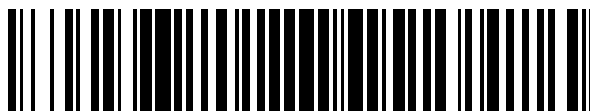


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 770**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2011** **E 11785011 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2640739**

54 Título: **Inhibidores de apoptosis y usos de los mismos**

30 Prioridad:

18.11.2010 WO PCT/IB2010/003158

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

11.12.2015

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)**

**3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARRERE, STÉPHANIE;
NARGEOT, JOËL;
LEBLEU, BERNARD;
BOISGUERIN, PRISCA y
PIOT, CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 553 770 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 de apoptosis y usos de los mismos

5 **Solicitud relacionada**

La presente solicitud de patentes reivindica la prioridad a la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/IB2010/003158 presentada el 18 de noviembre de 2010, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

10

Sector de la técnica

La invención se refiere a inhibidores de apoptosis y a sus usos, en particular en tratamientos médicos.

15 **Estado de la técnica**

La enfermedad cardíaca coronaria es la causa principal de muerte en todo el mundo, representando 3,8 millones de muertes en hombres y 3,4 millones de muertes en mujeres al año. A medida que la población envejece y las comorbilidades (por ejemplo, obesidad y síndrome metabólico) llegan a ser más prevalentes, al igual que en los últimos años, la carga de salud pública enorme causada por la insuficiencia cardíaca isquémica probablemente va a aumentar incluso más (revisado en Yellon *et al.*, N Engl J Med, 2007; 357: 1121-1135).

20

La enfermedad cardíaca coronaria se refiere a la insuficiencia de la circulación coronaria para proporcionar un suministro de sangre adecuado al músculo cardíaco y al tejido circundante. La causa más común de la enfermedad cardíaca coronaria es la acumulación de placas ateromatosas (es decir, depósitos grasos) dentro de las paredes de las arterias coronarias. La oclusión de una arteria coronaria limita el flujo de sangre al corazón, conduce a isquemia de las células del miocardio (es decir, inanición celular derivada de una falta de oxígeno) y puede dar como resultado muerte celular del miocardio, que se denomina infarto de miocardio (MI) o infarto de miocardio agudo (AMI) - conocido normalmente como ataque cardíaco. El AMI es la causa principal de muerte tanto en Europa como en Estados Unidos, y sigue siendo una enfermedad frecuente (más de 1,5 millones de nuevos casos al año en Estados Unidos) e incapacitante (que conduce a insuficiencia cardíaca). El tamaño del infarto es un determinante principal de la recuperación funcional del miocardio y la mortalidad después del AMI. En la actualidad, la forma más eficaz de limitar el tamaño del infarto es reperfundir el miocardio en peligro tan pronto como sea posible con el uso de angioplastia coronaria o trombólisis y evitar la reoclusión de la arteria coronaria con el uso de terapia antiplaquetaria. La reperfusión, o restablecimiento del flujo sanguíneo al miocardio isquémico, se consigue con terapia trombolítica que disuelve el trombo o a través de la dilatación de la arteria ocluida mediante angioplastia coronaria percutánea. La reperfusión es necesaria para el rescate de las células del miocardio y la función cardíaca en general. Sin embargo, la reperfusión inicia una cascada de sucesos que conduce a "lesión por reperfusión". Esto también se produce después de la recuperación de la parada cardioplégica del corazón durante cirugía de revascularización quirúrgica. La lesión por reperfusión se caracteriza por arritmias, disfunción endotelial que conduce al fenómeno de no reflujo y aturdimiento miocárdico (pérdida reversible de la contractilidad del miocardio).

25

30

35

40

La lesión por reperfusión culmina en muerte a poco tópicamente de células cardíacas que eran viables inmediatamente antes de la reperfusión del miocardio. La implicación de una forma altamente regulada de muerte celular durante la isquemia/reperfusión del miocardio puede conducir a nuevas intervenciones terapéuticas en la fase de reperfusión. Sin embargo, las rutas de señalización de apoptosis que están implicadas durante la isquemia/reperfusión del miocardio todavía no se han definido totalmente *in vivo*.

45

El hallazgo de nuevos tratamientos para la inhibición de la apoptosis (es decir, "muerte celular programada"), y en particular para el tratamiento del infarto de miocardio y lesión por reperfusión, constituye por lo tanto un desafío real para proteger la función cardíaca y para salvar vidas.

50

Objeto de la invención

La invención se basa en el hallazgo de que es posible disminuir la apoptosis de células cardíacas después de infarto de miocardio mediante la inhibición de la ruta de señalización de Fas. El Receptor Fas se trimeriza después de su unión al FasL (Ligando Fas) e induce la apoptosis a través de un dominio citoplasmático denominado DD (Dominio de Muerte) que interactúa con adaptadores de la señalización tales como FAF-1 (Factor-1 Asociado a Fas), FADD (Dominio de Muerte Asociado a Fas), DAXX (proteína Asociada a Dominio de Muerte), FAP-1, FLASH (proteína grande asociada a FLICE) y RIP (Proteína de Interacción con Receptor). DAXX y FADD se unen de forma independiente a Fas, y activan distintas rutas apoptóticas. DAXX puede aumentar la apoptosis mediada por Fas mediante la activación de la cascada de JNK quinasa, que culmina en la fosforilación y activación de factores de transcripción tales como c-Jun. Por el contrario, FADD desencadena, a través de una cascada de caspasas de señalización, la liberación de factores proapoptóticos mitocondriales tales como CytoC (Citocromo-C) y SMAC (Activador de Caspasas derivados de Segunda Mitocondria) también denominado Diablo.

55

60

65

Los inventores han mostrado que la inhibición de la interacción del Receptor Fas con DAXX (SEC ID N°: 1) o con FADD (SEC ID N°: 8) conduce a una fuerte disminución de la apoptosis de células cardíacas después del infarto de miocardio. Además, los presentes inventores han encontrado de forma inesperada que pequeños fragmentos de DAXX y de FADD mantienen la capacidad antiapoptótica de las proteínas DAXX y FADD completas,

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un péptido que consiste en:

- un fragmento de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 restos de aminoácidos consecutivos de la proteína DAXX de la SEC ID N°: 1, en la que dicho fragmento comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 5, en la que dicho péptido es capaz de inhibir la apoptosis celular. También se describe:
- un fragmento de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 restos de aminoácidos consecutivos de la proteína FADD de la SEC ID N°: 8, en la que dicho fragmento comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 12,

en la que dicho péptido es capaz de inhibir la apoptosis celular.

En ciertas realizaciones, un péptido antiapoptótico de acuerdo con la invención es un fragmento de proteína DAXX que consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 5. En otras realizaciones, un péptido antiapoptótico es un fragmento de DAXX que consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en una cualquiera de las SEC ID N°s: 21-44.

Otro péptido antiapoptótico que se describen el presente documento es un fragmento de proteína FADD que consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 12 o SEC ID N°: 9. También se describe un péptido antiapoptótico que es un fragmento de FADD que consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en una cualquiera de las SEC ID N°s: 45-57.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un peptidomimético de un péptido antiapoptótico de acuerdo con la invención.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un péptido antiapoptótico o un peptidomimético de acuerdo con la invención unido a un Péptido de Penetración Celular. El Péptido de Penetración Celular puede ser Tat, RXR, Bpep o Pip2b.

En ciertas realizaciones, el Péptido de Penetración Celular se une al péptido o al peptidomimético a través de un conector.

En ciertas realizaciones, el Péptido de Penetración Celular se selecciona entre el grupo que consiste en Tat, RXR, Bpep y Pip2b.

En particular, en ciertas realizaciones preferentes, el conjugado consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 58, SEC ID N°: 59, SEC ID N°: 60 o SEC ID N°: 61.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de al menos un péptido, o al menos un peptidomimético o al menos un conjugado de acuerdo con la invención.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un agente biológicamente activo adicional. En particular, el agente biológicamente activo se puede seleccionar entre el grupo que consiste en ciclosporina A, BH4, y combinaciones de los mismos.

Además en otro aspecto, la presente invención proporciona los péptidos, peptidomiméticos, conjugados y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal, en particular para uso en un método para inhibir la apoptosis celular en el cuerpo humano o animal.

En ciertas realizaciones, los péptidos, peptidomiméticos, conjugados y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se usan en un método para el tratamiento de infarto de miocardio agudo (AMI), infarto cerebral, trasplantes de órganos, intervenciones cardíacas (circulación extracorpórea y oclusión de vasos temporal), o alteraciones de la circulación agudas (estado de shock), en el cuerpo humano o animal.

En otras realizaciones, los péptidos, peptidomiméticos, conjugados y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se usan en un método para el tratamiento de isquemia, en particular isquemia cardíaca, isquemia renal, colitis isquémica, isquemia mesentérica, isquemia cerebral, isquemia límbica o isquemia cutánea, en el cuerpo humano o animal.

Además en otras realizaciones, los péptidos, peptidomiméticos, conjugados y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se usan en un método para el tratamiento de lesión por reperfusión en el cuerpo humano o animal.

5 En un aspecto relacionado, la presente invención también proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la apoptosis en un sujeto, que comprende una etapa de: administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de al menos un péptido, o al menos un peptidomimético, o al menos un conjugado o al menos una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

10 En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente una etapa de administración a dicho sujeto de al menos un agente biológicamente activo adicional seleccionado entre el grupo que consiste en ciclosporina A, BH4, y combinaciones de los mismos.

15 Como se ha mencionado anteriormente, en estos métodos de tratamiento, la enfermedad o afección asociada con la apoptosis se puede seleccionar entre el grupo que consiste en infarto de miocardio agudo (AMI), infarto cerebral, trasplantes de órganos, intervenciones cardíacas, alteraciones de la circulación agudas, lesión por reperfusión, e isquemia.

20 Estos y otros objetos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes para los expertos habituales en la materia que hayan leído la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferentes.

Descripción de las figuras

25 **Figura 1: Determinación del epítipo de DAXX mediante síntesis de SPOT. (A)** La secuencia de aminoácidos de DAXX se analizó minuciosamente haciendo coincidir matrices de péptidos (pepscan; péptidos 15 mer con un desplazamiento de 3 aminoácidos) y se analizó en transferencia unida a enzimas. El rectángulo de color negro muestra las cuatro aplicaciones puntuales más brillantes con la correspondiente secuencia del epítipo. Condiciones de incubación: región intracelular etiquetada con His de receptor Fas [10 µg/ml]; anticuerpos: anti-His-(ratón) (Sigma H1029; 1:6,000) / anti-ratón-HRP (Calbiochem 401207; 1:2,000), tiempo de exposición: 1 minuto. **(B)** Alineamiento de la secuencia de DAXX humana que comprende el 16-mer KKSRRKEKKQTGSGPLG (= DAXXp de la SEC ID N°: 5) con las secuencias de DAXX de otras especies (ratón, rata, perro (CANFA) y mono verde (CHLAE)).

35 **Figura 2: Determinación de la longitud óptima del epítipo de DAXX (= DAXXp) mediante síntesis de SPOT. (A)** Los péptidos DAXXp-211 y DAXXp-209 (de la SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3, respectivamente) se acortaron sucesivamente mediante un resto de aminoácido en el extremo N, en el extremo C y tanto en los extremos N como C, y se analizaron usando transferencia unida a enzimas. Las transferencias puntuales indicadas por una flecha presentaban las intensidades de la señal más elevadas (BLU). Condiciones de incubación: región intracelular etiquetada con His de receptor Fas [10 µg/ml]; anticuerpos: anti-His-(ratón) (Sigma H1029; 1:6.000) / anti-ratón-HRP (Calbiochem 401207; 1:2,000), tiempo de exposición: 1 minuto. **(B)** Alineamiento de ambas secuencias peptídicas DAXXp-211 y DAXXp-209; que corresponden a las aplicaciones puntuales más brillantes, para determinar la secuencia peptídica de DAXX óptima.

45 **Figura 3: Evaluación de la capacidad de proteasa de Tat-DAXXp y Pip2b-DAXXp. (A)** Medidas de conjugados de Tat-DAXXp y Pip2b-DAXXp en suero bovino fetal (FBS, BioWest) y **(B)** suero de ratón recién preparado (MS). Los péptidos se incubaron con suero al 20 % a 37 °C durante 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, y 48 h, y se precipitaron 50 µl de la mezcla de incubación en 100 µl de ácido dicloroacético al 10 % (DCA) en H₂O/CH₃CN (50/50). Las muestras se mezclaron y se mantuvieron a -20 °C. Las proteínas del suero precipitadas se separaron por centrifugación (14.000 rpm, 10 minutos) y el sobrenadante se analizó por HPLC en fase inversa (medida del área máxima en mV*sec). n ≥ 2 para cada condición. Después de un periodo de incubación de 2 h en suero de ratón, más de un 70 % de los péptidos todavía están intactos, mientras que después de 24 horas todos los péptidos se degradan.

55 **Figura 4: La distribución celular depende del tiempo de incubación.** Los cardiomiocitos primarios se incubaron con una solución 1 µM de conjugados de Tat-DAXXp etiquetados con CF (fluorescencia verde) durante 1 h, 4 h o 6 h. Los núcleos celulares se tiñeron con colorante de Hoechst (azul). Las barras de color blanco representan 10 µm. La distribución intracelular de CF-Tat-DAXXp después de un periodo de incubación de 1 h reveló un patrón puntuado interrumpido en el citosol (que se caracteriza por atrapamiento endosómico de los péptidos después de internalización mediante endocitosis) y no se detectó ninguna localización nuclear. Después de un periodo de incubación de 4 h, parece que CF-Tat-DAXXp es capaz de escapar de las vesículas endosómicas dando lugar a un patrón de etiquetado más difuso. Además, se observó una acumulación en el núcleo. Después de un periodo de incubación más largo (6 horas), el péptido etiquetado con CF se encapsuló en vesículas grandes (flechas de color blanco) y se eliminó de las células.

