la órbita y el conducto auditivo externo. El polo superior de la glándula parótida y la parte superior del músculo temporal se apartaron tras la resección parcial y se realizó una pequeña craneotomía, mediante el uso de un buril de 0,8 mm directamente por encima de la rama distal de la MCA. Se retiró la duramadre y la MCA se electrocoaguló mediante el uso de pinzas bipolares (Gimmi, Alemania) acopladas a una unidad electroquirúrgica (ICC50 de ERBE, Alemania). Tras la oclusión, se organizó el músculo y el tejido blando y la piel se suturó mediante el uso de una sutura 4-0 de nailon. Para el tratamiento del dolor posquirúrgico, se suministró a los ratones Temgesic (0,001 mg/20 g de buprenorfina, Reckitt & Coleman, R.U.), tres veces con un intervalo de 8 horas comenzando inmediatamente tras la cirugía. Además, se inyectó s.c. a los ratones 1 ml de disolución salina isotónica antes de la transferencia a una sala de recuperación controlada a 28 °C.

### 9.3 Administración de los compuestos

Los compuestos se disolvieron en disolución salina (NaCl) isotónica (0,9%) a una concentración de 300 µM, y se administraron 10 µl por gramo de peso corporal de manera intravenosa (i.v.) (Dosis: 3 nmol/g) en forma de una inyección rápida, en la cola, 30 min tras la cirugía. Los ratones de control recibieron una inyección i.v. de NaCl del 0,9%.

### 9.4 Sacrificio de los ratones y procesamiento del tejido cerebral

Los ratones C57BL/6 con un tiempo de supervivencia posquirúrgica de 6 horas se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los ratones C57BL/6 con una supervivencia posquirúrgica de 48 horas se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital (la farmacia de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Copenhague, Dinamarca) para recoger muestras de sangre y de tejidos. Todos los cerebros se extrajeron con cuidado, se congelaron en CO<sub>2</sub> gaseoso y se cortaron en 6 series de cortes criostáticos frontales de 30 µm, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. Los ratones C57BL/6J usados para investigar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) de AB143, AB145, AB148, y MS23 se anestesiaron profundamente y se les perfundió a través del ventrículo izquierdo, mediante el uso de 10 ml de tampón fosfato (SB) Soerensens refrigerado (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 125 mM, pH 7,4) seguido de 20 mL de SB que contenía un 4% de paraformaldehído (PFA). Los cerebros se extrajeron con cuidado y se fijaron en un 4% de PFA durante 1 hora seguido de inmersión en SB que contenía un 20% de sacarosa

durante la noche. Los cerebros se congelaron en CO<sub>2</sub> gaseoso y se procesaron en cortes criostáticos frontales de 16 µm.

#### 9.5 Determinación del volumen de infarto

Se fijó una serie de cortes de cerebro recién congelados de cada ratón en etanol del 70% durante la noche a 4 °C. Los cortes se rehidrataron y se sumergieron en una disolución de azul de toluidina (0,01%, Merck, Alemania) diluida en 80 mmol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y 70 mmol/L de ácido cítrico, seguido de lavado tres veces en H<sub>2</sub>O y deshidratación en una serie graduada de alcohol (etanol del 96-99%). Los cortes se aclararon en xileno y se cubrieron con un cubreobjetos con Depex (BDH Gurr, R.U.). Los cortes se usaron para el análisis volumétrico del infarto mediante el uso de un sistema de microscopía de ensayo estereológico asistido por ordenador (CAST)-GRID (Olympus, Dinamarca) y el principio de Cavalieri para la estimación del volumen. El volumen total del infarto (V<sub>total</sub>) se calculó mediante el uso de la fórmula:  $V_{total} = \sum P * t * a_{punto}$ , en la que  $\sum P$  es el número total de puntos que se localizan en el infarto,  $t$  es la distancia media entre cortes, y  $a_{punto}$  representa el área por punto.

#### 9.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el uso del programa GraphPad InStat 5.0 para Windows (programa informático GraphPad, San Diego, CA, EE.UU.). La comparación de los valores medios de los tamaños de infarto entre dos grupos de ratones se realizó mediante el uso de la prueba de Mann-Whitney no paramétrica. Se usó la prueba  $t$  de Student para datos emparejados, bilateral, para comparar los valores de la fuerza de agarre obtenidos del mismo ratón antes y después de la cirugía. Se usó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon con las medidas repetidas del mismo ratón (ensayo de rendimiento Rotarod). Se usó el análisis bilateral de la varianza para investigar las variables independientes (tiempo y peso o temperatura). Todos los datos se presentan como medias ± EEM. La significación estadística se aceptó para  $P < 0,05$ .

#### 9.7 Efectos neuroprotectores de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP - corto plazo

El efecto protector de AB144 y Tat-NR2B9c se comparó con disolución salina en el modelo de pMCAO de isquemia focal cerebral en ratones adultos (n=60). Los inhibidores se inyectaron de manera intravenosa (3 nmol/g) 30 minutos tras la lesión, seguido de un periodo de supervivencia posquirúrgica de 5,5 horas (Figura 9). AB144 mostró una reducción significativa del 40% del daño del tejido isquémico en comparación con los ratones tratados con disolución salina, mientras Tat-NR2B9c no proporcionó una reducción estadísticamente significativa de los volúmenes de infarto (Figura 10). Así, la combinación de una afinidad elevada notable, debida a la estructura dimérica, y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, facilitada por el péptido Tat, conduce al compuesto neuroprotector *in vivo*, AB144, con una actividad superior en comparación con Tat-NR2B9c.

#### 9.8 Efectos neuroprotectores de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP - largo plazo

Los efectos neuroprotectores de larga duración de AB144, AB147, y Tat-NR2B9c, en comparación con la disolución salina, se estudiaron 48 horas tras pMCAO (n=80) (Figura 9). AB144 y AB147 proporcionaron respectivamente una reducción del 37% y 34% del tamaño de infarto en comparación con los ratones tratados con disolución salina, mientras no se detectó una reducción estadísticamente significativa del infarto tras el tratamiento con Tat-NR2B9c (Figura 11 y 12).

#### 9.9 Estado fisiológico de los ratones sometidos a pMCAO

Se monitorizó con cuidado el estado fisiológico de los ratones antes y durante la cirugía de pMCAO para descartar que los efectos observados del tratamiento con los inhibidores de PSD-95 diméricos se debieran a circunstancias secundarias (p.ej., relacionadas con enfermedades) que fueran el resultado del procedimiento experimental.

9.10 Monitorización del peso corporal: Se registró el peso corporal de cada ratón durante el pre-entrenamiento, antes de la cirugía, y a las 24 y 48 horas tras la cirugía, y no se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento (Figura 13).

9.11 Monitorización de la temperatura: Se midió continuamente la temperatura rectal del ratón mediante el uso de una sonda termoacoplada conectada a una unidad modelo Bat 12 (Physitemp). La temperatura se midió antes y 30 min después de pMCAO, además de 30 min y 2,5 horas después de la inyección i.v., es decir, 1 y 3 horas después de pMCAO. No se observaron diferencias de peso corporal (Figura 13) o tasas de supervivencia (>96%) tras la inyección del fármaco en comparación con los ratones tratados con disolución salina.

9.12 Análisis de los gases sanguíneos: Se tomó una muestra de sangre venosa para el análisis de los gases sanguíneos de PO<sub>2</sub>/PCO<sub>2</sub>, electrolitos, glucosa, lactato, y hematocrito, 30 min tras la administración del compuesto (1 hora tras pMCAO). Se insertó un tubo capilar revestido de heparina a lo largo del ángulo interno del ojo y se hizo girar hasta que penetró en la conjuntiva. Se recogió una muestra de sangre (150 µL) y se almacenó en hielo hasta el análisis de los gases mediante el uso del instrumento de gases sanguíneos GEM Premier 300 (Instrumentation Laboratory). Los controles de calidad (QC Contrill9) se adquirieron de IL Sensor Systems. Además, no se detectaron diferencias en los parámetros de gases sanguíneos (PO<sub>2</sub>/PCO<sub>2</sub>, pH, electrolitos, glu/lac), que fueron

similares entre los grupos y estuvieron dentro de los intervalos normales, en comparación con los ratones de control sin manipular (Tabla 4).

Tabla 4. Los valores sanguíneos se monitorizaron durante el experimento de pMCAO (periodo de supervivencia de 48 horas) 1 hora tras la cirugía. Los valores se muestran como la media  $\pm$  EEM. El "control" indica los animales sin manipular.

5

Valor	Control	Solución salina	AB144	AB147	Tat-NR2B9c
pH	7,19 $\pm$ 0,03	7,17 $\pm$ 0,01	7,16 $\pm$ 0,01	7,13 $\pm$ 0,01	7,13 $\pm$ 0,01
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	88,4 $\pm$ 2,7	101 $\pm$ 2,7	95,7 $\pm$ 2,3	104 $\pm$ 2,5	106 $\pm$ 2,4
pO <sub>2</sub> (mmHg)	47,6 $\pm$ 3,4	54,0 $\pm$ 1,6	50,2 $\pm$ 2,2	56,4 $\pm$ 2,9	55,2 $\pm$ 2,6
[Na <sup>+</sup> ] (mmol/L)	145 $\pm$ 0,3	147 $\pm$ 0,6	148 $\pm$ 2,0	147 $\pm$ 0,5	147 $\pm$ 0,3
[K <sup>+</sup> ] (mmol/L)	5,6 $\pm$ 0,21	4,8 $\pm$ 0,09	5,2 $\pm$ 0,20	5,1 $\pm$ 0,18	5,1 $\pm$ 0,13
[Ca <sup>2+</sup> ] (mmol/L)	1,29 $\pm$ 0,01	1,32 $\pm$ 0,01	1,30 $\pm$ 0,02	1,31 $\pm$ 0,01	1,32 $\pm$ 0,01
[Glucosa] (mmol/L)	139 $\pm$ 4,5	146 $\pm$ 6,2	134 $\pm$ 7,9	154 $\pm$ 8,1	141 $\pm$ 7,4
[Lactato] (mmol/L)	0,99 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,07
Hct (%)	42,8 $\pm$ 0,4	42,0 $\pm$ 0,5	43,5 $\pm$ 0,9	41,3 $\pm$ 0,6	40,8 $\pm$ 0,6

Ejemplo 10. Las propiedades neuroprotectoras de los inhibidores de PSD-95 diméricos-CPP conservan la función motora en ratones con isquemia cerebral focal

10 Los ratones con supervivencia posquirúrgica de 48 horas en el modelo de ictus isquémico (pMCAO) (Ejemplo 9) se examinaron mediante el uso de los tres ensayos de comportamiento siguientes para detectar déficits motores que pueden no manifestarse necesariamente por el tamaño del infarto, por lo que se proporciona una impresión más general del estado del animal.