65 **Figura 5: Evaluación *in vitro* de la actividad antiapoptótica de los CPP y conjugados de CPP.** Los datos del flujo de trabajo y cuantificación de la fragmentación del ADN en **(A)** células C2C12, **(B)** cardiomiocitos primarios,

(C) células H9c2 y (D) células NG108-15 se normalizaron a un 100 % de STS. Los datos mostrados son la media $\pm$ ETM, con $n \geq 5$. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante una noche. al día siguiente, las células se incubaron con STS solo o con STS + péptido 1 μ M (en OptiMEM) (la concentración de STS y el tiempo de incubación para cada célula se proporcionan en la figura). A partir de ese momento, las soluciones se retiraron, se sustituyeron por medio completo y se incubaron adicionalmente durante 40 h. Después de la fase de regeneración, las células se lisaron y la fragmentación del ADN se detectó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit ELISA^{PLUS} de detección de Muerte Celular - *Roche Diagnostics*).

Figura 6: Actividad antiapoptótica de variantes de la secuencia de Tat-DAXXp en cardiomiocitos primarios. Como se describe en la leyenda de la Figura 5, los diferentes análogos de la secuencia DAXXp (véase la Tabla 2) se evaluaron para propiedades anti-apoptóticas frente a STS (kit ELISA^{PLUS} de detección de Muerte Celular - *Roche Diagnostics*). Ninguno de los análogos fue capaz de proteger los cardiomiocitos primarios - un hecho que confirma que el DAXXp de 16mer tiene la longitud y secuencia óptimas para el efecto cardioprotector más elevado.

Figura 7: Comparación del DAXXp de murino/rata con la secuencia de DAXXp humano en términos de actividad antiapoptótica en células C2C12, cardiomiocitos primarios, y H9c2. La secuencia de DAXXp de murino conjugada con Tat (Tat-mDAXXp - SEC ID N°: 61) que es idéntica a la secuencia de DAXXp de rata (véase en la Figura 1B), comparó con el constructo humano (Tat-DAXXp) en términos de propiedades antiapoptóticas frente a STS (kit ELISA^{PLUS} de detección de Muerte Celular - *Roche Diagnostics*). Las células C2C12 y los cardiomiocitos primarios usados eran de ratón y las células H9c2 de rata. En todas las células, se observó un aumento del efecto antiapoptótico usando la secuencia de Tat-mDAXXp murino debido a tipos de células de murino o de rata.

Figura 8: Determinación de FADDp15 y su efecto antiapoptótico en cardiomiocitos. (A) Las secuencias de proteínas de FADD se analizaron minuciosamente solapando haciendo coincidir matrices de péptidos (pepscan; péptidos 15 mer con un desplazamiento de 3 aminoácidos) y se analizaron usando transferencia unida a enzimas. El rectángulo de color negro muestra las tres aplicaciones puntuales más brillantes con las correspondientes secuencias del epítipo, los números de aplicación puntual e intensidades de señal (BLU) se proporcionan a continuación. (B) La secuencia peptídica de FADDp-11 (= FADDp15 = SEC ID N°: 9) se acortó sucesivamente mediante un resto de aminoácido en el extremo C, el extremo N, o tanto en el extremo C como en el extremo N, y se analizó usando transferencia unida a enzimas. Las aplicaciones puntuales indicadas con una fecha presentaban intensidades de la señal más elevadas (BLU). El epítipo de FADD más corto (un 9-mer con la secuencia KRKLERVQS (= FADDp = SEC ID N°: 12)) correspondía a la transferencia puntual N° 24. Condiciones de incubación: región intracelular etiquetada con His de receptor Fas [10 μ g/ml]; anticuerpos: anti-His-(ratón) (Sigma H1029; 1:6.000) / anti-ratón-HRP (Calbiochem 401207; 1:2.000), tiempo de exposición: 1 minuto.

Figura 9: Comparación de constructos de FADDp con Tat-DAXXp en términos de actividad antiapoptótica en cardiomiocitos primarios y en células H9c2. Cuantificación de la fragmentación del ADN en (A) cardiomiocitos primarios y (B) células H9c2. Los datos se normalizaron a un 100 % de STS. Los datos mostrados son la media $\pm$ ETM, con $n \geq 5$. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante una noche. al día siguiente, las células se incubaron con STS solo o con STS + péptido 1 μ M (en OptiMEM) (la concentración de STS se proporciona en la figura y el tiempo de incubación se proporciona en la Figura 5). A partir de ese momento, las soluciones se retiraron, se sustituyeron por medio completo y se incubaron adicionalmente durante 40 h. Después de la fase de regeneración, las células se lisaron y la fragmentación del ADN se detectó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit ELISA^{PLUS} de detección de Muerte Celular - *Roche Diagnostics*). Se encontró que la secuencia de Tat-FADDp corta era menos eficaz que la de Tat-DAXXp, pero la Tat-FADDp15 más larga tenía un efecto antiapoptótico igual (en H9c2) o mayor (en cardiomiocitos primarios).

Figura 10: Comparación de Tat-DAXXp y Tat-FADDp15 solo y en combinación en cardiomiocitos primarios y en células H9c2. Se encontró que una incubación tanto con Tat-DAXXp 0,5 μ M como con Tat-FADDp15 0,5 μ M daba como resultado el mismo efecto antiapoptótico o incluso más elevado cuando se comparaba con el péptido solo a 1 μ M. además, la incubación con ambos péptidos a 1 μ M conducía a la protección más elevada en ambos tipos de células, lo que sugiere que una combinación de Tat-DAXXp y Tat-FADDp15 podría ser una aplicación prometedora.

Figura 11: Protocolo experimental *in vivo*. Los ratones C57B16 se sometieron a un protocolo quirúrgico de isquemia-reperusión del miocardio (IR). El recuadro de color negro representa el periodo de isquemia al que se sometieron los ratones. Se realizaron medidas del tamaño del infarto o muerte celular al final de la cirugía para cada protocolo (indicado con $\uparrow$). IR_{60'}: 40 minutos de Isquemia, 60 minutos de Reperusión. IR_{24h}: 40 minutos de Isquemia y 24 horas de Reperusión.

Figura 12: Efectos cardioprotectores de Tat-DAXXp (1 mg/kg - IV) en ratones sometidos a IR_{60'}. El tamaño del infarto (en % de área en riesgo) y la fragmentación del ADN internucleosómico determinado por ELISA se cuantificaron en ratones sometidos a IR_{60'} y tratados con Tat, Tat-DAXXp o Tat-scrDAXXp (1 mg/kg) así como

con DAXXp (10 mg/kg) (inyección intravenosa (IV) 5 minutos antes de la reperusión). Las medias $\pm$ ETM se representaron para **(A)**: Área en riesgo/masa de LV (ventrículo izquierdo), **(B)**: Tamaño del infarto (en % de área en riesgo) y **(C)**: (proporción de I/NI) que corresponde a la proporción de nucleosoma soluble en la parte isquémica con respecto a la parte no isquémica de tejidos de LV. El análisis estadístico se realizó usando de una vía con Neuman-Keuls después del ensayo para comparaciones múltiples (software GraphPad Prism). $P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$ con respecto a Tat-DAXXp se indicaron como *, **, y *** respectivamente. $P = ns$ (no significativo) para $P > 0,05$.

Figura 13: Respuesta a la dosis para Tat-DAXXp y DAXXp en ratones sometidos a IR_{60'}. El tamaño del infarto (en % de área en riesgo) y la fragmentación del ADN internucleosómico determinado por ELISA se cuantificaron en ratones sometidos a IR_{60'} y tratados con Tat (1 mg/kg), Tat-DAXXp (0,1, 1 y 10 mg/kg) o DAXXp (0,1, 1 y 10 mg/kg) inyectados por vía intravenosa 5 minutos antes de la reperusión. Las medias $\pm$ ETM se representaron para **(A)**: Área en riesgo/masa de LV (ventrículo izquierdo), **(B)**: Tamaño del infarto (en % de área en riesgo) y **(C)**: (proporción de I/NI) que corresponde a la proporción de nucleosoma soluble en la parte isquémica con respecto a la parte no isquémica de tejidos de LV.

Figura 14: Efectos cardioprotectores de Tat-DAXXp (1 mg/kg-IV) en ratones sometidos a IR_{24h}. El tamaño del infarto (en % de área en riesgo) y la fragmentación del ADN internucleosómico determinado por ELISA se cuantificaron en ratones sometidos a IR_{24h} y se trataron con Tat, Tat-DAXXp o Tat-scrDAXXp (1 mg/kg) así como con DAXXp (10 mg/kg) (inyección IV 5 minutos antes de la reperusión). Las medias $\pm$ ETM se representaron para **(A)**: Área en riesgo/masa de LV (ventrículo izquierdo), **(B)**: Tamaño del infarto (en % de área en riesgo) and **(C)**: (proporción de I/NI) que corresponde a la proporción de nucleosoma soluble en la parte isquémica con respecto a la parte no isquémica de tejidos de LV. El análisis estadístico se realizó usando de una vía con Neuman-Keuls después del ensayo para comparaciones múltiples (software GraphPad Prism). $P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$ con respecto a Tat-DAXXp se indicaron como *, **, *** respectivamente. $P = ns$ (no significativo) para $P > 0,05$.

Figura 15: Respuesta a la dosis para Tat-DAXXp y DAXXp en ratones sometidos a IR_{24h}. El área en riesgo y el tamaño del infarto (en % de área en riesgo) se midieron en ratones sometidos a IR_{24h} y se trataron con Tat (1 mg/kg), Tat-DAXXp (0,1, 1 y 10 mg/kg) o DAXXp (0,1, 1 y 10 mg/kg) inyectados por vía intravenosa 5 minutos antes de la reperusión. Las medias $\pm$ ETM se representaron para **(A)**: Área en riesgo/masa de LV (ventrículo izquierdo), **(B)**: Tamaño del infarto (en % de área en riesgo).

Figura 16: Visualización de constructos de Tat-DAXXp en el miocardio. Los ratones se inyectaron en el momento de la reperusión con 1 mg/kg de constructor de CF-Tat-DAXXp (CF: Carboxifluoresceína). Se obtuvieron secciones de LV (20 μ m) con un vibratomo después de fijación con paraformaldehído durante 2 horas (PFA al 4 % en tampón de fosfato). Las imágenes confocales de 2 μ m mostraron claramente un etiquetado de color verde en miocitos que indicaba la presencia del constructo peptídico en el citosol. Los círculos resaltan la presencia del constructo peptídico en el núcleo positivo para DAPI tal como se observa en unos pocos casos (inmersión en aceite X40).

Figura 17: Datos preliminares en isquemia fría/lesión por reperusión durante trasplante de riñón. La muerte cerebral y la isquemia fría prolongada son los principales contribuyentes al peor resultado a largo plazo de los trasplantes a partir de trasplantes de riñón de donantes fallecidos, con un impacto aún más elevado si se usan donantes con aumento de los criterios ('órganos marginales'). El direccionamiento de la inflamación intrainjerto relacionada con la lesión de isquemia-reperusión (IR) es un concepto atractivo para mejorar el resultado de esos injertos. **(A)** Flujo de trabajo de isquemia fría/reperusión durante el trasplante de riñón en ratas. Después de una isquemia fría de 24 h, el injerto de riñón se trasplantó de forma ortotópica en receptores LEW macho usando técnicas convencionales de microcirugía. Los péptidos se inyectaron inmediatamente después de la reperusión en una sola inyección i.v. a 1 mg/kg. Tres días después del trasplante, los injertos se recogieron para el análisis de RT-PCR ($n = 3$). **(B)** El ARN total se transcribió de forma inversa en ADNc y se sometió a RT-PCR en tiempo real cuantitativa usando el Sistema de Detección de Secuencias GeneAmp 5700 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania). Las reacciones de Taqman-PCR para ICAM-1, IFN- γ , TNF- α , interleuquina (IL)-6 y bcl-2 (sintetizadas por Metabion, Martinsried, Alemania) se realizaron en un volumen final de 25 μ l. Estos datos preliminares muestran que en presencia de Tat-DAXXp, se producía una reducción en la expresión del ARNm de IFN- γ e ICAM-1 en injerto de riñón 3 días después del trasplante.

Definiciones

A través de la memoria descriptiva, se usan varios términos que se definen en los párrafos siguientes.

Los términos "proteína", "polipéptido", y "péptido" en el presente documento se usan de forma indistinta, y hacen referencia a secuencias de aminoácidos de una diversidad de longitudes, ya sea en sus formas neutras (sin carga) o en forma de sales, y ya sea sin modificar o modificadas mediante glicosilación, oxidación de cadena lateral, o fosforilación. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos es una proteína nativa de longitud completa. Sin embargo, en realizaciones preferentes, la secuencia de aminoácidos es un fragmento de la proteína de longitud

completa. En otras realizaciones más, la secuencia de aminoácidos se modifica con sustituyentes adicionales unidos a las cadenas laterales de aminoácidos, tales como unidades de glicosilo, lípidos, o iones inorgánicos tales como fosfatos, así como modificaciones que se refieren a la conversión química de las cadenas tal como oxidación de grupos sulfhidrilo. Por lo tanto, el término "proteína" (o sus términos equivalentes) pretenden incluir la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa de longitud completa, o un fragmento de la misma, sujeta a esas modificaciones que no cambian de forma significativa sus propiedades específicas. En particular, el término "proteína" incluye isoformas de proteína, es decir, variantes que se codifican con el mismo gen, pero que difieren en su pl o MW, o ambos. Tales isoformas pueden diferir en sus secuencias de aminoácidos (por ejemplo, como resultado de corte y empalme alternativo o proteólisis limitada), o como alternativa, pueden surgir de modificación diferencial posterior a la traducción (por ejemplo, glicosilación, acilación, fosforilación).

El término "análogo", cuando se usa en el presente documento en referencia a una proteína o polipéptido, se refiere a un péptido que posee una función similar o idéntica a la de la proteína o polipéptido pero no se requiere que comprenda necesariamente una secuencia de aminoácidos que sea similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o polipéptido o una estructura que sea similar o idéntica a la de la proteína o polipéptido. Preferentemente, en el contexto de la presente invención, un análogo tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 30 %, más preferentemente, al menos un: 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o un 99 %, a la secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido. En ciertas realizaciones preferentes, un análogo de una proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 80 % o idéntica en al menos un 85 %, preferentemente idéntica en al menos un 90 %, y lo más preferentemente idéntica en al menos un 95 % a la secuencia de aminoácidos de la proteína.

El término "fragmento", cuando se usa en el presente documento en referencia a una proteína o polipéptido, se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos consecutivos y de menos de 30 restos de aminoácidos consecutivos de la proteína o polipéptido, por ejemplo, de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 restos de aminoácidos consecutivos de la proteína o polipéptido, preferentemente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 restos de aminoácidos consecutivos de la proteína o polipéptido, y más preferentemente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 restos de aminoácidos consecutivos de la proteína o polipéptido. En el contexto de la presente invención, un fragmento de una proteína o polipéptido mantiene la actividad funcional de la proteína o polipéptido de longitud completa.

El término "homólogo" (u "homología"), como se usa en el presente documento, es sinónimo con el término "identidad" y se refiere a la similitud de secuencias entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por el mismo resto de aminoácido, entonces las respectivas moléculas son homólogas en esa posición. Como se usa en el presente documento, el porcentaje de identidad de secuencias se refiere a comparaciones entre secuencias de aminoácidos, y se determina por comparación de dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, en el que la parte de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni supresiones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se puede calcular determinando el número de posiciones en las que aparece el resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de las secuencias. Como alternativa, el porcentaje se puede calcular determinando el número de posiciones en las que aparece cualquier resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias o un resto de aminoácido se alinea con un hueco para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencias. Los expertos en la materia observan que existen muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede realizar, por ejemplo, usando el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443, usando la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, usando implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software GCG Wisconsin), o usando inspección visual (véase generalmente, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento de 1995) (Ausubel)). Algunos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de las secuencias y la similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul *et al.*, 1977, Nucleic Acids Res. 3389-3402, respectivamente.

Algunas secuencias de aminoácidos homólogas comparten secuencias de aminoácidos idénticas o similares. En el contexto de la presente invención, algunos restos similares son sustituciones conservativas para, o "mutaciones puntuales permitidas" de, restos de aminoácidos correspondientes en una secuencia de referencia. Algunas "sustituciones conservativas" de un resto en una secuencia de referencia son sustituciones que son física o funcionalmente similares con las del resto de referencia correspondiente, por ejemplo, que tienen un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad para formar enlaces covalentes o de

hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas particularmente precedentes son las que satisfacen los criterios definidos para una "mutación puntual aceptada" en Dayhoff *et al.*, ("Atlas of Protein Sequence and Structure", 1978, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, DC, Supl. 3, 22: 354-352).

- 5 En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" se usa para caracterizar un método que tiene como objetivo retrasar o prevenir el inicio de una enfermedad o afección, ralentizar o detener la evolución, agravamiento o deterioros de los síntomas de la afección, provocar mejoras de los síntomas de la afección, y/o curar la afección. Un tratamiento se puede administrar antes del inicio de la enfermedad o afección, para una acción profiláctica o de prevención. Como alternativa o adicionalmente, se puede administrar después del inicio de la enfermedad o
- 10 afección, para una acción terapéutica.

- Como se usa en el presente documento; el término "sujeto" se refiere a un ser humano o animal, en particular un mamífero (por ejemplo, primate, perro, gato, cabra, caballo, cerdo, ratón, rata, conejo y similares), que se pueden ver afectados con una enfermedad o afección asociada con la apoptosis, pero que pueden tener o no la enfermedad o
- 15 afección. En muchas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En tales realizaciones, el sujeto a menudo se denomina "individuo". El término "individuo" no indica una edad en particular, y por lo tanto incluye niños, adolescentes, y adultos.

- En el presente documento se define que una "**composición farmacéutica**" comprende una cantidad eficaz de a péptido de la invención, y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20

- Como se usa en el presente documento, la expresión "**cantidad eficaz**" se refiere a cualquier cantidad de un péptido, compuesto, agente, o composición que es suficiente para satisfacer su finalidad o finalidades pretendidas, por ejemplo, una respuesta biológica o médica deseadas en una célula, tejido, sistema o sujeto. Por ejemplo, en
- 25 ciertas realizaciones de la presente invención, la finalidad o finalidades pueden ser: inhibir, prevenir o disminuir la apoptosis, tal como por ejemplo la apoptosis asociada con lesión por reperusión o trasplante de órganos; y/o prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada con la apoptosis.

- La expresión "**vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un medio de vehículo que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio o principios activos y que no es significativamente tóxico para el hospedador a la concentración a la que se administra. La expresión incluye disolventes, dispersión, medios, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, y agentes para el retraso de la adsorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica (véase por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, 18ª Ed., 1990, Mack
- 30 Publishing Co.: Easton, PA, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).
- 35

Descripción detallada de la invención

- Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a péptidos con propiedades antiapoptóticas que son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento y/o prevención de una gran diversidad de enfermedades afecciones asociadas con la apoptosis.
- 40

Péptidos que inhiben la apoptosis celular

- 45 Los péptidos que se describen en el presente documento incluyen fragmentos de DAXX y fragmentos de FADD que presentan actividad antiapoptótica.

- Los términos "DAXX" y "proteína DAXX" se usan en el presente documento de forma indistinta. Éstos hacen referencia a la proteína denominada proteína 6 asociada con muerte 6 que, en seres humanos, está codificada por el gen DAXX (Ref Sec (ARNm): NM_001141969.1) ubicado en la posición 21.3 en el brazo corto (p) del cromosoma 6. En realizaciones preferentes, DAXX tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 1. Sin embargo, la proteína DAXX puede ser una isoforma de la proteína DAXX de la SEC ID N°: 1 y por lo tanto puede tener cualquier secuencia de aminoácidos que está codificada por el gen DAXX humano.
- 50

- Los términos "FADD" y "proteína FADD" se usan en el presente documento de forma indistinta. Éstos hacen referencia a la proteína denominada proteína Asociada con Fas con Dominio de Muerte que, en seres humanos, está codificada por el gen FADD (Ref Sec (ARNm): NM_003824.3) ubicado en la posición 13.3 en el brazo largo (q) del cromosoma 11. Preferentemente, FADD tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 8. Sin embargo, la proteína FADD puede ser una isoforma de la proteína FADD de la SEC ID N°: 8 y por lo tanto puede tener cualquier secuencia de aminoácidos que este codificada por el gen FADD humano.
- 55
- 60

- Los inventores han mostrado que algunos péptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 5 ("DAXXp"), en la SEC ID N°: 6 ("DAXXp-14") o en la SEC ID N°: 2 ("DAXXp-15" = "DAXXp-211"), todos los cuales son fragmentos de la proteína DAXX (SEC ID N°:1), interactúan con el receptor Fas, pero que solamente DAXXp es capaz de disminuir la apoptosis celular. De forma análoga, los inventores han encontrado que algunos péptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID
- 65

Nº: 9 ("FADDp15") y SEC ID Nº: 12 ("FADDp"), que ambos son fragmentos de la proteína FADD (SEC ID Nº: 8), interactúan con el receptor Fas y disminuyen la apoptosis celular.

Por lo tanto, en una realización en particular, el péptido antiapoptótico de acuerdo con la invención es un fragmento de DAXX de 16 restos de aminoácidos consecutivos que consiste en la SEC ID Nº: 5. En otra realización en particular, el péptido antiapoptótico de acuerdo con la invención es un fragmento de DAXX de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 restos de aminoácidos consecutivos que comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID Nº: 5. Preferentemente, tal péptido antiapoptótico tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en

SEC ID Nº: 17 (KKSREKKQTGSGPLGN),
 SEC ID Nº: 18 (KKSREKKQTGSGPLGNS),
 SEC ID Nº: 19 (KKSREKKQTGSGPLGNSY),
 SEC ID Nº: 20 (KKSREKKQTGSGPLGNSYV),
 SEC ID Nº: 21 (CKKSREKKQTGSGPLG),
 SEC ID Nº: 22 (PCKKSREKKQTGSGPLG),
 SEC ID Nº: 23 (PPCKKSREKKQTGSGPLG),
 SEC ID Nº: 24 (GPPCKKSREKKQTGSGPLG),
 SEC ID Nº: 25 (SGPPCKKSREKKQTGSGPLG),
 SEC ID Nº: 26 (CKKSREKKQTGSGPLGN),
 SEC ID Nº: 27 (CKKSREKKQTGSGPLGNS),
 SEC ID Nº: 28 (CKKSREKKQTGSGPLGNSY),
 SEC ID Nº: 29 (CKKSREKKQTGSGPLGNSYV),
 SEC ID Nº: 30 (PCKKSREKKQTGSGPLGN),
 SEC ID Nº: 31 (PCKKSREKKQTGSGPLGNS),
 SEC ID Nº: 32 (PCKKSREKKQTGSGPLGNSY),
 SEC ID Nº: 33 (PCKKSREKKQTGSGPLGNSYV),
 SEC ID Nº: 34 (PPCKKSREKKQTGSGPLGN),
 SEC ID Nº: 35 (PPCKKSREKKQTGSGPLGNS),
 SEC ID Nº: 36 (PPCKKSREKKQTGSGPLGNSY),
 SEC ID Nº: 37 (PPCKKSREKKQTGSGPLGNSYV),
 SEC ID Nº: 38 (GPPCKKSREKKQTGSGPLGN),
 SEC ID Nº: 39 (GPPCKKSREKKQTGSGPLGNS),
 SEC ID Nº: 40 (GPPCKKSREKKQTGSGPLGNSY),
 SEC ID Nº: 41 (GPPCKKSREKKQTGSGPLGNSYV),
 SEC ID Nº: 42 (SGPPCKKSREKKQTGSGPLGN),
 SEC ID Nº: 43 (SGPPCKKSREKKQTGSGPLGNS), y
 SEC ID Nº: 44 (SGPPCKKSREKKQTGSGPLGNSY).

Otro péptido antiapoptótico que se describe en el presente documento es un fragmento de FADD de 9 restos de aminoácidos consecutivos que consiste en la SEC ID Nº: 12, o un fragmento de FADD de 15 restos de aminoácidos consecutivos que consiste en la SEC ID Nº: 9, o un fragmento de FADD de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 restos de aminoácidos consecutivos que comprenden la SEC ID Nº: 12. Preferentemente, tal péptido antiapoptótico tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

SEC ID Nº: 45 (KRKLERVQSG),
 SEC ID Nº: 46 (KRKLERVQSG),
 SEC ID Nº: 47 (KRKLERVQSGDL),
 SEC ID Nº: 48 (KRKLERVQSGDL),
 SEC ID Nº: 49 (RKRLERVQS),
 SEC ID Nº: 50 (KRKRLERVQS),
 SEC ID Nº: 51 (GKRKLERVQSG),
 SEC ID Nº: 52 (GKRKLERVQSG),
 SEC ID Nº: 53 (GKRKLERVQSGDL),
 SEC ID Nº: 54 (GKRKLERVQSGDL),
 SEC ID Nº: 55 (VGKRKLERVQSG),
 SEC ID Nº: 56 (VGKRKLERVQSG), y
 SEC ID Nº: 57 (VGKRKLERVQSGDL).

Como se ha mencionado anteriormente, en ciertas realizaciones, la proteína DAXX es una isoforma de la proteína DAXX de la SEC ID Nº: 1. En tales realizaciones, el péptido antiapoptótico de acuerdo con la invención puede ser el fragmento de DAXX de 16 restos de aminoácidos consecutivos que corresponde al fragmento de la SEC ID Nº: 5 en la proteína DAXX de la SEC ID Nº: 1.

De forma análoga, como se ha mencionado anteriormente, la proteína FADD puede ser una isoforma de la proteína FADD de la SEC ID Nº: 8, o el fragmento de FADD de 9 restos de aminoácidos consecutivos que corresponde al

fragmento de la SEC ID N°: 12 en la proteína FADD de la SEC ID N°: 8; o puede ser el fragmento de FADD de 15 restos de aminoácidos consecutivos que corresponde al fragmento de la SEC ID N°: 9 en la proteína FADD de la SEC ID N°: 8.

- 5 Las isoformas de DAXX y las isoformas de FADD tienen preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de un 99 % con la SEC ID N°: 1 y la SEC ID N°: 8, respectivamente, y más preferentemente una identidad de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de un 99 % con la SEC ID N°: 1 y la SEC ID N°: 8, respectivamente.

- 10 Los péptidos que se describen en el presente documento, así como los derivados y conjugados de los mismos (véase a continuación), son capaces de inhibir, prevenir y/o disminuir la apoptosis celular, en particular la apoptosis de cardiomiocitos. Esta capacidad se puede evaluar usando cualquier método adecuado conocido por la persona experta, tal como por ejemplo el uso de un kit de detección de apoptosis celular. Un ejemplo de un kit adecuado para medir la apoptosis celular es el kit ELISA^{PLUS®} para Detección de Muerte Celular (N° de Cat. 11 774 425 001, Roche Applied Science).

Derivado de los péptidos de acuerdo con la invención

- 20 La invención también se refiere a derivados biológicamente activos de los péptidos de acuerdo con la invención. Con "derivado biológicamente activo" se hace referencia a cualquier derivado de un péptido de la invención que mantiene la capacidad del péptido inhibir, prevenir o disminuir la apoptosis celular.