#### 10.1 Fuerza de agarre

15 El medidor de fuerza de agarre (BIO-GT-3, BIOSEB) permite el estudio de las funciones neuromusculares en ratones determinando la fuerza máxima que es necesaria para hacer que el ratón cese su agarre. Se usó la fuerza de agarre en patas individuales para medir la gravedad de la asimetría inducida por pMCAO. Se deja que el ratón agarre una rejilla metálica y después se tira de él en el plano horizontal. La fuerza aplicada a la rejilla se registra como la tensión máxima. Se midió la fuerza de las patas delanteras individuales y la fuerza de agarre total (ambas patas de manera simultánea) antes de (valor inicial) y después de pMCAO. Cada ratón se ensaya en 5 ensayos secuenciales, y se registra la fuerza de agarre más elevada como el mejor índice.

#### 10.2 Ensayo de rendimiento Rotarod

25 El Rotarod (LE 8200, Panlab) es muy adecuado para determinar la actividad motora en roedores, los efectos de compuestos experimentales sobre el daño del sistema nervioso central, o los efectos de enfermedades sobre la coordinación motora, determinado por el tiempo durante el cual el animal permanece andando en un tambor rotatorio. La rotación del Rotarod está controlada por un motor, y acelera de 0 a 40 vueltas por min (rpm) a lo largo de un periodo de tiempo de 5 min, en cuyo momento todos los ratones han caído de la barra. Todos los ratones se ensayaron en 4 ensayos repetitivos con un intervalo de 20 min (tiempo de reposo). Antes de la cirugía, los ratones se pre-entrenaron para permanecer sobre la barra durante 30 segundos, a 4 rpm.

30 10.3 El efecto neuroprotector de los inhibidores de PSD-95 diméricos que contienen CPP preserva la fuerza de agarre y la coordinación motora

35 Los ratones de pMCAO tratados con AB144 o AB147 no mostraron un cambio significativo en la fuerza de agarre total (ambas patas), mientras los ratones tratados con disolución salina o Tat-NR2B9c perdieron una cantidad significativa de fuerza de agarre (Figura 14A). De forma similar, el análisis de la fuerza de agarre no mostró asimetría entre la pata delantera derecha y la izquierda para los ratones tratados con AB144 y AB147 en comparación con los ratones tratados con disolución salina y Tat-NR2B9c (Figura 14B), lo que demuestra claramente el efecto neuroprotector de AB144 y AB147. En el ensayo de rendimiento Rotarod, los ratones tratados con AB144 y AB147 mostraron una mejora de la habilidad de aprendizaje a corto plazo más pronunciada que los ratones tratados con disolución salina (Figura 14C), y el tiempo total que los ratones pasaron sobre la barra fue significativamente más largo (AB144: 83,5  $\pm$  4,1 segundos; AB147: 92,6  $\pm$  4,5 segundos) que para los ratones tratados con Tat-NR2B9c (65,7  $\pm$  3,6 segundos) (P<0,001).

40

## Ejemplo 11. Los inhibidores de PSD-95 diméricos mitigan las afecciones de dolor inflamatorio

## 11.1 Animales

Se usaron ratones NMRI hembra (22-26 gramos) obtenidos de Taconic M&B (Ry, Dinamarca) para todos los experimentos, y tuvieron 8-9 semanas de edad en el momento del ensayo. Tras la llegada, los ratones se dejaron un mínimo de 7 días de aclimatación en jaulas Macrolon III (20 x 40 x 18 cm), con 7 ratones por jaula. El alimento y el agua estuvieron disponibles a voluntad en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con el encendido de las luces a las 6 am. Los experimentos se llevaron a cabo entre las 9:00 am y las 16.00 pm en salas con temperatura y humedad reguladas (22-24 °C, humedad relativa: 60-70%). Todos los procedimientos de ensayo estuvieron de acuerdo con "Principios del Cuidado de Animales de Laboratorio" (publicación del NIH N° 85-23, revisada en 1985) y la Ley Danesa de Experimentación con Animales, y se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

## 11.2 Inducción de dolor inflamatorio mediante adyuvante completo de Freund y administración de los compuestos

Se indujo un dolor inflamatorio persistente mediante inyección subcutánea (s.c.) de 20 µL de suspensión de adyuvante completo de Freund (CFA; 1 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis; Sigma-Aldrich, Saint Louis, EE.UU.) en la superficie plantar de la pata trasera izquierda, mediante el uso de una microjeringa de 50 µL GASTIGHT® (Hamilton Company) con una aguja de calibre 30/1/2. Se llevaron a cabo medidas del valor inicial del umbral de retirada de los estímulos mecánicos una vez al día, tres veces antes de la inyección de CFA. Se administró de manera intraperitoneal vehículo (solución salina del 0,9%) o AB125 (3, 10, o 30 mg/kg) en un volumen de inyección de 10 ml/kg (AB125 disuelto en disolución salina del 0,9%). Se administraron CFA y vehículo/AB125 al menos 24 horas antes de ensayar la sensibilidad mecánica.

## 11.3 Ensayo de dolor - El ensayo de Von Frey de alodinia/hiperalgesia mecánica inducida mediante CFA

Para determinar el grado de hiperalgesia/alodinia inducida mediante el tratamiento con CFA, se midió el umbral de retirada de la pata (PWT) del 50% por estímulos mecánicos mediante el uso del método superior-inferior (Chaplan et al, J Neuroscience Methods, 1994, 53, 55-63). Brevemente, los ratones se colocaron individualmente en una caja de plástico de color rojo oscuro transparente sobre el suelo de malla metálica durante al menos 30 min para que se adaptasen al medio. Se usó una serie de filamentos de von Frey (Stoelting, Wood Dale, IL) con fuerzas de flexión equivalentes a 0,008, 0,02, 0,04, 0,07, 0,16, 0,40, 0,60, 1,00, y 1,4 gramos para producir los estímulos. Comenzando con el filamento 0,6, se aplicaron los filamentos de von Frey perpendicularmente a la superficie plantar de las patas traseras durante 4-5 s. Cuando se dio una respuesta positiva a un estímulo, se aplicó el siguiente filamento de von Frey inferior. Cuando se dio una respuesta negativa, se usó el siguiente filamento superior. El patrón de respuestas positivas y negativas se convirtió en el umbral del 50% (Chaplan et al, J Neuroscience Methods, 1994, 53, 55-63), que se expresó como valores en gramos (g) según la fórmula siguiente:  $PWT\ 50\% = 10^{(G+0,2237 \cdot K)}$ , en la que G es la fuerza de flexión del último filamento de von Frey y K es el valor obtenido de la tabla estandarizada basada en el patrón superior-inferior. Se ignoró la elevación de la pata debido a un comportamiento motor normal, y se evitó realizar los ensayos durante el sueño profundo, la limpieza y la exploración. El tratamiento se realizó con enmascaramiento para la persona que hizo los ensayos.

## 11.4 Ensayo de transmisión social de preferencia alimentaria

STFP se llevó a cabo en dos fases. Primera fase: un ratón "demostrador" de cada jaula de 4 ratones privados de alimentos se transfirió a una jaula diferente y se le dejó comer durante 30 min de alimento triturado mezclado con un 1% de canela o con un 2% de cacao en polvo. Después, los ratones "demostradores" se devolvieron a sus jaulas respectivas durante 30 minutos. Durante esta "fase de presentación", se registró el número de interacciones entre los tres ratones "observadores" y los ratones demostradores. Se estableció un mínimo de 2 y un máximo de 5 interacciones por lameduras/olfateos como criterios para una adquisición adecuada de la señal olfativa. Tras esta primera fase, se retiró el ratón "demostrador" y los tres ratones "observadores" se transfirieron a una jaula limpia con acceso libre a alimentos y agua durante 4 horas antes de la privación de alimentos que los prepara para la segunda fase. Segunda fase: tras un intervalo de retención de 24 horas, los ratones observadores se colocaron individualmente en jaulas que contenían dos bandejas de alimento triturado aromatizado con canela o cacao, respectivamente. La cantidad ingerida del alimento señalado respecto del alimento nuevo se toma como índice de la memoria por el alimento señalado previamente. Los estudios piloto han demostrado que los ratones no muestran ninguna preferencia inherente cuando se les da a elegir entre alimento aromatizado con canela y con cacao. Aún así, los experimentos se diseñaron de una manera equilibrada para asegurar que se señalaran un número igual de ratones de cada grupo de tratamiento con canela y cacao, respectivamente.

## 11.5 Laberinto en Y modificado

El ensayo se llevó a cabo en un laberinto de Plexiglás claro compuesto de 2 brazos perpendiculares conectados a una pasarela. Los 2 brazos (disponibles para la exploración) y la pasarela tuvieron 50 cm de longitud y 8 cm de ancho, rodeados por paredes claras de Plexiglás de 30 cm de altura. Cada brazo partía de una plataforma equipada con tabiques negros extraíbles, que permitían que los brazos se abrieran y cerraran según se deseara. El laberinto completo estaba encerrado en una caja negra triangular de Plexiglás (1 x 1 x 1 m). Las paredes de esta

caja externa alrededor de cada brazo de exploración se cubrieron con diferentes señales ópticas, p.ej., líneas blancas horizontales o verticales. El área alrededor de la pasarela no contuvo señales ópticas, y fue de color negro. Cada brazo del laberinto estaba separado del otro mediante un tabique opaco, de forma que tras entrar en un brazo un ratón solamente podía ver las diferentes señales ópticas de ese brazo en particular. El ensayo consistió en dos fases: En la fase 1 (habitución), el ratón (n=8-10) se colocó en el extremo de la pasarela y se le dejó acceder a uno de los brazos de exploración mediante elección forzada (es decir, el otro brazo estaba cerrado). Después de que el ratón hubo entrado en el brazo, se bloqueó el acceso a la pasarela, y se dejó que el ratón explorase el brazo (denominado familiar) durante un periodo de 5 min. El brazo familiar se alternó sistemáticamente para eliminar cualquier preferencia por un lugar que confundiera el ensayo. Inmediatamente después, en la fase 2 (ensayo), se dejó que el ratón explorase los brazos de exploración familiar y desconocido, pero no la pasarela, durante un periodo de 2 min. El tiempo acumulativo pasado en cada brazo se registró durante esta sesión del ensayo mediante un sistema automatizado de seguimiento en vídeo (Ethovision, Noldus). Se calculó un índice de discriminación (ID) para cada ratón, definido como la diferencia de tiempo pasado en el brazo nuevo y en el familiar dividido por el tiempo total pasado en el brazo nuevo y en el familiar durante el ensayo en la fase 2, es decir  $ID = (\text{nuevo-familiar})/(\text{nuevo+familiar})$ .

#### 11.6 Ensayo Rotarod

La función motora se estudió mediante el uso de un Rotarod con aceleración (MedAssociates, Inc., VT, EE.UU.). La velocidad del Rotarod (3,2 cm de diámetro) se incrementó de 4 a 40 rpm a lo largo de un periodo de 300 s, y el tiempo mínimo posible pasado sobre la barra se designó 0 s y el tiempo umbral máximo se ajustó a 310 s. Cada ratón se ensayó inmediatamente antes del tratamiento con fármaco (t=0), y otra vez 15, 30, 45 y 60 minutos tras el tratamiento con fármaco. Cuando un animal cayó del tambor rotatorio, se interrumpió automáticamente un haz de luz para registrar la cantidad de tiempo pasada sobre la barra rotatoria.