- 25 En ciertas realizaciones, un derivado biológicamente activo tiene la secuencia de aminoácidos de un péptido antiapoptótico de la invención que se ha modificado química y/o biológicamente.

Algunos ejemplos de derivados son péptidos de acuerdo con la invención en los que:

- 30 - al menos un resto de aminoácido del péptido se ha sustituido o suprimido,
- al menos un resto de aminoácido adicional se ha insertado en el péptido, y/o
- al menos un resto de aminoácido del péptido se ha alterado o derivatizado químicamente.

- 35 Preferentemente, un derivado biológicamente activo de acuerdo con la invención comprende solamente uno o solamente dos modificaciones de restos de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en sustituciones, inserciones, supresiones, alteraciones o derivatizaciones. En ciertas realizaciones preferentes, un derivado biológicamente activo contiene una sustitución conservativa, o dos sustituciones conservativas. En ciertas realizaciones preferentes, un derivado de un fragmento de DAXX de acuerdo con la invención presenta una o dos modificaciones que influyen en los restos de aminoácidos que están fuera de la SEC ID N°: 5 (es decir, que no están comprendidos dentro de la SEC ID N°: 5). También se describe un derivado de un fragmento de FADD que presenta
40 una o dos modificaciones que influyen en los restos de aminoácidos que están fuera de la SEC ID N°: 12 (es decir, que no están comprendidos dentro de la SEC ID N°: 12).

- 45 Algunos aminoácidos "alterados o derivatizados químicamente" adecuados incluyen, por ejemplo, derivados de aminoácidos de origen natural, por ejemplo 4-hidroxiprolina para prolina, 5-hidroxilisina para lisina, homoserina para serina, ornitina para lisina, y similares. Otros aminoácidos "alterados o derivatizados químicamente" incluyen aminoácidos que se unen a, por ejemplo, una etiqueta, tal como colorante de fluoresceína, tetrametilrodamina o cianina Cy5.5; o restos de aminoácidos con una o más modificaciones después de la traducción tales como acetilación, amidación, formilación, hidroxilación, metilación, fosforilación, sulfatación, glicosilación o lipidación. De hecho, se ha mostrado que ciertas modificaciones químicas, en particular la glicosilación N-terminal, aumentan la
50 estabilidad de péptidos en suero humano (Powell *et al.*, Pharma Res 1993: 10: 1268-1273). Algunos aminoácidos "alterados o derivatizados químicamente" también incluyen los que presentan aumento de la permeabilidad de la membrana obtenida por N-miristoilación (Brand, *et al.*, Am J Physiol Cell Physiol 1996; 270: C1362-C1369).

- 55 Otros derivados de los péptidos de acuerdo con la invención son peptidomiméticos de dichos péptidos. Los peptidomiméticos se refieren a compuestos químicos sintéticos, que tienen básicamente las mismas características estructurales y funcionales de los péptidos de acuerdo con la invención. El mimético puede estar formado totalmente por análogos de aminoácidos no naturales, sintéticos, o puede ser una molécula química que incluye uno o más aminoácidos naturales y uno o más análogos de aminoácidos no naturales. El mimético también puede incorporar cualquier número de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales que no destruyen la actividad mimética.
60 Para determinar si un mimético tiene la actividad requerida se puede usar ensayo de rutina, usando el Ensayo A de acuerdo con la invención. La expresión "básicamente la misma", cuando se usa en referencia a un mimético o peptidomimético, se refiere a que el mimético o el peptidomimético tiene una o más actividades o funciones de la molécula mencionada, en particular inhibición de la apoptosis celular. Las técnicas para desarrollar peptidomiméticos son convencionales. Por ejemplo, algunos enlaces peptídicos se pueden sustituir por enlaces no peptídicos o
65 aminoácidos no naturales que permiten que el peptidomimético adopte una estructura similar, y por lo tanto actividad biológica, con respecto al péptido original. También se pueden realizar modificaciones adicionales sustituyendo

grupos químicos de los aminoácidos con otros grupos químicos de estructura similar. El desarrollo de peptidomiméticos se puede ver ayudado con la determinación de la estructura terciaria del fragmento/péptido original, ya sea libre o unido a la región intracelular del receptor Fas, mediante espectroscopía de RMN, cristalografía y/o formación de modelos moleculares ayudada por ordenador. Una vez que se identifica un compuesto peptidomimético potencial, éste se puede sintetizar y su capacidad para inhibir la apoptosis celular se puede someter a ensayo.

Algunos peptidomiméticos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que por lo general son de tres grupos estructurales: grupos de unión de restos distintos de los grupos de enlace amino natural ("enlace peptídico"); restos no naturales en lugar de restos de aminoácidos de origen natural; restos que inducen imitación de la estructura secundaria (por ejemplo, giro beta, giro gamma, lámina beta, conformación de hélice alfa); u otros cambios que confieren resistencia a la proteólisis. Por ejemplo, se pueden generar miméticos de lisina por reacción con ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. También se pueden generar lisina y otros miméticos de restos que contienen alfa-amino por reacción con imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y reacciones catalizadas con transamidasa con glioxilato.

Uno o más restos también se pueden sustituir con un aminoácido (o resto peptidomimético) de la quiralidad opuesta. Por lo tanto, cualquier aminoácido de origen natural en la configuración L (que también se puede denominar R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) se puede sustituir con el mismo aminoácido o un mimético, pero de la quiralidad opuesta, denominado D-aminoácido, pero que también se puede hacer referencia adicionalmente como a la forma R o S.

Tal como un experto en la materia observara, los peptidomiméticos de la presente invención también pueden incluir una más de las modificaciones que se describen en el presente documento para los aminoácidos "alterados o derivatizados químicamente", por ejemplo, una etiqueta, o una o más modificaciones después de la traducción.

Los péptidos, derivados y peptidomiméticos se pueden producir y aislar usando cualquier método conocido en la técnica. Algunos péptidos se pueden sintetizar, totalmente buen parte, usando métodos químicos habituales. Algunas técnicas para generar bibliotecas de péptidos y peptidomiméticos se conocen bien, e incluyen, por ejemplo, las técnicas de múltiples sujeciones, de bolsa de té, división-acoplamiento-mezcla y síntesis de SPOT.

Conjugados

La invención también se refiere a conjugados que comprenden un péptido de la invención o un derivado del mismo, unido a un Péptido de Penetración Celular o CPP.

De hecho, para facilitar la absorción de los péptidos de acuerdo con la invención, o derivados de los mismos, a través de membranas celulares, tales como la membrana plasmática de una célula, los inventores han mostrado que es muy útil conjugar esos péptidos derivados de los mismos con "péptidos de penetración celular" (CPP). Los CPP son péptidos bien conocidos que se pueden conjugar a cargas para facilitar el transporte través de las membranas. Los CPP se describen bien por ejemplo en Lebleu B. *et al.*, Advanced Drug Delivery Reviews 60 (2008) 517-529 y en Said Hassane F. *et al.*, Cell. Mol. Life Sci. (2010) 67: 715-726. Se puede usar cualquier CPP para mejorar la administración citoplasmática de fragmentos o derivados de los mismos de acuerdo con la invención.

Algunos ejemplos de los CPP que se pueden conjugar con los fragmentos de DAXX o FADD, o derivados de los mismos, que se describen en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a:

Nombre	Secuencia
Tat	GRKKRRQRRRPPQ
RXR	RXRRXRXRXR
Bpep	RXRRBRXRBRXB
Pip2b	RXRRXRRIHILFQNRMKWHK

en las que:

- X = aminohexilo, β -alanilo, p-aminobenzoilo, isonipecotilo, o 4-aminobutirilo
- B = beta Alanina
- letra minúscula = D-aminoácido (los D-aminoácidos se pueden sustituir por L-aminoácidos).

Un CPP por lo general tiene dos o más aminoácidos catiónicos con aminoácidos hidrófobos o grupos espaciadores que separan algunos de los aminoácidos catiónicos. Por ejemplo, el aminoácido catiónico es Arginina (R). Además, por lo general, un CPP tiene generalmente al menos 3 o 4 restos de Arginina. En algunas realizaciones el CPP contiene 5, 6 o más restos de Arginina.

El CPP por lo general se une al extremo N-terminal o C-terminal del péptido o derivado del mismo que se describe en el presente documento, preferentemente al extremo C-terminal. La unión química se puede realizar mediante cualquier enlace químico tal como por ejemplo un enlace disulfuro, tioéter o unión tiol-maleimida.

- 5 En una realización en particular, el péptido o derivado del mismo de acuerdo con la invención se une al CPP a través de un conector. La persona experta puede usar cualquier tipo de conector, con la condición de que dicho conector permita la unión química del péptido o derivado del mismo al CPP. Es posible una diversidad de conectores, que incluyen secuencias de aminoácidos que tienen un resto de Cisteína C-terminal que permite la formación de un enlace disulfuro, tioéter o tiol-maleimida. Otras maneras de unir el péptido o derivados del mismo de acuerdo con la invención al CPP incluyen el uso de un aldehído C-terminal para formar una oxima. Además, otros conectores usan la química de Click.

Algunos ejemplos de conectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos o secuencias de aminoácido elegidos entre el grupo que consiste en: C, BC, XC, GC, BBCC, BXCC, XBC, X, XX, B, BB, BX y XB,

- 15 en los que:
- X = aminohexilo, β -alanilo, p-aminobenzoilo, isonipecotilo, o 4-aminobutirilo
 - B = beta Alanina.

20 **Aplicaciones**

Los péptidos, derivados de los mismos, y conjugados de los mismos, como se describe en el presente documento, se proporcionan para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal. Más particularmente, la invención se refiere a péptidos, derivados de los mismos, y conjugados de los para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con apoptosis celular y/o para la inhibición de la apoptosis celular en el cuerpo humano o animal. La invención también proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la apoptosis celular y/o para la inhibición de la apoptosis celular sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo dichos métodos una etapa de administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la invención, un derivado del mismo y/o un conjugado del mismo. En ciertas realizaciones, al sujeto se le administra al menos un péptido DAXX antiapoptótico de acuerdo con la invención y al menos un péptido FADD antiapoptótico que se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad o afección asociada con apoptosis celular" se refiere a cualquier enfermedad o afección clínica que está causada por, da como resultado, o incluye apoptosis celular. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección está asociada con apoptosis celular mediada por el receptor Fas. La expresión " enfermedad o afección clínica asociada con apoptosis celular" también incluye cualquier procedimiento médico que causa, da como resultado o induce apoptosis celular y que se realiza debido a la presencia de una enfermedad o afección clínica en el sujeto.

40 Por lo tanto, los péptidos, derivados de los mismos, y conjugados de los mismos, y los métodos de tratamiento de acuerdo con la presente invención se pueden usar para tratar infarto de miocardio agudo (AMI), infarto cerebral, o alteraciones de la circulación agudas (estado de shock), en el cuerpo humano o animal, y en particular para inhibir o disminuir la apoptosis celular asociada con estas enfermedades. Los péptidos, derivados de los mismos, y conjugados de los mismos, y los métodos de tratamiento de acuerdo con la presente invención también se pueden usar para tratar a un sujeto que se sometiera trasplantes de órganos (por ejemplo, injertos de hígado, corazón, riñón, islotes, e intestino), intervenciones cardíacas (terapia de reperfusión, circulación extracorpórea, por ejemplo como revascularización cardiopulmonar, y oclusión de vasos temporal), y en particular para inhibir o disminuir la apoptosis celular causada por estos procedimientos médicos.

50 Los péptidos, derivados de los mismos, y conjugados de los mismos, y los métodos de tratamiento de acuerdo con la presente invención se pueden usar para el tratamiento de isquemia, tal como isquemia cardíaca, isquemia renal, colitis isquémica, isquemia mesentérica, isquemia cerebral, isquemia límbica o isquemia cutánea, en el cuerpo humano o animal, y en particular para inhibir o disminuir la apoptosis celular asociada con isquemia.

55 Los péptidos, derivados de los mismos, y conjugados de los mismos, y los métodos de tratamiento de acuerdo con la presente invención se pueden usar para tratar un sujeto que está recibiendo o ha recibido reperfusión, y en particular para inhibir o disminuir la apoptosis celular asociada con lesión por reperfusión.

60 Todos los péptidos, derivados de los mismos, y conjugados de los mismos que se describen en el presente documento se pueden administrar antes y durante la isquemia, antes de, de forma simultánea con o después de reperfusión.

También se ha mostrado que la apoptosis mediada por el receptor Fas está implicada en enfermedades hepáticas humanas que incluyen hepatitis vírica, enfermedad de Wilson, hepatitis alcohólica, enfermedad hepática colestática, y en enfermedad autoinmune (revisado, por ejemplo, en Ehrenschwender *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol., 2009, 647: 64-93). Por lo tanto, los péptidos, derivados de los mismos, y conjugados de los mismos, y los métodos de tratamiento

de acuerdo con la presente invención también se pueden usar para el tratamiento de estas enfermedades.

En los métodos de tratamiento de acuerdo con la invención, los péptidos, los derivados de los mismos o los conjugados de los mismos se pueden combinar con otros agentes terapéuticos, en particular agentes usados en el tratamiento de apoptosis, isquemia, y/o lesión por reperfusión. En particular, algunos tratamientos combinados con agentes que se dirigen a la ruta intrínseca de la apoptosis, es decir, la ruta mitocondrial, son de gran interés. Por lo tanto, en un aspecto relacionado, la presente invención proporciona los péptidos, los derivados de los mismos, o los conjugados de los mismos en combinación con otros agentes terapéuticos, en particular agentes usados en el tratamiento de apoptosis, isquemia, y/o lesión por reperfusión, para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la invención. En una realización, los métodos de tratamiento de acuerdo con la invención también comprenden una etapa de administración de ciclosporina A y/o el péptido BH4 a dicho cuerpo humano o animal. De hecho, se mostró que la ciclosporina A inhibía la apertura del PTP mitocondrial, y que disminuía el tamaño del infarto tanto en pacientes como en modelos animales de AMI (Gomez *et al.*, Cardiovasc Res. 2009 ; 83 (2): 226-33; Piot *et al.*, N Engl J Med. 2008; 359 (5): 473-81; Mewton *et al.*, J Am Coll Cardiol. 23 de marzo de 2010; 55 (12): 1200-5). Se ha informado que BH4 derivado de la proteína Bcl-xL antiapoptótica es eficaz para disminuir la apoptosis durante la isquemia-reperfusión cuando se administra como un conjugado de proteína Tat en el momento de la reperfusión (Ono *et al.*, Eur J Cardiothorac Surg. 2005, 27 (1): 117-121; Donnini *et al.*, Cell Cycle 2009; 8 (8): 1271-1278; Boisguerin *et al.*, J. Control Release, 2011, doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.037).

En los métodos de tratamiento de acuerdo con la invención, todos los compuestos (péptidos, derivados, conjugados, productos combinados) se pueden administrar usando cualquier otro número de vías adecuadas, que incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, parenteral, intraarterial, intramuscular, oral y nasal. La administración de un péptido de la invención, derivado del mismo o conjugado del mismo, se realizará en una dosificación de modo que la cantidad administrada sea eficaz para la finalidad pretendida. La vía de administración, formulación (véase a continuación) y dosificación administrada dependerá del efecto terapéutico deseado, la gravedad de la sección a tratar si ya está presente, la presencia de cualquier infección, la edad, sexo, peso, y condición de salud en general del paciente así como la potencia, bio disponibilidad, y vida media *in vivo* del péptido, derivado o conjugado usado, el uso (o no) de terapias simultáneas, y otros factores clínicos. Estos factores los puede determinar fácilmente el médico que prescribe en el transcurso de la terapia.

Un tratamiento de acuerdo con la presente invención puede consistir en una sola dosis o múltiples dosis. Por lo tanto, la administración de un péptido, derivado o conjugado del mismo, puede ser constante para un cierto período de tiempo, o periódico o a intervalos específicos, por ejemplo, cada hora, diariamente, semanalmente (o algún otro intervalo de varios días), etc. Como alternativa, la administración puede ser administración continua durante un periodo de tiempo, por ejemplo, administración intravenosa.

Composiciones farmacéuticas

Como se ha mencionado anteriormente, un péptido de la invención, un derivado del mismo o conjugado del mismo, se puede administrar *per se* o como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de al menos un péptido antiapoptótico de la invención (o un derivado del mismo o conjugado del mismo), y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición comprende adicionalmente al menos un agente biológicamente activo adicional. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende al menos péptido DAXX antiapoptótico de acuerdo con la invención y al menos un péptido FADD antiapoptótico que se describe en el presente documento.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede administrar en cualquier cantidad y usando cualquier vía de administración eficaz para conseguir el efecto profiláctico y/o terapéutico deseado. La formulación farmacéutica óptima se puede variar dependiendo de la vía de administración y la dosificación deseada. Tales formulaciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación *in vivo*, y tasa de eliminación *in vivo* del principio o principios activos administrados.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente separada de al menos un péptido de la invención (o al menos un derivado del mismo o conjugado del mismo) y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, se entenderá que la dosificación diaria total de las composiciones la decidirá el médico que prescribe dentro del alcance del criterio médico sólido.

Formulación. Se pueden formular preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas oleaginosas inyectables estériles de acuerdo con la técnica conocida usando agentes adecuados de dispersión o humectación, agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 2,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar se encuentran el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro sódico. Además, de forma convencional se usan aceites no

volátiles, fijos como un medio de solución o suspensión. Para este fin, se puede usar cualquier aceite no volátil insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. En la preparación de formulaciones inyectables también se pueden usar ácidos grasos tales como ácido oleico. Algunos vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones en forma líquida estériles para administración parenteral.

5 Algunas formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o mediante la incorporación de agentes de esterilización en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril otro medio inyectable estéril antes de su uso. Algunas composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles se pueden administrar, por
10 ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. La inyección se puede realizar mediante un solo impulso o mediante infusión gradual. Cuando sea necesario o se desee, la composición puede incluir un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

15 Con el fin de prolongar el efecto de un principio activo, a menudo es deseable ralentizar la absorción del ingrediente a partir de inyección subcutánea o intramuscular. El retardo de la absorción de un principio activo administrado por vía parenteral se puede conseguir mediante disolución o suspensión del ingrediente en un vehículo de aceite. Las formas de liberación prolongada inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del principio activo en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de ingrediente activo con respecto a polímero y la naturaleza del polímero usado en particular, se puede controlar la tasa de liberación de
20 ingrediente. Algunos ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se pueden preparar formulaciones inyectables de liberación prolongada atrapando el principio activo en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

25 Las formas de dosificación líquida para administración oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires, y composiciones presurizadas farmacéuticamente aceptables. Además del principio o principios activos, la forma de dosificación líquida puede contener diluyentes inertes usadas normalmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otro disolvente, agentes solubilizantes y emulgentes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilen glicol, dimetilformamida, aceites (en particular aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino, y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles,
30 ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes de suspensión, conservantes, edulcorantes, saborizantes, y agentes perfumantes, agentes espesantes, colores, reguladores de la viscosidad, estabilizantes o reguladores osmóticos. Algunos ejemplos de vehículos líquidos adecuados para administración oral incluyen agua (que potencialmente contienen aditivos como se ha mencionado anteriormente, por ejemplo, derivados de celulosa, tales como solución de carboximetil celulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos tales como glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuete). Para composiciones presurizadas, el vehículo líquido puede ser hidrocarburo halogenado u otro agente propelente farmacéuticamente aceptable.

40 Algunas formas de dosificación sólida para administración oral incluyen, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, un péptido de la invención (o derivado del mismo o conjugado el mismo) se puede mezclar con al menos un excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable, inerte tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y uno o más de: (a) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico; (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y goma arábiga; (c) humectantes tales como glicerol; (d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos, y carbonato sódico; (e) agentes que retrasan la disolución tales como parafina; aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita; y (i) lubricantes tales como talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, y mezclas de los mismos. Otros excipientes adecuados para formulaciones sólidas incluyen agentes modificadores de la superficie tales como agentes modificador es de la superficie no iónicos y aniónicos. Algunos ejemplos representativos de agentes modificadores de la superficie incluyen, pero no se limitan a, Poloxamer 188, cloruro de benzalconio, estearato cálcico, alcohol cetosteárfico, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres de sorbitán, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato sódico, silicato de magnesio y aluminio, y trietanolamina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes de tamponamiento.

60 También se pueden usar composiciones sólidas de un tipo similar tales como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos se pueden preparar con revestimientos y cubiertas tales como revestimientos entéricos, revestimientos para control de la liberación y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Éstos pueden contener opcionalmente agentes de opacidad y también pueden tener una composición de modo que
65 solamente liberan el principio o principios activos, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera con retraso. Algunos ejemplos de composiciones de embebido que se pueden usar

incluyen sustancias poliméricas y ceras.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable administrar un péptido antiapoptótico de la invención (o derivado del mismo o conjugado del mismo) por vía local en una zona con necesidad de tratamiento (por ejemplo, el miocardio). Esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante angioplastia coronaria percutánea o durante revascularización quirúrgica de arteria coronaria.

Para administración tópica, la composición farmacéutica se formula preferentemente como un gel, una pomada, una loción, o una prima que puede incluir vehículos tales como agua, glicerol, alcohol, propilenglicol, alcoholes grasos, triglicéridos, ésteres de ácido graso, o aceite mineral. Otros vehículos tópicos incluyen asesina líquida, palmitato de isopropilo, polietilenglicol, etanol (95 %), monolaurato de polioxietileno (5 %) en agua, o lauril sulfato sódico (5 %) en agua. Si fuera necesario, se pueden añadir otros materiales tales como antioxidantes, humectantes, estabilizantes de la viscosidad, y agentes similares.

Además, en ciertos casos, se espera que las composiciones de la invención se puedan administrar dentro de dispositivos transdérmicos colocados sobre, en, o bajo la piel. Tales dispositivos incluyen parches, implantes, e inyecciones que liberan el principio activo ya sea mediante mecanismos de liberación pasivos o activos. Algunas administraciones transdérmicas incluyen todas las administraciones a través de la superficie del organismo y de los revestimientos internos del paso corporal que incluyen tejidos epiteliales y mucosales. Tales administraciones se pueden realizar usando las presentes composiciones en lociones, cremas, espumas, parches, suspensiones, soluciones, y supositorios.

En la técnica se conocen materiales y métodos para producir diversas formulaciones y se pueden adaptar para poner en práctica la invención objeto. Algunas formulaciones adecuadas para la administración de anticuerpos se pueden encontrar, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, 18ª Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PA.

Agentes Biológicamente Activos Adicionales. En ciertas realizaciones, un péptido de la invención es el único principio activo en una composición farmacéutica de la presente invención. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende adicionalmente uno o más agentes biológicamente activos. Algunos ejemplos de agentes biológicamente activos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes antiapoptóticos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antibióticos, antioxidantes, agentes antisépticos, y combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, el agente biológicamente activo adicional se selecciona entre el grupo que consiste en ciclosporina A, BH4, y combinaciones de los mismos.

En tales composiciones farmacéuticas, el péptido antiapoptótico de la invención (o derivado del mismo o conjugado del mismo) y algunos agentes terapéuticos adicionales se pueden combinar en una o más preparaciones para administración simultánea, separada o secuencial de los diferentes componentes. De forma más específica, una composición de la invención se puede formular de manera tal que el péptido (o derivado del mismo o conjugado del mismo) y el agente o agentes terapéuticos se pueden administrar en conjunto o independientemente entre sí. Por ejemplo, un péptido (o derivado del mismo o conjugado del mismo) y un agente terapéutico se pueden formular en conjunto en una sola composición. Como alternativa, se pueden mantener (por ejemplo, en composiciones y/o envases diferentes) y se pueden administrar de forma separada.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferentes para preparar y poner en práctica la presente invención. Sin embargo, se debería entender que los ejemplos son solamente para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Síntesis de matrices peptídicas invertidas unidas a membrana

Los péptidos se sintetizaron en membranas de CAPE modificadas con N (Bhargava *et al.*, Mol. Recognit, 2002, 15: 145) y se prepararon con un robot MultiPep SPOT (INTAVIS Bioanalytical Instruments AG, Colonia, Alemania). El diseño de la matriz se realizó en las instalaciones con la ayuda del software LISA 1.71. La síntesis comenzó con la definición de la aplicación puntual usando un protocolo convencional [Frank, Tetrahedron, 1992, 48: 9217], seguido del acoplamiento de una solución de Fmoc-cisteína-(Trt)-Opfp (0.3M) en N-metilpirrolidona (NMP) y Fmoc-alanina-Opfp (doble acoplamiento, cada reacción de 15 min). Después de escisión de Fmoc con piperidina en DMF (20 %), se añadió ácido 4-hidroximetilfenoxiacético (HMPA) disuelto en dimetilformamida (DMF, solución 0,6 M) y se activó con EEDQ (1,1 equiv.), y las muestras se aplicaron puntualmente de forma directa sobre la membrana (4x de acoplamiento, cada reacción de 15 min). La membrana se acetiló con anhídrido acético en DMF (2 %), se lavó con DMF (5 x 3 min), etanol (2 x 3 min), y éter dietílico (2 x 3 min), y por último se secó al aire. Las soluciones de Fmoc-aminoácido-OH (0,4 M) activadas con 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI, 3 equiv.) en DMF se aplicaron puntualmente sobre la membrana (4x de acoplamiento, cada reacción de 15 min). Prolina, tirosina, y glutamina se activaron con

1,1'-carbonyldi(1,2,4-triazol) (CDT). El grupo Fmoc se retiró de las aplicaciones puntuales, y las secuencias peptídicas se completaron usando el protocolo de síntesis de SPOT convencional (Frank, Tetrahedron, 1992, 48: 9217) seguido de una etiqueta N-terminal con β -alanina.

5 Para la síntesis de SPOT convencional se usó Fmoc-aa-Opfp con la siguiente protección de la cadena lateral: E-, D-(OtBu); C-, S-, T-, Y-(tBu); K-, W-(Boc); N-, Q-, H-(Trt); R-(Pbf). Para el ciclado de tioéter todos los péptidos se N-acilaron con éster de 2,4-dinitrofenilo del ácido bromoacético en DMF (1M), doble acoplamiento, tiempo de reacción de 15 min cada una.

10 La membrana se lavó con DMF (3 x 3 min) y diclorometano (DCM, 3 x 3 min) y se secó. Para permitir el ciclado, el grupo protector de cadena lateral de tritilo de la cisteína se escindió con ácido trifluoroacético (TFA, 7 %), H₂O (2 %) en DCM (1 x 5 min) seguido de TFA (7 %), TIBS (3 %), H₂O (2 %) en DCM. La membrana se lavó con DCM (3 x 3 min), DMF (2 x 3 min), y DMF (2 x 3 min). Los péptidos se ciclaron durante una noche por tratamiento con Cs₂CO₃ acuoso al 25 %/DMF (1:1). La membrana se lavó con DMF (2 x 3 min), H₂O (2 x 3 min), etanol (2 x 3 min), y éter dietílico (2 x 3 min) y se secó al aire.