#### 11.7 Análisis de los datos

Datos de dolor: El umbral mecánico inicial se definió como la media de las medidas de von Frey tomadas en los tres días consecutivos antes del tratamiento con CFA, con la última medida inicial tomada en el mismo día del tratamiento con CFA. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso de un análisis de medidas repetidas bidireccional de la covarianza (RM-ANCOVA), con el Tratamiento como el factor independiente, el Tiempo como el factor repetido, y el umbral mecánico inicial como covariable. El RM-ANCOVA fue seguido de comparaciones planificadas en las medias predichas para determinar el efecto de los tratamientos a lo largo del tiempo sobre la sensibilidad umbral. El análisis se llevó a cabo sobre los datos en bruto, mientras los resultados se representan en forma de valores relativos (p.ej., valor inicial definido como 1).

Datos cognitivos: En el ensayo de transmisión social de preferencia alimentaria, la preferencia por el alimento señalado se expresó en forma de un índice de discriminación,  $ID = (\text{señalado-nuevo})/(\text{señalado+nuevo})$ . En el laberinto en Y modificado, la preferencia por el brazo nuevo se expresó en forma de un índice de discriminación,  $ID = (\text{tiempo en nuevo} - \text{tiempo en familiar})/(\text{tiempo en nuevo} + \text{tiempo en familiar})$ . Los datos de STFP y del laberinto en Y se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de comparaciones planificadas llevadas a cabo para determinar los efectos del tratamiento sobre el índice de discriminación.

Rendimiento motor: En el ensayo Rotarod, se analizó el efecto del tratamiento sobre la coordinación motora mediante el uso de un RM ANOVA bidireccional, con el tratamiento como factor independiente y el tiempo como medida repetida. Se usó un procedimiento de comparaciones planificadas para determinar los efectos del tratamiento a lo largo del tiempo.

#### 11.8 AB125 reduce la alodinia/hiperalgesia mecánica inducida por CFA

AB125 reduce la respuesta de dolor inducida por CFA cuando se inyecta de manera intraperitoneal en una cantidad de 3, 10 y 30 mg/kg (Figura 17). Esto se demuestra inyectando CFA y AB125 de manera simultánea a los ratones, y midiendo la alodinia/hiperalgesia mecánica 24 horas después. Este resultado ilustra que los inhibidores de PSD-95, sin un CPP unido, son analgésicos eficaces contra el dolor mecánico inflamatorio (inducido por CFA), y por lo tanto son agentes prometedores en el tratamiento de las afecciones de dolor crónico.

#### 11.9 Efectos analgésicos de AB125 en comparación con MK-801 en el modelo de dolor por CFA

Cuando se administró de manera concurrente con CFA, el antagonista del receptor de NMDA clásico MK-801 y AB125 previnieron el desarrollo de hiperalgesia mecánica inducida por CFA 1 hora y 24 horas después del tratamiento (Figura 18).

#### 11.10 Efectos analgésicos prolongados de AB125 cuando se administró 24 horas después de la inyección de CFA

Cuando se administró AB125 24 horas tras la inyección de CFA, la prueba ANCOVA reveló una inversión significativa de la hiperalgesia inducida por CFA a 3 y 10 mg/kg después de 1 hora. Además, esta inversión se observó todavía después de 24 horas en los dos grupos tratados con 3 mg/kg y 10 mg/kg; y a las 72 horas, la hiperalgesia se invirtió de manera significativa a todas las dosis (1, 3, y 10 mg/kg) (Figura 19). Se hizo una medida

adicional 8 días después del tratamiento con AB125, pero en este momento los animales tratados con disolución salina se habían recuperado espontáneamente hasta el nivel inicial, impidiendo la detección de un efecto potencialmente analgésico de AB125.

11.11 Ensayo de AB125 y MK-801 en ensayos de comportamiento de la función cognitiva y de la función motora.

5 Para examinar los perfiles de efectos secundarios, se compararon los efectos de AB125 y MK-801 en un ensayo de la transmisión social de preferencia alimentaria (STFP) de la memoria a largo plazo, y el ensayo de laberinto en Y modificado de atención, así como en el ensayo Rotarod de rendimiento motor. A la dosis que reduce la hiperalgesia, MK-801 indujo déficits cognitivos en los ensayos de STFP (Figura 20) y de laberinto en Y modificado (Figura 21), así como déficits motores en el ensayo Rotarod (Figura 22). En contraste, AB125 no indujo déficits cognitivos o de la función motora en estos ensayos a las dosis analgésicas, o incluso a dosis superiores (hasta 60 mg/kg) (Figura 20-22). Así, los inhibidores de PSD-95 en forma de AB125 proporcionan un efecto analgésico eficaz contra el dolor mecánico inflamatorio (inducido por CFA), y además, esto se da sin inducir efectos secundarios de la función cognitiva o motora, tal como se observa para el antagonista clásico de receptor de NMDA MK-801. Por lo tanto, los inhibidores de PSD-95 diméricos son agentes prometedores en el tratamiento del dolor crónico.

15 11.12 AB144 reduce la alodinia/hiperalgesia mecánica inducida por CFA

AB144 también reduce la respuesta de dolor inducida por CFA, tal como se demostró inyectando AB144 de manera intraperitoneal y concurrente con la inyección de CFA y midiendo la alodinia/hiperalgesia mecánica 1 y 24 horas después. La prueba estadística ANCOVA reveló una inversión significativa de la hiperalgesia inducida por CFA a la dosis de 30 mg/kg después de 1 hora y a la dosis de 10 y 30 mg/kg después de 24 horas (Figura 23). Este resultado ilustra que los inhibidores de PSD-95, con un CPP unido, son analgésicos eficaces contra el dolor mecánico inflamatorio (inducido por CFA), y por lo tanto son agentes prometedores en el tratamiento de las afecciones de dolor crónico.

Ejemplo 12. Los inhibidores de PSD-95 diméricos entran en el tejido de la médula espinal

12.1. Método de detección de los inhibidores de PSD-95 en la médula espinal.

25 Los inhibidores de PSD-95 diméricos AB143 y AB145 son los derivados marcados con 5-FAM de AB141 y AB144, respectivamente (Figura 4). Por lo tanto, AB143 sirve como compuesto sustituto para investigar las propiedades farmacocinéticas de AB125/141, mientras AB145 sirve como compuesto sustituto para AB144. Para investigar si AB143 y AB145 son capaces de entrar en el tejido de la médula espinal, se administraron a los ratones mediante inyección intraperitoneal (30 mg/kg). Los ratones tratados con fármaco se decapitaron 30 min tras la inyección, y se extrajo con cuidado la médula espinal, a la cual se le añadió ácido tricloroacético (TCA) del 5% (300  $\mu$ L, por 0,1 g de tejido) y el tejido se homogeneizó con un homogeneizador ultrasónico (sobre hielo). El tejido homogeneizado se agitó en vórtex y se centrifugó durante 10 min (20000 g a 4 °C). El sobrenadante se transfirió a un tubo de ensayo y se evaporó, y el residuo se reconstituyó en agua y se determinó su intensidad de fluorescencia mediante el uso de un lector de placas de fluorescencia (excitación/emisión: 470/525 nm). Para la cuantificación de los compuestos, se preparó una curva patrón añadiendo una cantidad conocida de AB143 y AB145 en el tejido de la médula espinal de ratones de control antes de la homogeneización, seguido de un procedimiento y análisis similares a los de los ratones tratados con fármaco.

12.2. Los inhibidores de PSD-95 se hallan en la médula espinal.

40 Se midió un incremento de fluorescencia evidente y definido en el tejido de la médula espinal de los ratones tratados con AB143 y AB145 en comparación con los ratones tratados con disolución salina. Basándose en la curva patrón, se determinó que las concentraciones fueron 0,061 nmol/g y 0,074 nmol/g de AB143 y AB145, respectivamente. Estas concentraciones están por encima de los valores de  $K_d$  de los compuestos hacia PSD-95 (5-10 nM), lo que apoya que tanto AB143 (y así AB125) como AB145 (y así AB144) son capaces de entrar en el tejido de la médula espinal del SNC a concentraciones relevantes para inhibir PSD-95 y de ese modo aliviar el dolor.

45 Tabla 5. Concentraciones de AB143 y AB145 en la médula espinal tras la inyección intraperitoneal (30 mg/kg) en ratones.

	AB143 (nmol/g)	AB145 (nmol/g)
Muestra 1	0,070	0,132
Muestra 2	0,036	0,108
Muestra 3	0,029	0,084
Muestra 4	0,113	0,012
Muestra 5	0,033	0,035
Muestra 6	0,085	
Media $\pm$ EEM	0,061 $\pm$ 0,014	0,074 $\pm$ 0,022

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Universidad de Copenhagen

5 <120> Inhibidores diméricos de afinidad elevada de PSD-95 como neuroprotectores eficaces contra el daño cerebral isquémico y para el tratamiento del dolor

<130> P81101657EP00

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1  
 <211> 605  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(600)  
 <223> ADN de HIS-PDZ1-2

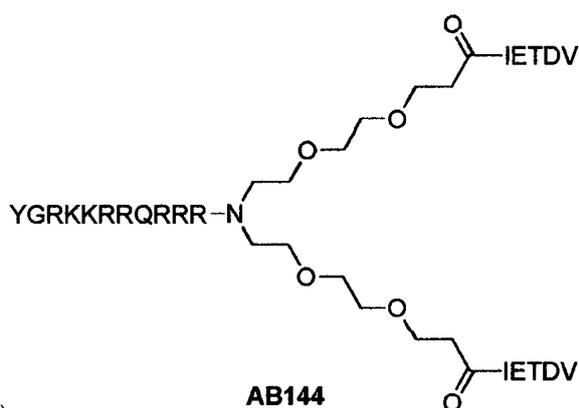
<400> 1

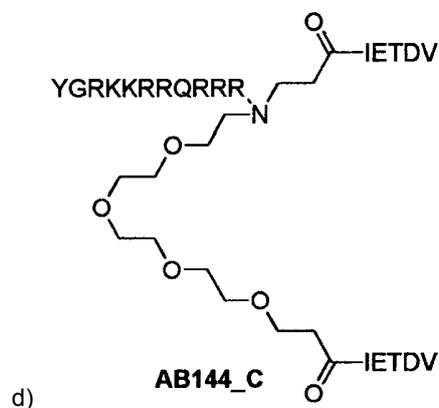
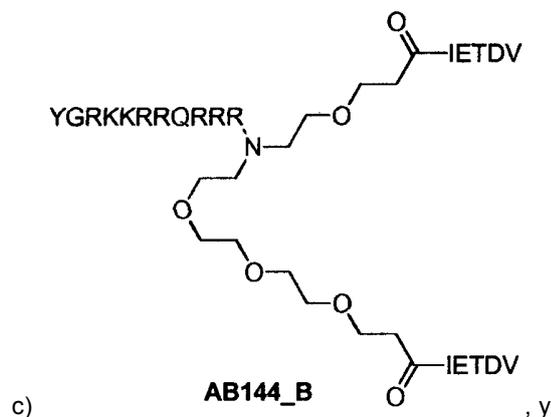
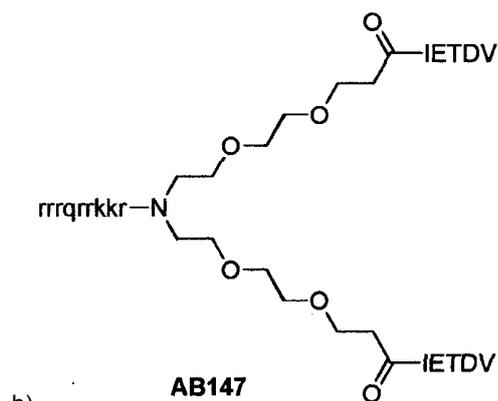
atg cac cac cac cac cac ccg cgc gga tcc atg gaa tac gag gaa atc	48
Met His His His His His Pro Arg Gly Ser Met Glu Tyr Glu Glu Ile	
1 5 10 15	
aca ttg gaa agg ggt aac tca ggt ctg ggc ttc agc atc gca ggt ggc	96
Thr Leu Glu Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly	
20 25 30	
act gac aac cca 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 aag ccc ccg gct gag aag gtc atg gag atc aag	336
Tyr Val Met Arg Arg Lys Pro Pro Ala Glu Lys Val Met Glu Ile Lys	
100 105 110	
ctc atc aag ggg cct aaa ggt ctt ggc ttc agc atc gca ggg ggc gta	384
Leu Ile Lys Gly Pro Lys Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly Val	
115 120 125	
ggg aac cag cac atc cca gga gat aat agc atc tat gta aca aag atc	432
Gly Asn Gln His Ile Pro Gly Asp Asn Ser Ile Tyr Val Thr Lys Ile	
130 135 140	
atc gaa ggg ggt gct gcc cac aag gat ggg agg ttg cag att gga gac	480
Ile Glu Gly Gly Ala Ala His Lys Asp Gly Arg Leu Gln Ile Gly Asp	
145 150 155 160	



## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende un primer péptido unido a un segundo péptido mediante un ligador, en el que el primer y el segundo péptido comprenden al menos cuatro residuos unidos por amida que tienen una secuencia YTXV o YSXV, en la que
- 5 a. Y se selecciona de E, Q, y A, y
- b. X se selecciona de A, Q, D, N, *N*-Me-A, *N*-Me-Q, *N*-Me-D, y *N*-Me-N, y
- en el que el ligador comprende PEG y, en el que al menos un átomo de oxígeno del PEG está sustituido por un átomo de nitrógeno para proporcionar *N*PEG,
- 10 en el que un péptido de penetración celular (CPP) está unido al átomo de nitrógeno del ligador mediante un enlace amida, y
- en el que el CPP comprende al menos 4 residuos de aminoácidos seleccionados de arginina y/o lisina.
2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el ligador comprende de 4 a 28 restos de etilen glicol (N=4-28).
- 15 3. El compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ligador es un ligador de *N*PEG-diácido, y en el que cada grupo carboxilo del ligador está unido a un residuo terminal del primer o segundo péptido.
4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el CPP comprende un péptido retroinverso.
5. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el CPP es un péptido Tat que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR o un péptido Retroinverso-d-Tat que tiene la secuencia de aminoácidos de rrrqrrkr.
- 20 6. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el primer péptido y/o el segundo péptido tienen una longitud de 5 a 10 residuos unidos por amida.
7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el primer y/o segundo péptido está compuesto de al menos 4 residuos de L-aminoácidos.
- 25 8. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el primer péptido y/o el segundo péptido está *N*-alquilado.
9. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:





- 5 10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para el uso como un medicamento.
11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso en la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad relacionada con la excitotoxicidad en un sujeto.
12. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 11, en la que la enfermedad es una lesión isquémica o traumática del SNC.
- 10 13. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor en un sujeto.
- 15 14. Una composición farmacéutica para el uso en la profilaxis y/o el tratamiento del dolor en un sujeto que comprende un compuesto, y dicho compuesto comprende un primer péptido unido a un segundo péptido por un ligador, en el que el primer y el segundo péptido comprenden al menos cuatro residuos unidos por amida que tienen una secuencia YTXV o YSXV, en la que
- Y se selecciona de E, Q, y A, y
  - X se selecciona de A, Q, D, N, *N*-Me-A, *N*-Me-Q, *N*-Me-D, y *N*-Me-N.

15. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 14, en la que el ligador es un ligador de PEG y comprende de 4 a 28 restos de etilen glicol (N=4-28).
16. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 15, en la que el ligador es un ligador de PEG-diácido y cada grupo carboxilo del ligador está unido a un residuo terminal del primer o segundo péptido.
- 5 17. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 15, en la que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en PEG4(IETAV)<sub>2</sub>, NPEG4(IETAV)<sub>2</sub>, PEG6(IESDV)<sub>2</sub>, y PEG4(IESDV)<sub>2</sub>.
18. La composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en donde el dolor es dolor inflamatorio o dolor neuropático.

Figura 1

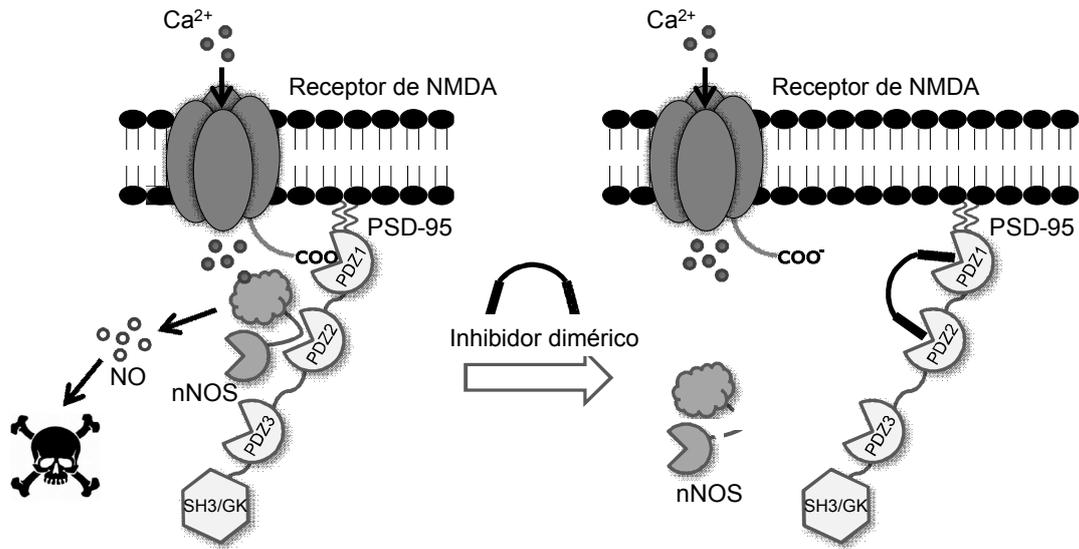
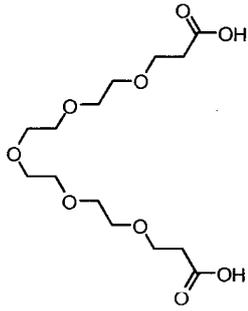
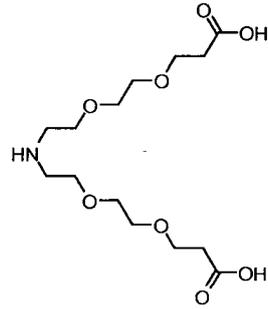