La hidrólisis y la desprotección de la cadena lateral se consiguieron a través de un tratamiento con TFA (60 %), TIBS (3 %), y H₂O (2 %) en DCM durante 2,5 horas sin agitación, seguido de etapas de lavado (DCM 3 x 3 min, DMF 3 x 3 min, etanol 3 x 3 min, éter dietílico 2 x 3 min), seguido de TFA (90 %), TIBS (3 %), y H₂O (2 %) en DCM durante 30 minutos sin agitación. La membrana se lavó con DCM (3 x 3 min), DMF (3 x 3 min), etanol (2 x 3 min), tampón de fosfato (pH 7,4, 0,1 M, 2 x 3 min), H₂O (2 x 3 min), etanol (2 x 3 min), y éter dietílico (2 x 3 min) y se secó al aire.

Diseño y administración de fragmentos de acuerdo con la invención

25 La secuencia primaria de la proteína DAXX (SEC ID N°: 1) se analizó minuciosamente haciendo coincidir péptidos 15 mer (desplazamiento de 3 aminoácidos) y todos los péptidos (243 péptidos) se sintetizaron sobre membranas de celulosa mediante síntesis de SPOT como se ha descrito anteriormente. La biblioteca de péptidos se incubó con la región intracelular etiquetada con His del receptor Fas (Sigma). La interacción entre Fas y los péptidos se determinó usando un sándwich de anti-His(ratón)/anti-ratón-HRP y las señales se revelaron usando un Lumilmager (Roche) como se muestra en la Figura 1A. Se encontró que la aplicación puntual N° 211 (SEC ID N°: 2) presentaba la intensidad de la señal más elevada y se encontró que las aplicaciones puntuales N°s 209, 210 y 212 (SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 7, respectivamente) incluían la secuencia de epítomos mínima (KSRKEKKQT).

35 Sin embargo, el análisis de longitud de secuencias de las secuencias de 15 mer KSRKEKKQTGSGPLG (aplicación puntual 211, SEC ID N°: 2) y SGPPCKKSRKEKKQT (aplicación puntual 209, SEC ID N°: 3) reveló que no es posible acortar las secuencias de forma arbitraria hasta el epítipo mínimo encontrado en la Figura 1. Usando la síntesis de SPOT como se ha mencionado anteriormente, la influencia de la longitud del péptido se analizó acortando las secuencias dadas en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal y en ambas direcciones (Figura 2A). Las secuencias de péptidos que se presentaban las intensidades de la señal más elevadas se muestran en la Figura 2B.

40 Se realizó una combinación mezclada de la intensidad de la señal más elevada del DAXXp-211 y del DAXXp-209 que corresponde a un péptido 16 mer (KKSRKEKKQTGSGPLG), denominado el péptido DAXX o DAXXp (SEC ID N°: 5). Se encontró que DAXXp tiene una actividad antiapoptótica *in vitro* e *in vivo* importante.

45 Es posible alargar el péptido en el extremo C-terminal manteniéndose con el hecho de que la proteína negativa dominante (DAXX-DN) [Roubille *et al.*, Circulation, 2007; 116: 2709-2717] incluye una región que se extiende desde el péptido DAXXp-211 hasta el extremo C-terminal de la proteína DAXX (Figura 1B).

Aplicaciones en AMI

50 Se han sometido al ensayo péptidos de DAXXp, conjugados o no con los CPP, para su actividad antiapoptótica en cardiomiocitos primarios y para su capacidad para reducir el tamaño del infarto en un modelo I/R quirúrgico de razón después de administración sistémica.

55 Evaluación *in vitro*

En una primera etapa, la absorción celular de los péptidos enumerados en la Tabla 1 se midió en cultivo celular primario de cardiomiocitos de ratón usando medidas de citometría de flujo (FACS - con péptidos etiquetados con CF) y se verificó la ausencia de cualquier citotoxicidad.

60 **Tabla 1: CPP, y conjugados de CPP-DAXXp usados en este estudio**

Nombre	Secuencia	AA
Tat	GRKKRRQRRRPPQ-NH ₂	13

Nombre	Secuencia	AA
(RXR)4	(RXR)4-NH2	12
Bpep	RXRRBRRXRRBRXB-NH2	14
Pip2b	(RXR)3-IHILFQNrRMKWHK-NH2	23
Tat-DAXXp	GRKKRRQRRRPPQ-KKSRKEKKQTGSGPLG-NH2 (= SEC ID N°: 58)	29
Tat-ncDAXXp	GRKKRRQRRRPPQ-AKLYVYINELCTVLK-NH2 (ncDAXXp = SEC ID N°:13)	29
Tat-scrDAXXp	GRKKRRQRRRPPQ-KKGRKQSGESLGTPKK-NH2	29
(RXR)4-DAXXp	(RXR)4-KKSRKEKKQTGSGPLG-NH2	28
Bpep-DAXXp	RXRRBRRXRRBRXB-KKSRKEKKQTGSGPLG-NH2	30
Pip2b-DAXXp	(RXR)3-IHILFQNrRMKWHK-KKSRKEKKQTGSGPLG-NH2	39
DAXXp	KKSRKEKKQTGSGPLG-NH2 (SEC ID N°: 5)	16
Tat-DAXXp13	GRKKRRQRRRPPQ-RKEKKQTGSGPLG-NH2 (DAXXp13 = SEC ID N°: 14)	26
mDAXXp	KRFRKEKKQLGSGLLG-NH2 (SEC ID N°: 15)	16
scrDAXXp	KKGRKQSGESLGTPKK -NH2 (SEC ID N°: 16)	16
Tat-mDAXXp	GRKKRRQRRRPPQ-KRFRKEKKQLGSGLLG-NH2 (SEC ID N°: 61)	29
Pip2b-mDAXXp	(RXR)3-IHILFQNrRMKWHK-KRFRKEKKQLGSGLLG-NH2	39

X = ácido amino-hexanoico; B = β-alanina, r = D-arginina; Para medidas de FACS, los péptidos se etiquetaron de forma N-terminal con (5,6)-carboxifluoresceína (CF); todos los péptidos están amidados de forma C-terminal.
scr = versión codificada de DAXXp; mDAXXp es el homólogo de ratón de DAXXp humano

Otros derivados de CPP-DAXXp que se han estudiado se presentan en la Tabla 2 que sigue a continuación.

Tabla 2: Derivados de CPP-DAXXp adicionales estudiados.

Tat-DAXXp	GRKKRRQRRRPPQ- KKSREKKQTGSGPLG-NH2 (SEC ID N°: 58)
Tat-DAXXp-209	GRKKRRQRRRPPQ-SGPPCKKSREKKQT-NH2
Tat-DAXXp-210	GRKKRRQRRRPPQ- PCKKSREKKQTGSG-NH2
Tat-DAXXp-211	GRKKRRQRRRPPQ- KSRKEKKQTGSGPLG-NH2
Tat-DAXXp-212	GRKKRRQRRRPPQ- KEKKQTGSGPLGNSY-NH2
Tat-DAXXp	GRKKRRQRRRPPQ-KKSRKEKKQTGSGPLG-NH2
Tat-DAXXp-15	GRKKRRQRRRPPQ-KSRKEKKQTGSGPLG-NH2 = Tat-DAXXp-211
Tat-DAXXp-14	GRKKRRQRRRPPQ- SRKEKKQTGSGPLG-NH2
Tat-DAXXp-13	GRKKRRQRRRPPQ- RKEKKQTGSGPLG-NH2
Tat- DAXXp-9	GRKKRRQRRRPPQ- KSRKEKKQT-NH2

- 5 Además, la interacción potencial de los fragmentos con la región intracelular del receptor Fas se validó de forma cruzada midiendo las afinidades de unión (Kd) usando la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) (*Biacore Life Science*, Suecia). Las afinidades de unión del fragmento solo y en conjugación con los CPP se resumen en la Tabla 3.

10 **Tabla 3: Medida de las afinidades de unión (Kd, en μM) de los constructos usados.**

Nombre	Secuencia	Kd ± DT [μM]
DAXXp	KKSRKEKKQTGSGPLG-NH2	333 ± 62

Nombre	Secuencia	Kd $\pm$ DT [μ M]
mDAXXp	KRFRKEKKQLGSGLLG-NH2	252 $\pm$ 64
scrDAXXp	KKGRKQSGESLGTPKK-NH2	$\geq$ 6000
Tat-DAXXp	GRKKRRQRRRPPQ-KKSRKEKKQTGSGPLG-NH2	13 $\pm$ 9
Tat-scrDAXXp	GRKKRRQRRRPPQ-KKGRKQSGESLGTPKK-NH2	n. m.
Tat-DAXXp13	GRKKRRQRRRPPQ-RKEKKQTGSGPLG-NH2	n. m.
Pip2b-DAXXp	(RXR)3-IHILFQN+RMKWHK-KKSRKEKKQTGSGPLG-NH2	0,7 $\pm$ 0,2
Todos los experimentos se realizan en un instrumento Biacore. Para cada condición, se representa el valor medio de tres experimentos independientes y la desviación estándar correspondiente.		

A partir de ese momento, se evaluó la capacidad de estos péptidos para inhibir la apoptosis inducida por estaurosporina. La apoptosis se determinó usando el kit ELISA^{PLUS} para detección de muerte celular (Roche) midiendo la fragmentación del ADN.

En la mayoría de las publicaciones, algunos péptidos antiapoptóticos disponibles en la técnica en la actualidad se administran 3-4 horas antes de la acción de la apoptosis, que es poco relevante para una aplicación clínica. Por esa razón, el protocolo usado en el presente estudio incluía la administración de los péptidos junto con la estaurosporina. La Figura 5B muestra claramente una reducción de la fragmentación del ADN en cardiomiocitos primarios de un 44 % usando Tat-DAXXp y de un 55 % usando Pip2b-DAXXp, respectivamente. Esto no se observó con CPP solo ni con los controles negativos de Tat-scrDAXXp o Tat-ncDAXXp. El factor de enriquecimiento se calculó como sugieren los proveedores (fragmentación del ADN de células tratadas/fragmentación del ADN de células sin tratar). Para comparar mejor los resultados, la fragmentación del ADN (escrita por el factor de enriquecimiento) se relaciona con las células tratadas con estaurosporina (= 100 %).

Los efectos antiapoptóticos de los péptidos también se analizaron en NG118-15 murino (modelo para células neuronales) (Figura 5D), en C2C12 murino (modelo para células musculares) (Figura 5A) y en H9c2 de rata (modelo de para células cardíacas) (Figura 5C). La reducción más elevada en la fragmentación del ADN se observó usando Bpep-DAXXp en NG118-15 (reducción de un 66 %) usando Tat-DAXXp en C2C12 (reducción de un 24 %) y Pip2b-DAXXp en H9c2 (reducción de un 31 %). Esto revela claramente la importancia de la elección del CPP óptimo para la aplicación o contexto biológico apropiados.

Además, el epítipo de unión de la proteína FADD (SEC ID N°: 8) se determinó como se ha descrito anteriormente para el epítipo de DAXX (los detalles se han visto anteriormente). Como se muestra en la Figura 8A, la aplicación puntual n° 11, que corresponde al péptido FADDp15 (VGKRLERVQSGLDL; SEC ID N°: 9), tiene la intensidad de la señal más elevada y las aplicaciones puntuales n° 10 y 12 (SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 11) comparten una secuencia de epítipo mínima con FADDp15.

Tabla 4: Secuencias derivadas de proteína FADD conjugada con Tat CPP.

Tat-FADDp	GRKKRRQRRRPPQ-KRKLERVQS-NH2 (= SEC ID N°: 59)
Tat-FADDp15	GRKKRRQRRRPPQ-VGKRLERVQSGLDL-NH2 (= SEC ID N°: 60)

Usando una biblioteca de péptidos que analiza minuciosamente la longitud, se determinó el fragmento mínimo de FADDp15, que corresponde a FADDp (SEC ID N°: 12; KRKLERVQS) (véase la Figura 8B). En los cardiomiocitos, la disminución de la apoptosis era de un 35 % usando los conjugados de Tat-FADDp y de un 57 % usando Tat-FADDp-15 (Figura 9).

Evaluación in vivo

En una segunda etapa, los efectos cardioprotectores de DAXXp se evaluaron en un modelo *in vivo* de isquemia-reperusión del miocardio. Se realizaron isquemia de miocardio aguda y reperusión en ratones C57B16 sometidos a un modelo quirúrgico de oclusión coronaria reversible. Los ratones macho (22-28 g) se anestesiaron y se ventilaron a través de intubación traqueal usando un respirador para roedor Harvard. La temperatura corporal se mantuvo entre

36,8 °C y 37,0 °C a través de una tabla quirúrgica termorregulada. El hecho se abrió mediante toracotomía lateral izquierda y un oclisor como trampa reversible de la arteria coronaria se puso alrededor de la arteria coronaria izquierda. Los ratones se distribuyeron al azar a dos protocolos quirúrgicos diferentes de isquemia-reperfusión del miocardio (Figura 11). Al final de la perfusión, la arteria se volvió a ocluir y se inyectó colorante azul de ftalocianina en la cavidad del ventrículo izquierdo y se permitió que perfundiera las porciones no isquémicas del miocardio. Para determinar el efecto de DAXXp en el tamaño del infarto del miocardio, se administraron péptidos por vía intravenosa (vena caudal) 5 minutos antes de la perfusión durante el protocolo quirúrgico de isquemia-reperfusión. Los grupos de control se trataron con péptido Tat o Pip2b (para CPP solo). Se eligió la dosis de 1 mg/kg (intervalo μ molar) y también se sometieron a ensayo las respuestas para las dosis de 0,1 mg/kg y 10 mg/kg.

Al final de la perfusión, los ratones se volvieron a anestesiarse, la ligadura coronaria se apretó definitivamente, el colorante azul se inyectó y los ventrículos izquierdo recogidos se dedicaron al tamaño del infarto (método de TTC, Schwartz *et al.*, J Thromb. Thromb., 2000; 10: 181-187) o medidas de fragmentación del ADN (kit ELISA^{PLUS} para detección de muerte celular, Roche Diagnostics) para investigar los efectos cardioprotectores frente a lesiones por isquemia-reperfusión. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 12 a 15.

Cuando Tat-DAXXp (1 mg/kg) se inyectó por vía intravenosa *in vivo*, el tamaño del infarto medido después de perfusión de 1 hora disminuyó en un 53,4 % con respecto al péptido Tat solo ($p < 0,01$) (la zona de riesgo era comparable entre grupos; $p = ns$ - Figura 12A). Esta cardioprotección se correlacionaba con una disminución drástica de la fragmentación específica del ADN, una evidencia de apoptosis, en ventrículos izquierdos de ratones infectados con Tat-DAXXp con respecto a ratones inyectados con Tat (véase en la Figura 12B). Esta cardioprotección no se observó con Pip2b-DAXXp o CPP solo ni con los controles negativos Tat-scrDAXXp (los datos no se muestran)

La Figura 13 muestra la respuesta a la dosis para Tat-DAXXp cuando se inyecta a 0,1, 1 y 10 mg/kg e indica que el efecto máximo se obtuvo para una dosis de 1 mg/kg. El DAXXp (10 mg/kg) inyectado solo (sin CPP) era capaz de proteger el miocardio mediante la disminución tanto del tamaño del infarto como de la fragmentación del ADN en la misma medida que Tat-DAXXp.

Los efectos cardioprotectores de Tat-DAXXp se mantuvieron cuando la duración de la perfusión se prolongaba desde 1 hora a 24 horas (véanse las Figuras 14 y 15).

La formación de imágenes confocal reveló que CF-Tat-DAXXp (1 mg/kg) estaba localizado tanto en el citosol como en el núcleo de cardiomiocitos en el ventrículo izquierdo (Figura 16).

Los resultados preliminares obtenidos en una evaluación *in vitro* realizada en un modelo de trasplante renal (Rat) mostró que Tat-DAXXp (1 mg/kg) era capaz de proteger de lesiones por isquemia-reperfusión en otras aplicaciones clínicas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CNRS BARRERE, Stéphanie

<120> Inhibidores de apoptosis y usos de los mismos

<130> BCT110406QT

<150> PCT/IB2010/003158

<151> 18-11-2010

<160> 61

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 740

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 553 770 T3

Met	Ala	Thr	Ala	Asn	Ser	Ile	Ile	Val	Leu	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	1	5	10	15
Glu	Ala	Ala	Ala	Gln	Pro	Gly	Pro	Ser	His	Pro	Leu	Pro	Asn	Ala	Ala	20	25	30	
Ser	Pro	Gly	Ala	Glu	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	His	Gly	Ala	Arg	35	40	45	
Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Lys	Lys	Cys	Tyr	Lys	Leu	Glu	Asn	Glu	50	55	60	
Lys	Leu	Phe	Glu	Glu	Phe	Leu	Glu	Leu	Cys	Lys	Met	Gln	Thr	Ala	Asp	65	70	75	80
His	Pro	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Tyr	Asn	Arg	Gln	Gln	Arg	Ala	His	85	90	95	
Ser	Leu	Phe	Leu	Ala	Ser	Ala	Glu	Phe	Cys	Asn	Ile	Leu	Ser	Arg	Val	100	105	110	
Leu	Ser	Arg	Ala	Arg	Ser	Arg	Pro	Ala	Lys	Leu	Tyr	Val	Tyr	Ile	Asn	115	120	125	
Glu	Leu	Cys	Thr	Val	Leu	Lys	Ala	His	Ser	Ala	Lys	Lys	Lys	Leu	Asn	130	135	140	
Leu	Ala	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Asn	Glu	Pro	Ser	Gly	Asn	Asn	Pro	145	150	155	160

Pro Thr His Leu Ser Leu Asp Pro Thr Asn Ala Glu Asn Thr Ala Ser
 165 170 175

Gln Ser Pro Arg Thr Arg Gly Ser Arg Arg Gln Ile Gln Arg Leu Glu
 180 185 190

Gln Leu Leu Ala Leu Tyr Val Ala Glu Ile Arg Arg Leu Gln Glu Lys
 195 200 205

Glu Leu Asp Leu Ser Glu Leu Asp Asp Pro Asp Ser Ala Tyr Leu Gln
 210 215 220

Glu Ala Arg Leu Lys Arg Lys Leu Ile Arg Leu Phe Gly Arg Leu Cys
 225 230 235 240

Glu Leu Lys Asp Cys Ser Ser Leu Thr Gly Arg Val Ile Glu Gln Arg
 245 250 255

Ile Pro Tyr Arg Gly Thr Arg Tyr Pro Glu Val Asn Arg Arg Ile Glu
 260 265 270

Arg Leu Ile Asn Lys Pro Gly Pro Asp Thr Phe Pro Asp Tyr Gly Asp
 275 280 285

Val Leu Arg Ala Val Glu Lys Ala Ala Ala Arg His Ser Leu Gly Leu
 290 295 300

Pro Arg Gln Gln Leu Gln Leu Met Ala Gln Asp Ala Phe Arg Asp Val
 305 310 315 320

Gly Ile Arg Leu Gln Glu Arg Arg His Leu Asp Leu Ile Tyr Asn Phe
 325 330 335

Gly Cys His Leu Thr Asp Asp Tyr Arg Pro Gly Val Asp Pro Ala Leu
 340 345 350

Ser Asp Pro Val Leu Ala Arg Arg Leu Arg Glu Asn Arg Ser Leu Ala
 355 360 365

Met Ser Arg Leu Asp Glu Val Ile Ser Lys Tyr Ala Met Leu Gln Asp
 370 375 380

Lys Ser Glu Glu Gly Glu Arg Lys Lys Arg Arg Ala Arg Leu Gln Gly
 385 390 395 400

Thr Ser Ser His Ser Ala Asp Thr Pro Glu Ala Ser Leu Asp Ser Gly
 405 410 415

Glu Gly Pro Ser Gly Met Ala Ser Gln Gly Cys Pro Ser Ala Ser Arg
 420 425 430

Ala Glu Thr Asp Asp Glu Asp Asp Glu Glu Ser Asp Glu Glu Glu Glu
 435 440 445

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Thr Asp Ser Glu Glu Glu
 450 455 460

Glu Asp Leu Glu Gln Met Gln Glu Gly Gln Glu Asp Asp Glu Glu Glu
 465 470 475 480

Asp Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Gly Lys Asp Gly Asp Lys Ser Pro
 485 490 495

Met Ser Ser Leu Gln Ile Ser Asn Glu Lys Asn Leu Glu Pro Gly Lys
 500 505 510

Gln Ile Ser Arg Ser Ser Gly Glu Gln Gln Asn Lys Gly Arg Ile Val
 515 520 525

Ser Pro Ser Leu Leu Ser Glu Glu Pro Leu Ala Pro Ser Ser Ile Asp
 530 535 540

Ala Glu Ser Asn Gly Glu Gln Pro Glu Glu Leu Thr Leu Glu Glu Glu
 545 550 555 560

Ser Pro Val Ser Gln Leu Phe Glu Leu Glu Ile Glu Ala Leu Pro Leu
 565 570 575

Asp Thr Pro Ser Ser Val Glu Thr Asp Ile Ser Ser Ser Arg Lys Gln
 580 585 590

Ser Glu Glu Pro Phe Thr Thr Val Leu Glu Asn Gly Ala Gly Met Val
 595 600 605

Ser Ser Thr Ser Phe Asn Gly Gly Val Ser Pro His Asn Trp Gly Asp
 610 615 620

Ser Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly
 625 630 635 640

Ser Gly Pro Leu Gly Asn Ser Tyr Val Glu Arg Gln Arg Ser Val His
 645 650 655

Glu Lys Asn Gly Lys Lys Ile Cys Thr Leu Pro Ser Pro Pro Ser Pro
 660 665 670

Leu Ala Ser Leu Ala Pro Val Ala Asp Ser Ser Thr Arg Val Asp Ser
675 680 685

Pro Ser His Gly Leu Val Thr Ser Ser Leu Cys Ile Pro Ser Pro Ala
690 695 700

Arg Leu Ser Gln Thr Pro His Ser Gln Pro Pro Arg Pro Gly Thr Cys
705 710 715 720

Lys Thr Ser Val Ala Thr Gln Cys Asp Pro Glu Glu Ile Ile Val Leu
725 730 735

Ser Asp Ser Asp
740

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 2

Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 3

Ser Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr
1 5 10 15

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 4

Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly
1 5 10 15

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 5

Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly

1 5 10 15

5 <210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly
1 5 10

10

15 <210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly Asn Ser Tyr
1 5 10 15

20

25 <210> 8
<211> 208
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

Met Asp Pro Phe Leu Val Leu Leu His Ser Val Ser Ser Ser Leu Ser
1          5          10          15

Ser Ser Glu Leu Thr Glu Leu Lys Phe Leu Cys Leu Gly Arg Val Gly
          20          25          30

Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp Leu Phe Ser Met
          35          40          45

Leu Leu Glu Gln Asn Asp Leu Glu Pro Gly His Thr Glu Leu Leu Arg
50          55          60

Glu Leu Leu Ala Ser Leu Arg Arg His Asp Leu Leu Arg Arg Val Asp
65          70          75          80

Asp Phe Glu Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Pro Gly Glu Glu Asp
          85          90          95

Leu Cys Ala Ala Phe Asn Val Ile Cys Asp Asn Val Gly Lys Asp Trp
          100          105          110

Arg Arg Leu Ala Arg Gln Leu Lys Val Ser Asp Thr Lys Ile Asp Ser
          115          120          125

Ile Glu Asp Arg Tyr Pro Arg Asn Leu Thr Glu Arg Val Arg Glu Ser
130          135          140

Leu Arg Ile Trp Lys Asn Thr Glu Lys Glu Asn Ala Thr Val Ala His
145          150          155          160

Leu Val Gly Ala Leu Arg Ser Cys Gln Met Asn Leu Val Ala Asp Leu
          165          170          175

Val Gln Glu Val Gln Gln Ala Arg Asp Leu Gln Asn Arg Ser Gly Ala
          180          185          190

Met Ser Pro Met Ser Trp Asn Ser Asp Ala Ser Thr Ser Glu Ala Ser
          195          200          205

```

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

400> 9