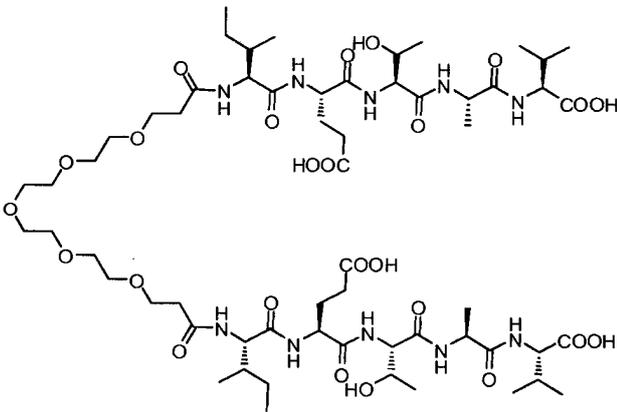
Figura 2



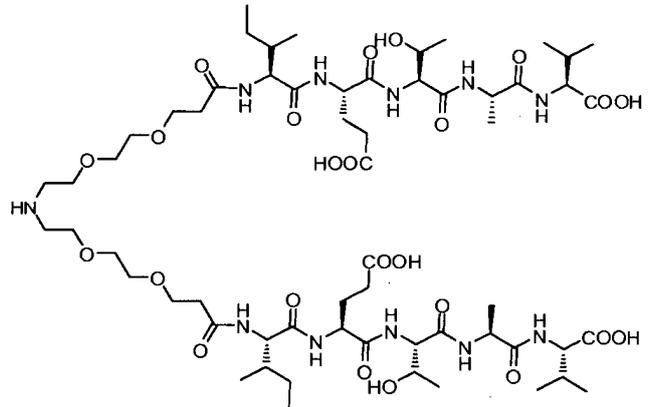
Ligador de PEG4-diácido



Ligador de NPEG4-diácido

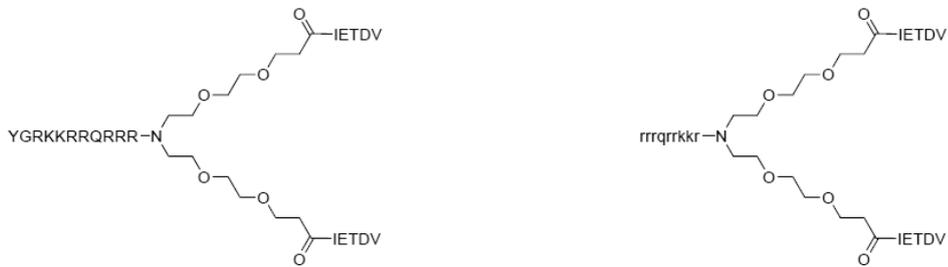
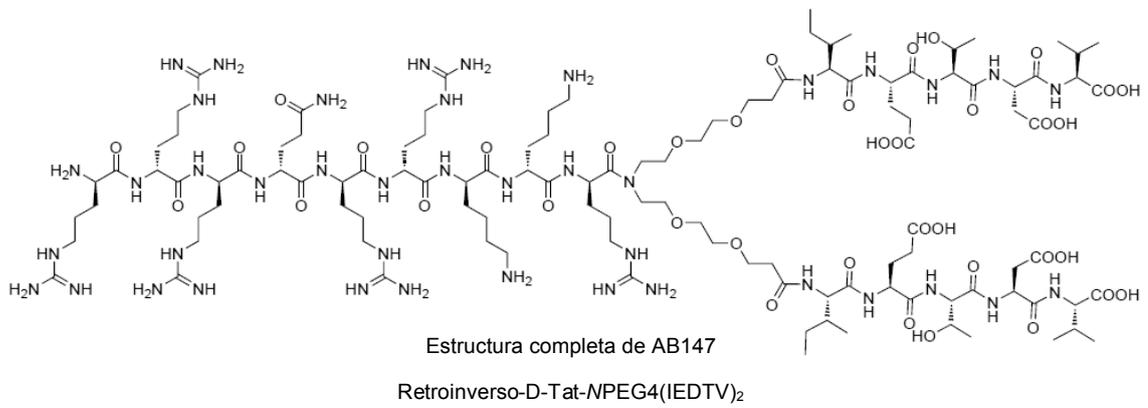
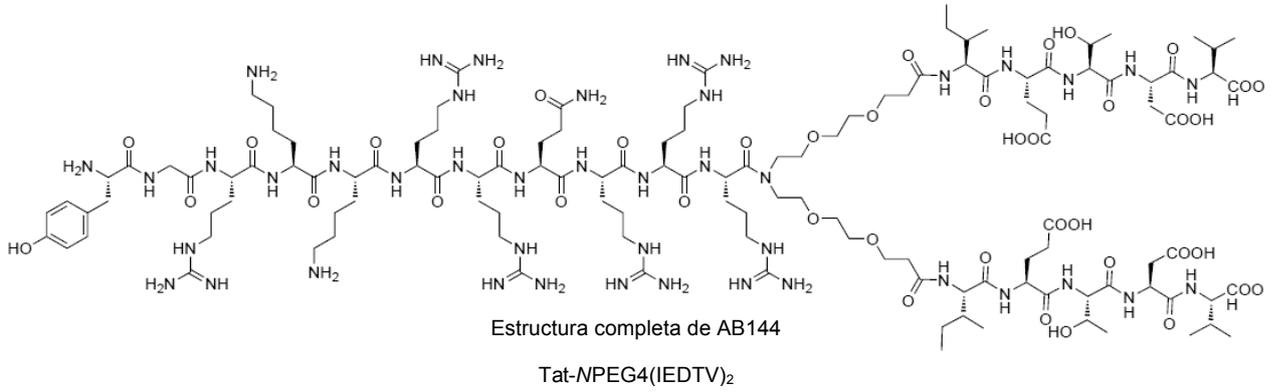


AB125  
PEG4(IETAV)<sub>2</sub>



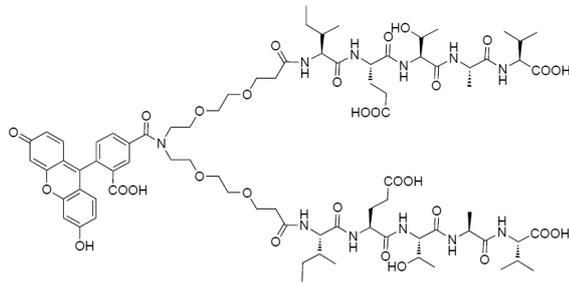
AB141  
NPEG4(IETAV)<sub>2</sub>

Figura 3



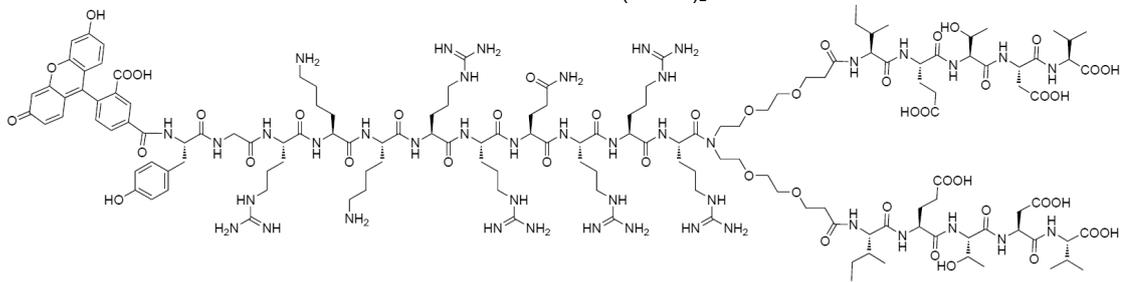
Representación estructural alternativa de AB144 y AB147

Figura 4



Estructura de AB143

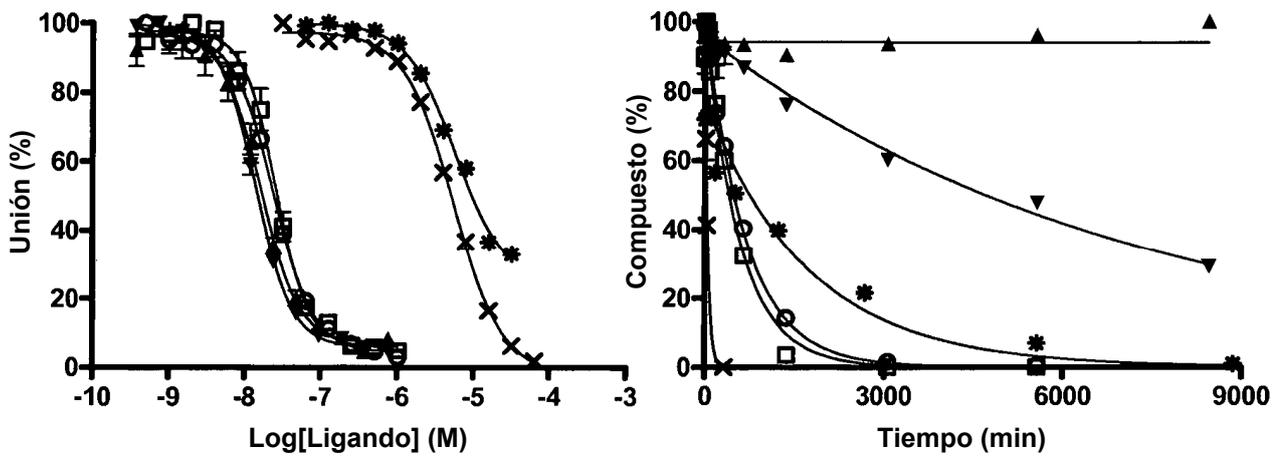
5-FAM-NPEG4(IEDTV)<sub>2</sub>



Estructura de AB145

5-FAM-NPEG4(IEDTV)<sub>2</sub>

Figura 5



	$K_i \pm \text{EEM (nM)}$	$T_{1/2} \pm \text{EEM (min)}$
▼ AB144	$4.6 \pm 0.3$	$4900 \pm 100$
▲ AB147	$5.1 \pm 0.4$	$>8000$
○ AB125	$9.5 \pm 0.3$	$450 \pm 20$
□ AB141	$9.3 \pm 1$	$410 \pm 20$
× IETDV	$1800 \pm 200$	$37 \pm 6$
* Tat-NR2B9c	$4600 \pm 300$	$1100 \pm 300$

Figura 6

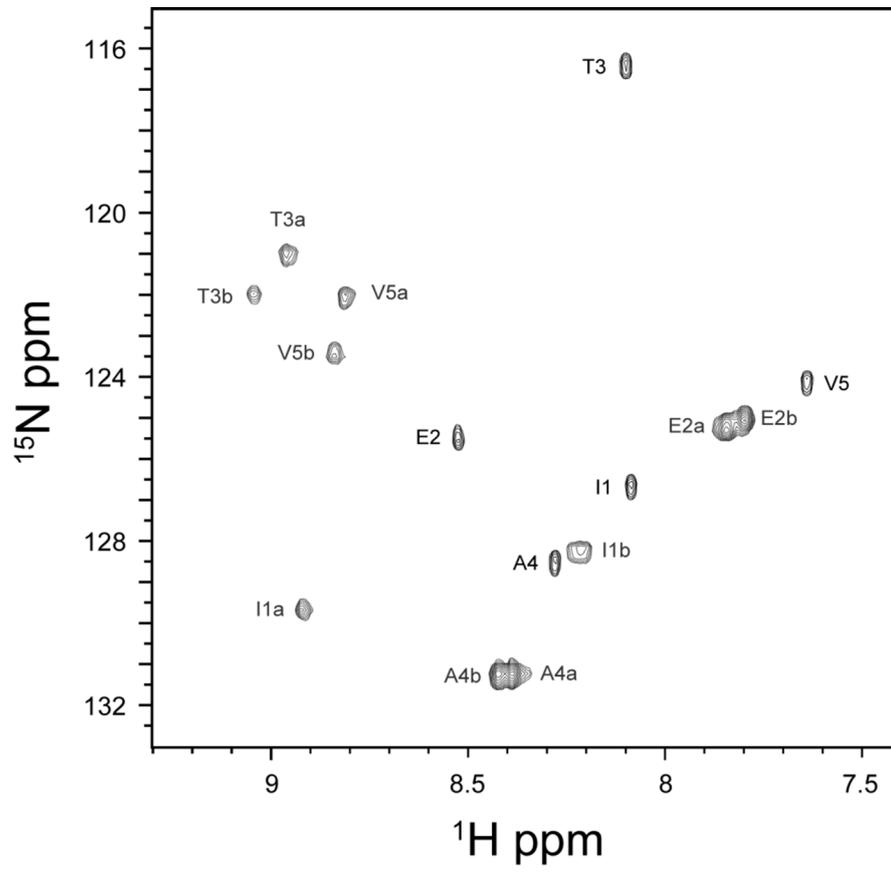


Figura 7

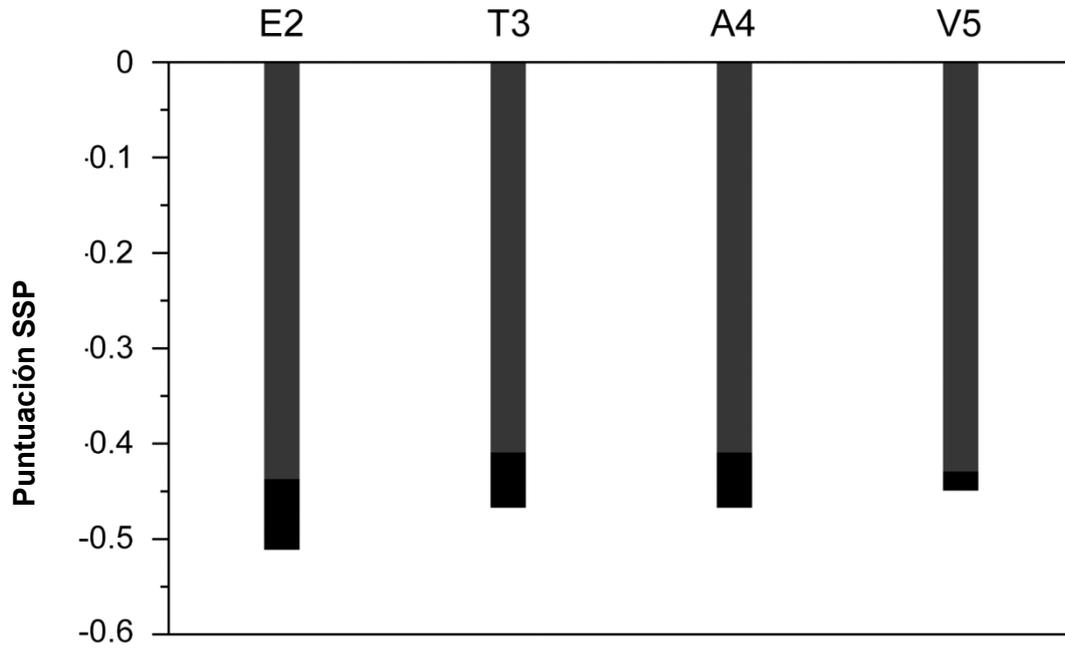


Figura 8

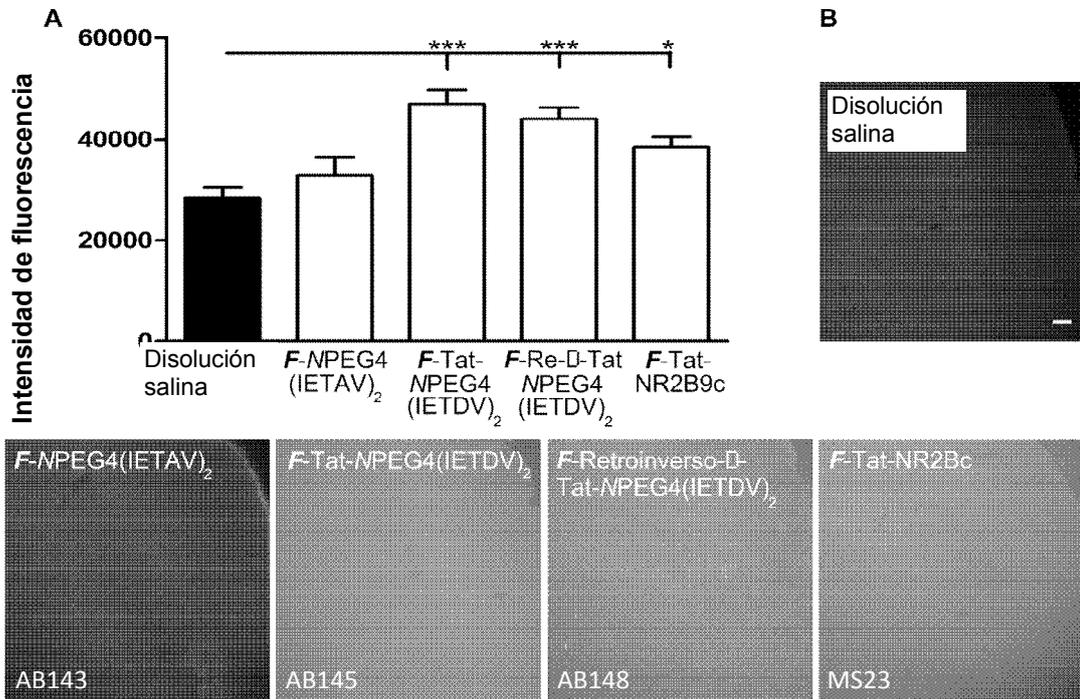


Figura 9

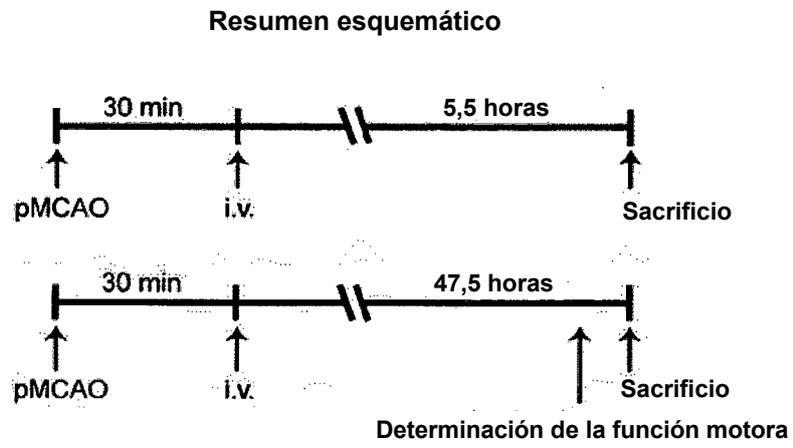
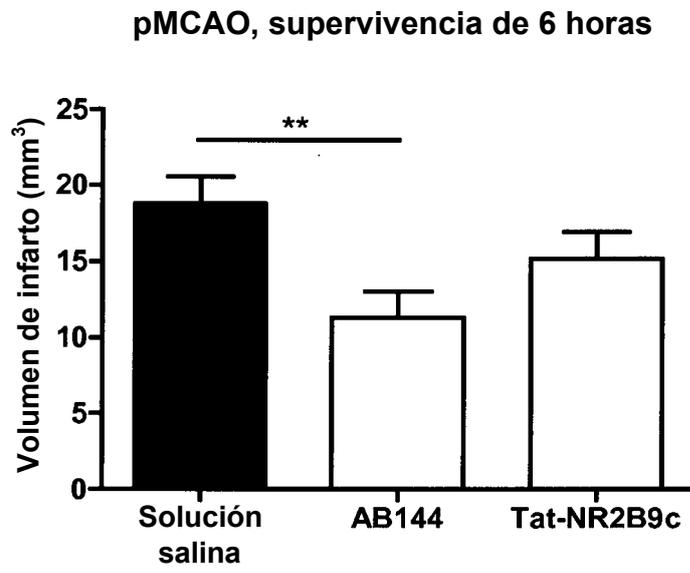


Figura 10



**Figura 11**

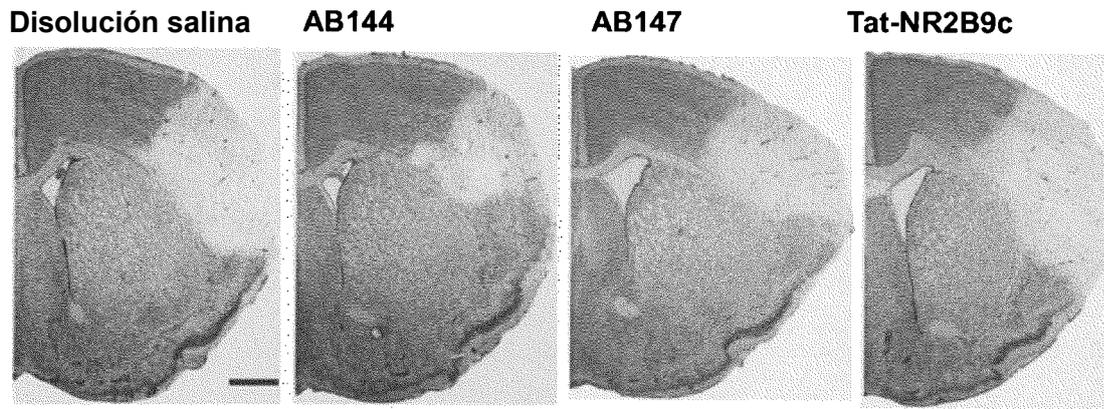


Figura 12

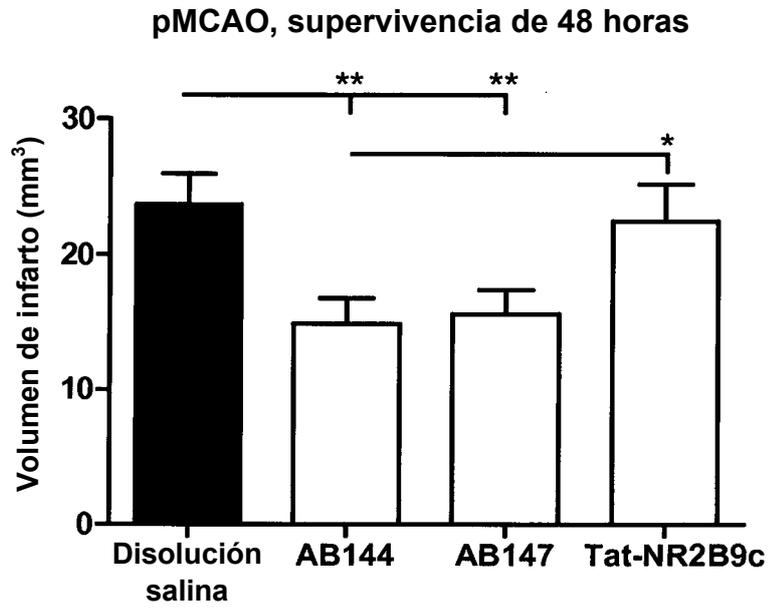


Figura 13

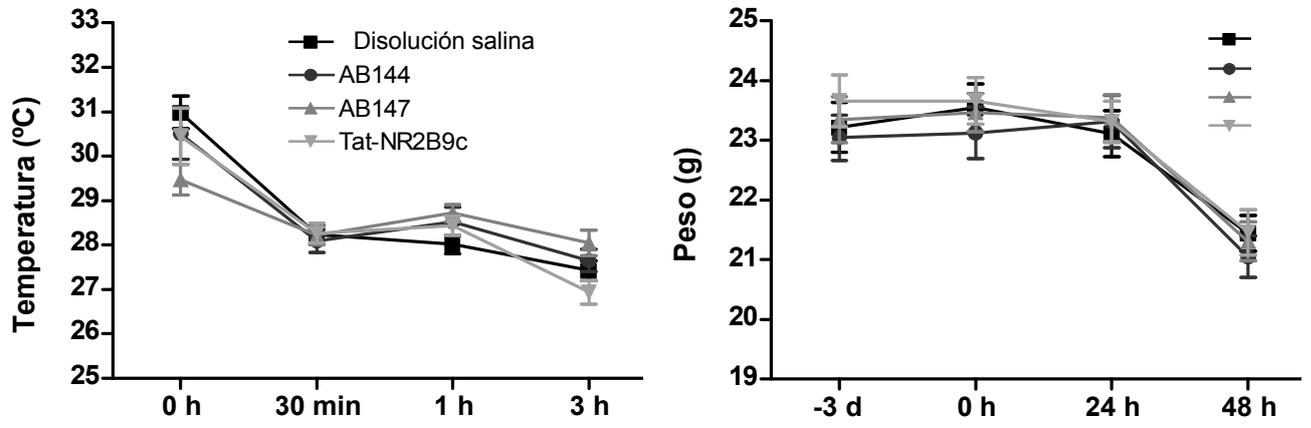


Figura 14

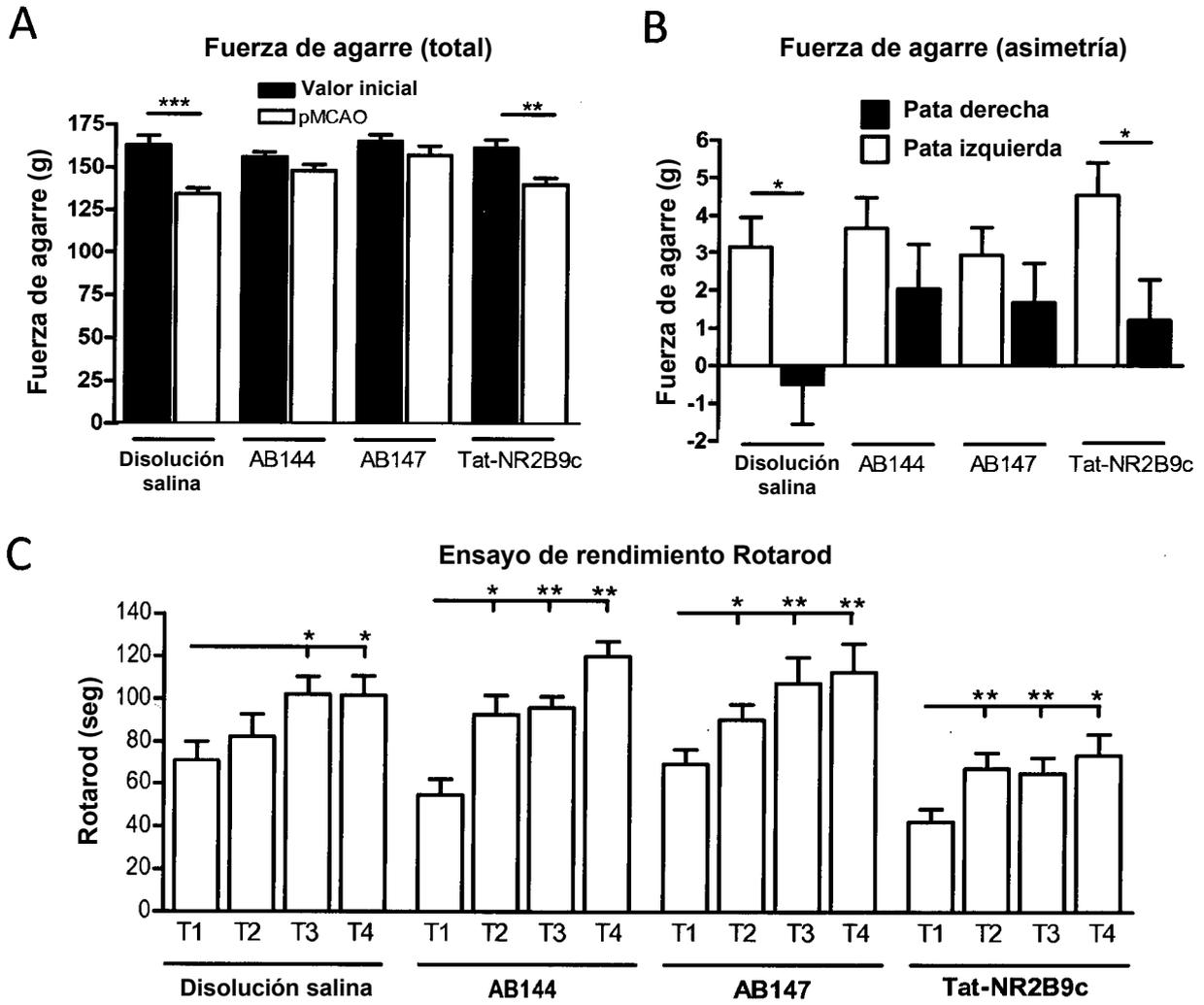
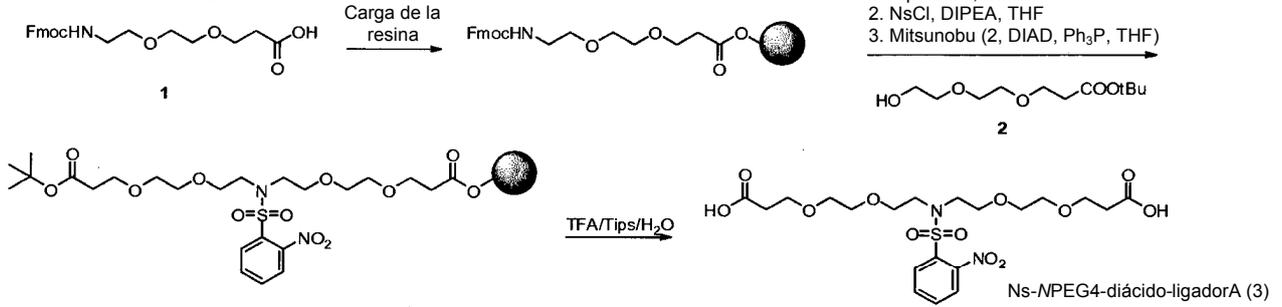




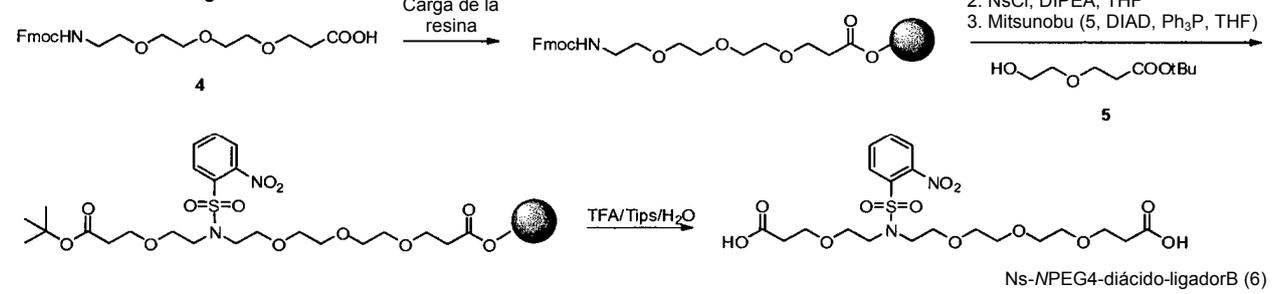
Figura 16

Esquema 1

**A. Ns-NPEG4-diácido-ligadorA:**



**B. Ns-NPEG4-diácido-ligadorB:**



**C. Ns-NPEG4-diácido-ligadorC:**

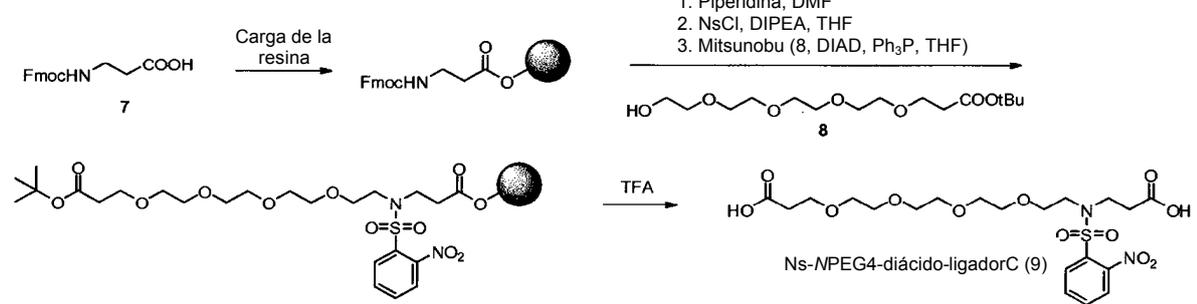


Figura 17

**Efecto de AB125 sobre el umbral de retirada de la pata en el modelo de CFA**

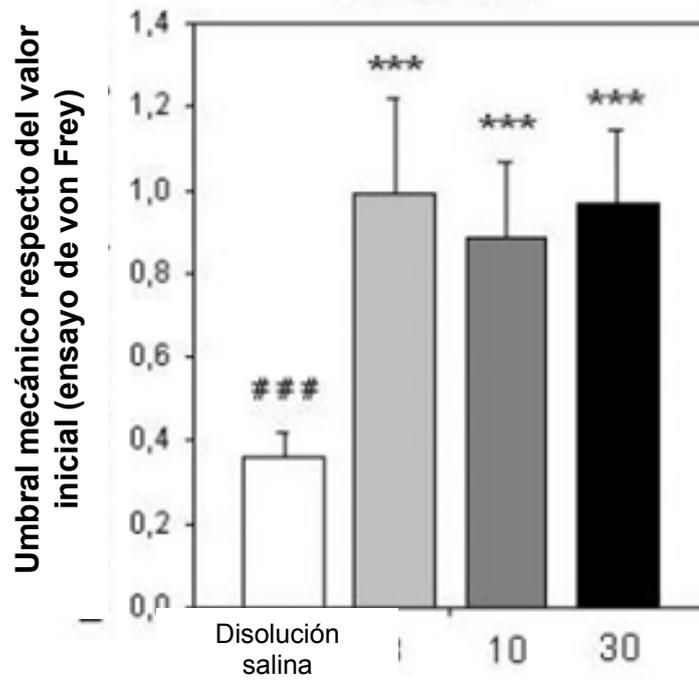


Figura 18

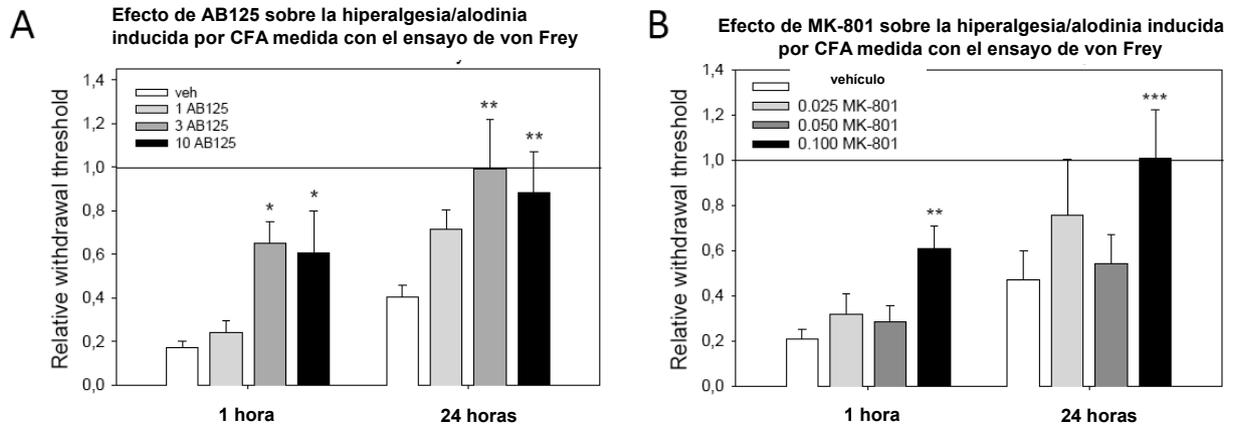


Figura 19

Efecto de AB125 sobre la hiperalgesia/alodinia inducida por CFA medida con el ensayo de von Frey

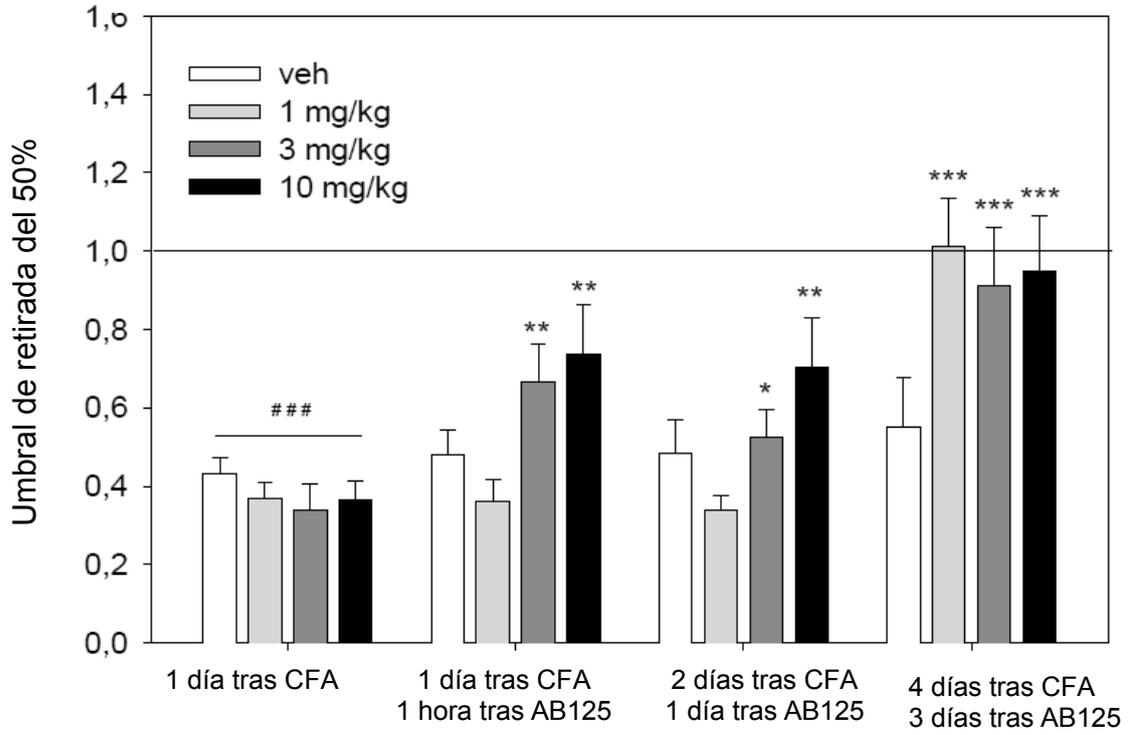


Figura 20

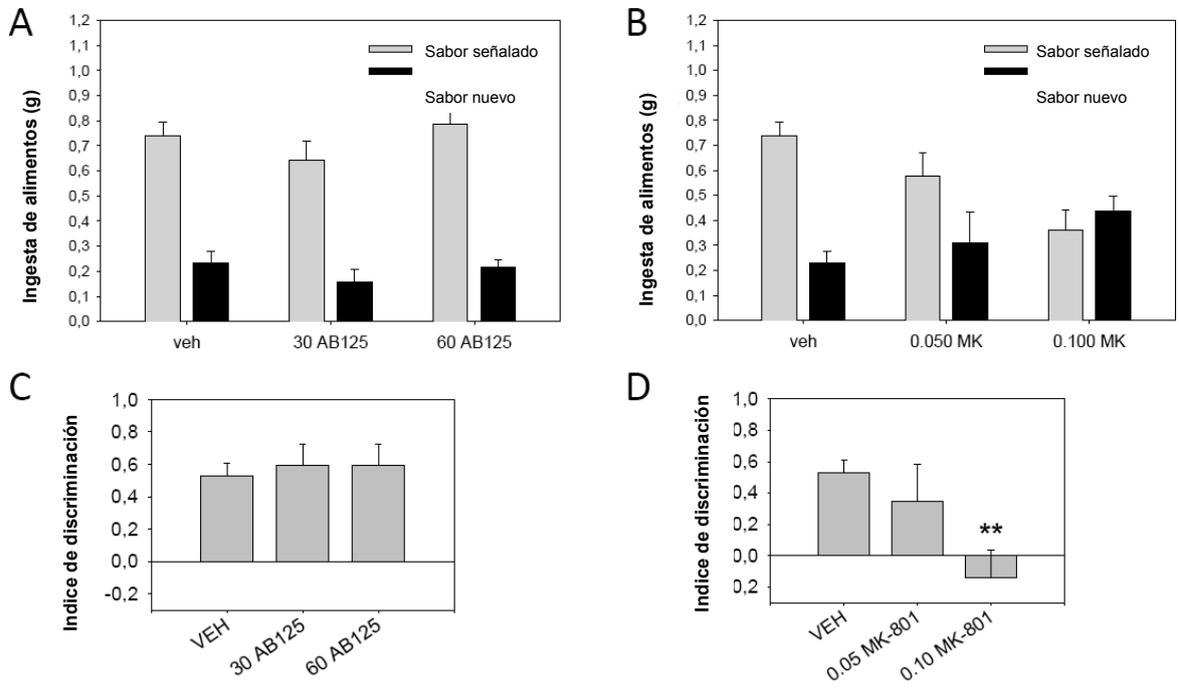
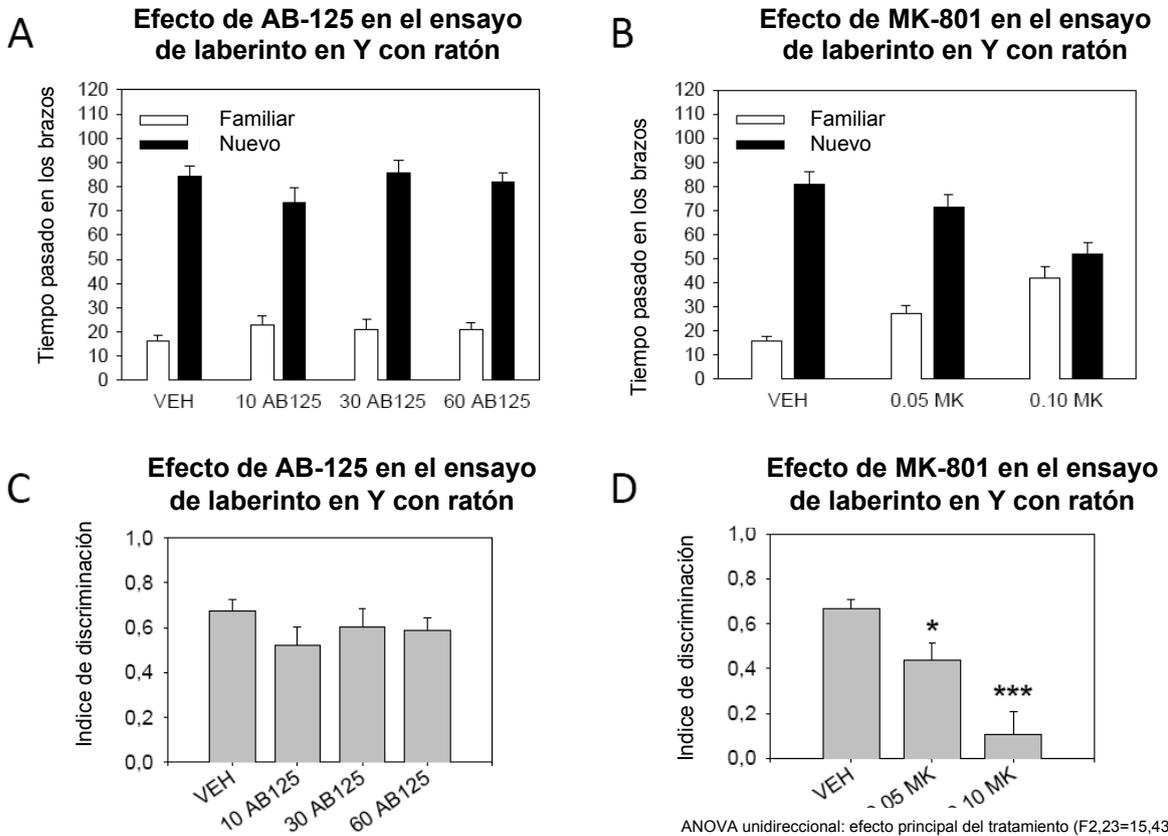


Figura 21



ANOVA unidireccional: no hay efecto principal del tratamiento ( $F_{3,29}=0,85$ ;  $p=0,478$ )

ANOVA unidireccional: efecto principal del tratamiento ( $F_{2,23}=15,43$ ;  $p<0,001$ ). Comparaciones planificadas: efecto sign. de 0,05 mg/kg ( $p=0,019$ ) y 0,10 mg/kg ( $p<0,001$ ).

Figura 22

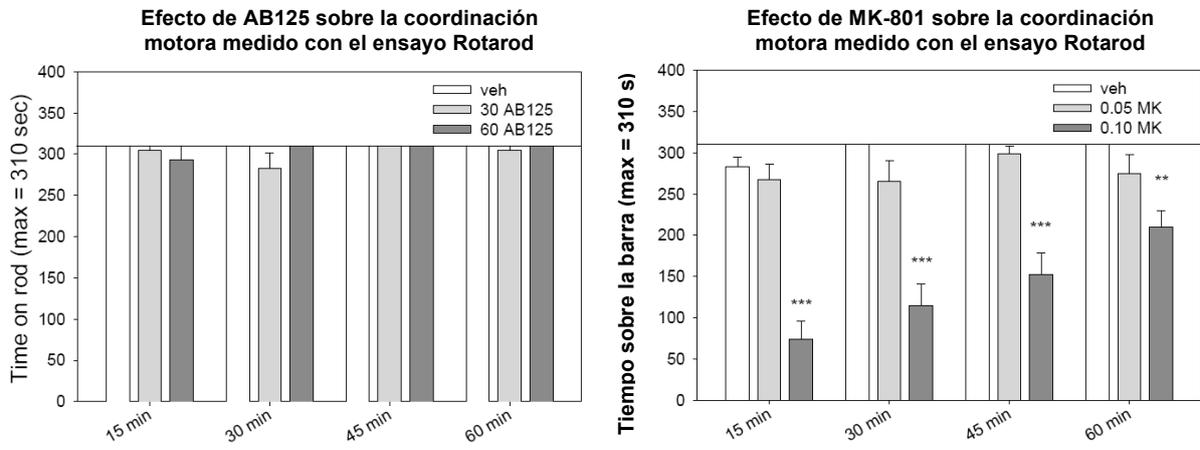


Figura 23

**Efecto de AB144 sobre la hiperalgesia/alodinia inducida por CFA medido con el ensayo de von Frey**