```

Val Gly Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp Leu
1          5          10          15

```

ES 2 553 770 T3

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 10

 Leu Gly Arg Val Gly Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly
 1 5 10 15

 10 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 11

 Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp Leu Phe Ser Met
 1 5 10 15

 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

 Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser
 1 5

 25 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

 Ala Lys Leu Tyr Val Tyr Ile Asn Glu Leu Cys Thr Val Leu Lys
 1 5 10 15

 35 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 14

 Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly
 1 5 10

 45 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50 <400> 15

 Lys Arg Phe Arg Lys Glu Lys Lys Gln Leu Gly Ser Gly Leu Leu Gly
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia desordenada
 <400> 16
 10
 Lys Lys Gly Arg Lys Gln Ser Gly Glu Ser Leu Gly Thr Pro Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 17
 15
 Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly
 1 5 10 15
 20
 Asn
 <210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 18
 Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly
 1 5 10 15
 30
 Asn Ser
 <210> 19
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 19
 Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly
 1 5 10 15
 40
 Asn Ser Tyr
 <210> 20
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 20

Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly
1 5 10 15

Asn Ser Tyr Val
20

5 <210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu
1 5 10 15

10 Gly

15 <210> 22
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro
1 5 10 15

20 Leu Gly

25 <210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly
1 5 10 15

30 Pro Leu Gly

35 <210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser
1 5 10 15

Gly Pro Leu Gly
20

<210> 25
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 25

 Ser Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly
 1 5 10 15

 Ser Gly Pro Leu Gly
 20
 10
 <210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 26

 Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu
 1 5 10 15

 Gly Asn

 20
 <210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 27

 Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu
 1 5 10 15

 Gly Asn Ser

 30
 <210> 28
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28

 Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu
 1 5 10 15

 Gly Asn Ser Tyr
 20
 35
 <210> 29
 <211> 21
 <212> PRT
 40
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29

Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu
1 5 10 15

Gly Asn Ser Tyr Val
20

<210> 30
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro

1 5 10 15

Leu Gly Asn

<210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro
1 5 10 15

Leu Gly Asn Ser
20

<210> 32
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro
1 5 10 15

Leu Gly Asn Ser Tyr
20

<210> 33
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro
1 5 10 15

Leu Gly Asn Ser Tyr Val
20

<210> 34
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly
1 5 10 15

Pro Leu Gly Asn
20

<210> 35
<211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly
1 5 10 15

Pro Leu Gly Asn Ser
20

<210> 36
<211> 22
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly
1 5 10 15

Pro Leu Gly Asn Ser Tyr
20

<210> 37
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly
1 5 10 15

Pro Leu Gly Asn Ser Tyr Val
20

<210> 38
<211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser
1 5 10 15

Gly Pro Leu Gly Asn
20

<210> 39
<211> 22
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser
1 5 10 15

Gly Pro Leu Gly Asn Ser
20

<210> 40
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser
1 5 10 15

Gly Pro Leu Gly Asn Ser Tyr
20

<210> 41
<211> 24
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser
1 5 10 15

Gly Pro Leu Gly Asn Ser Tyr Val
20

<210> 42
<211> 22
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Ser Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Gly Asn
20

<210> 43
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Ser Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Gly Asn Ser
20

<210> 44
<211> 24
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Ser Gly Pro Pro Cys Lys Lys Ser Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Gly Asn Ser Tyr
20

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly
1 5 10

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 46

 Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu
 1 5 10

 10 <210> 47
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <400> 47

 Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp
 1 5 10

 20 <210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 48
 25

 Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp Leu
 1 5 10

 30 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 49

 Arg Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser
 1 5 10
 35

 40 <210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 50

 Lys Arg Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser
 1 5 10
 45

 50 <210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 51

 Gly Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly
 1 5 10

<210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 52

 Gly Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu
 1 5 10

 10
 <210> 53
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15
 <400> 53

 Gly Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp
 1 5 10

 20
 <210> 54
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 25
 <400> 54

 Gly Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp Leu
 1 5 10

 30
 <210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 55

 Val Gly Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly
 1 5 10

 35
 <210> 56
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 40
 <400> 56

 Val Gly Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu
 1 5 10

 45
 <210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 57

Val Gly Lys Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp
1 5 10

<210> 58
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> conjugate Tat-DAXXp

<400> 58

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Lys Lys Ser
1 5 10 15

Arg Lys Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ser Gly Pro Leu Gly
20 25

<210> 59
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> conjugate Tat-FADDp

<400> 59

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Lys Arg Lys
1 5 10 15

Leu Glu Arg Val Gln Ser
20

<210> 60
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> conjugate Tat-FADDp15

<400> 60

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Val Gly Lys
1 5 10 15

Arg Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp Leu
20 25

<210> 61
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> conjugate Tat-mDAXXp

ES 2 553 770 T3

<400> 61

Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln	Lys	Arg	Phe
1				5					10					15	

Arg	Lys	Glu	Lys	Lys	Gln	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly
			20					25				

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en:
 - 5 - un fragmento de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 restos de aminoácidos consecutivos de la proteína DAXX de la SEC ID N°:1, en el que dicho fragmento comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 5, en el que dicho péptido es capaz de inhibir la apoptosis celular.
 - 10 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho péptido es un fragmento de proteína DAXX que consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 5 o en una cualquiera de las SEC ID N°s: 17-44.
 - 15 3. Un peptidomimético de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
 4. Un conjugado que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o un peptidomimético de acuerdo con la reivindicación 3 unido a un Péptido de Penetración Celular.
 - 20 5. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho péptido o dicho peptidomimético se une al Péptido de Penetración Celular a través de un conector.
 6. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que dicho Péptido de Penetración Celular se selecciona entre el grupo que consiste en Tat, RXR, Bpep y Pip2b.
 - 25 7. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho conjugado consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEC ID N°: 58, o en la SEC ID N°: 61.
 8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o al menos un peptidomimético de acuerdo con la reivindicación 3, o al menos un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
 - 30 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 que comprende adicionalmente al menos un agente biológicamente activo adicional.
 - 35 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho al menos un agente biológicamente activo adicional se selecciona entre el grupo que consiste en ciclosporina A, BH4, y combinaciones de los mismos.
 - 40 11. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el peptidomimético de acuerdo con la reivindicación 3, o el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal.
 - 45 12. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el peptidomimético de acuerdo con la reivindicación 3, o el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, para uso en un método para inhibir la apoptosis celular en el cuerpo humano o animal.
 - 50 13. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el peptidomimético de acuerdo con la reivindicación 3, o el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, para uso en un método para el tratamiento de infarto de miocardio agudo, infarto cerebral, trasplantes de órganos, intervenciones cardíacas, o alteraciones de la circulación agudas, en el cuerpo humano o animal.
 - 55 14. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el peptidomimético de acuerdo con la reivindicación 3, o el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, para uso en un método para el tratamiento de isquemia en el cuerpo humano o animal.
 - 60 15. El péptido, o derivado, o conjugado o composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la isquemia es isquemia cardíaca, isquemia renal, colitis isquémica, isquemia mesentérica, isquemia cerebral, isquemia límbica o isquemia cutánea.
 - 65 16. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el peptidomimético de acuerdo con la reivindicación 3, o el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 o la composición

farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, para uso en un método para el tratamiento de lesión por reperfusión en el cuerpo humano o animal.

- 5 17. El péptido, o derivado, o conjugado o composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en las que dicho método también comprende la etapa de administración de ciclosporina A y/o BH4 a dicho cuerpo humano o animal.

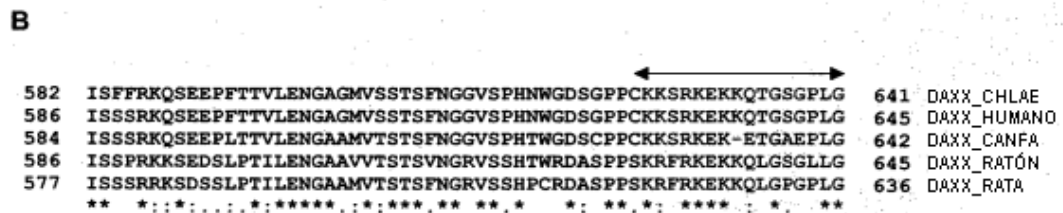
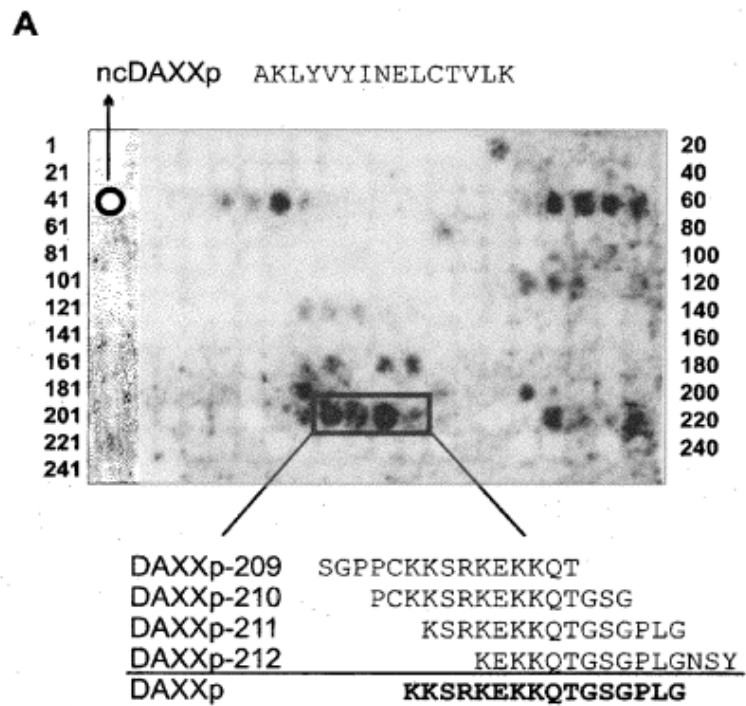


Figura 1

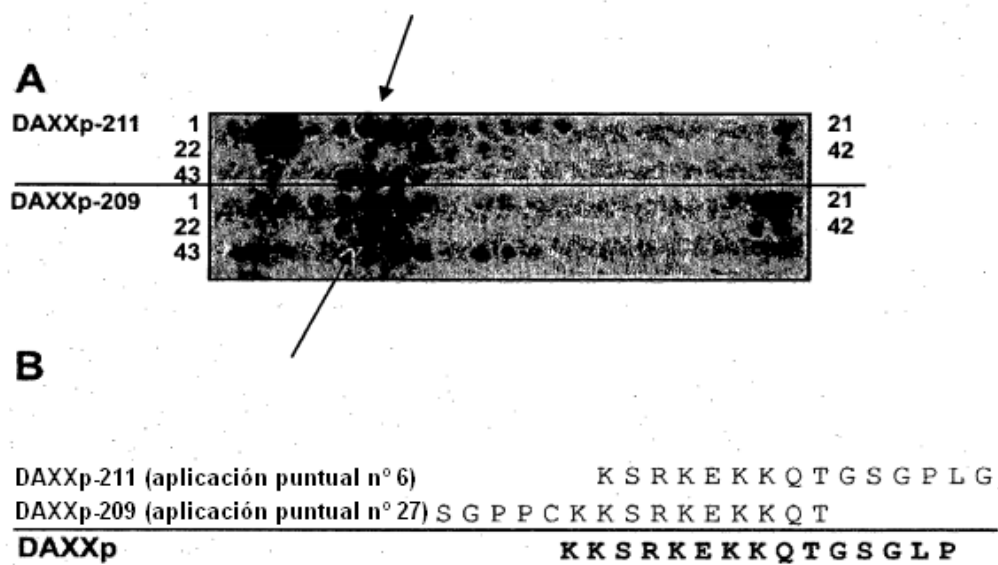


Figura 2

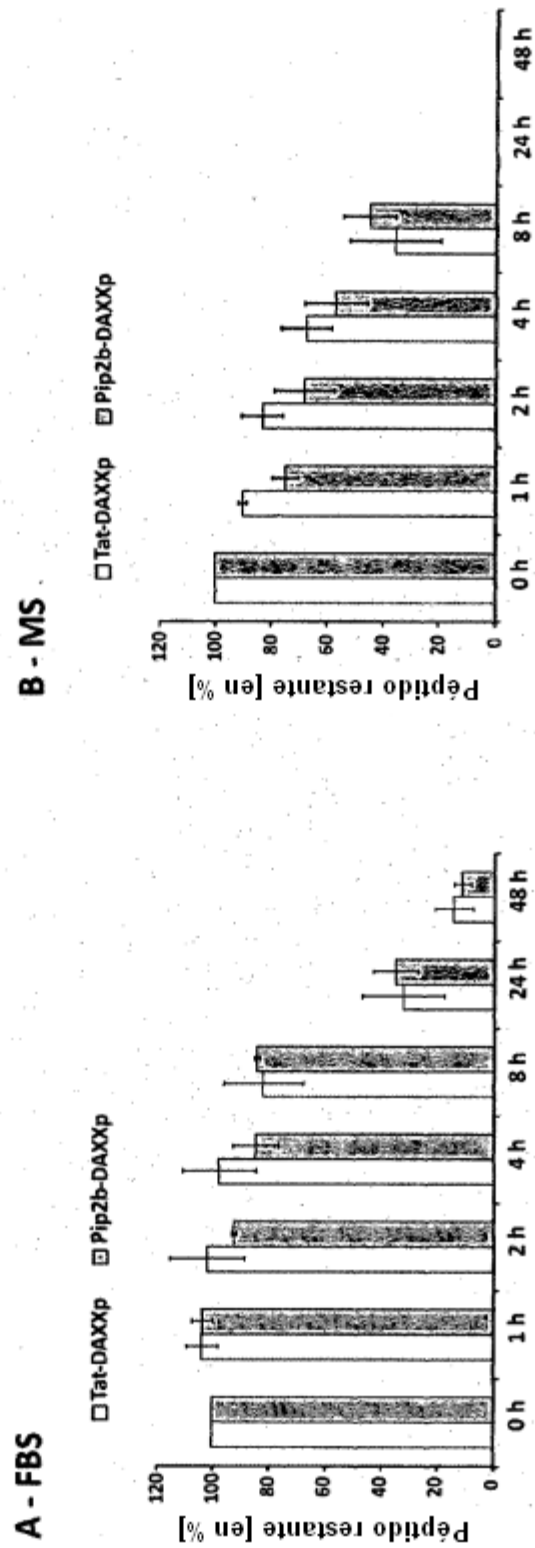


Figura 3

Cardiomiocitos primarios - CF-Tat-DAXXp

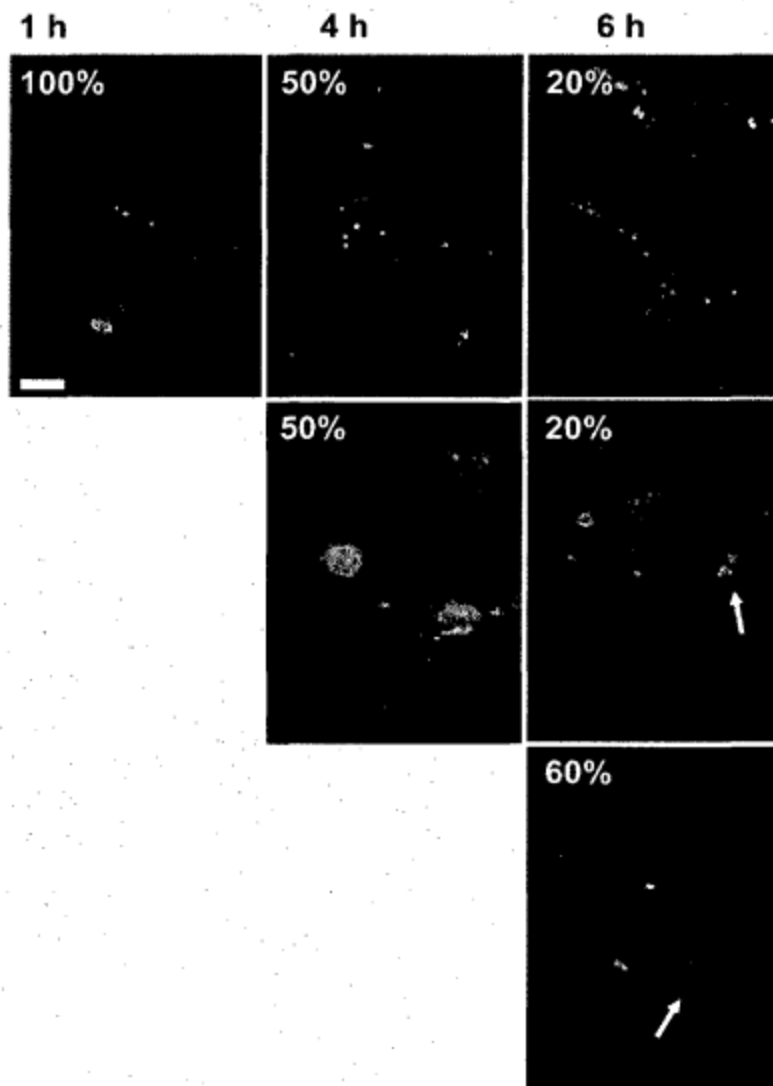


Figura 4

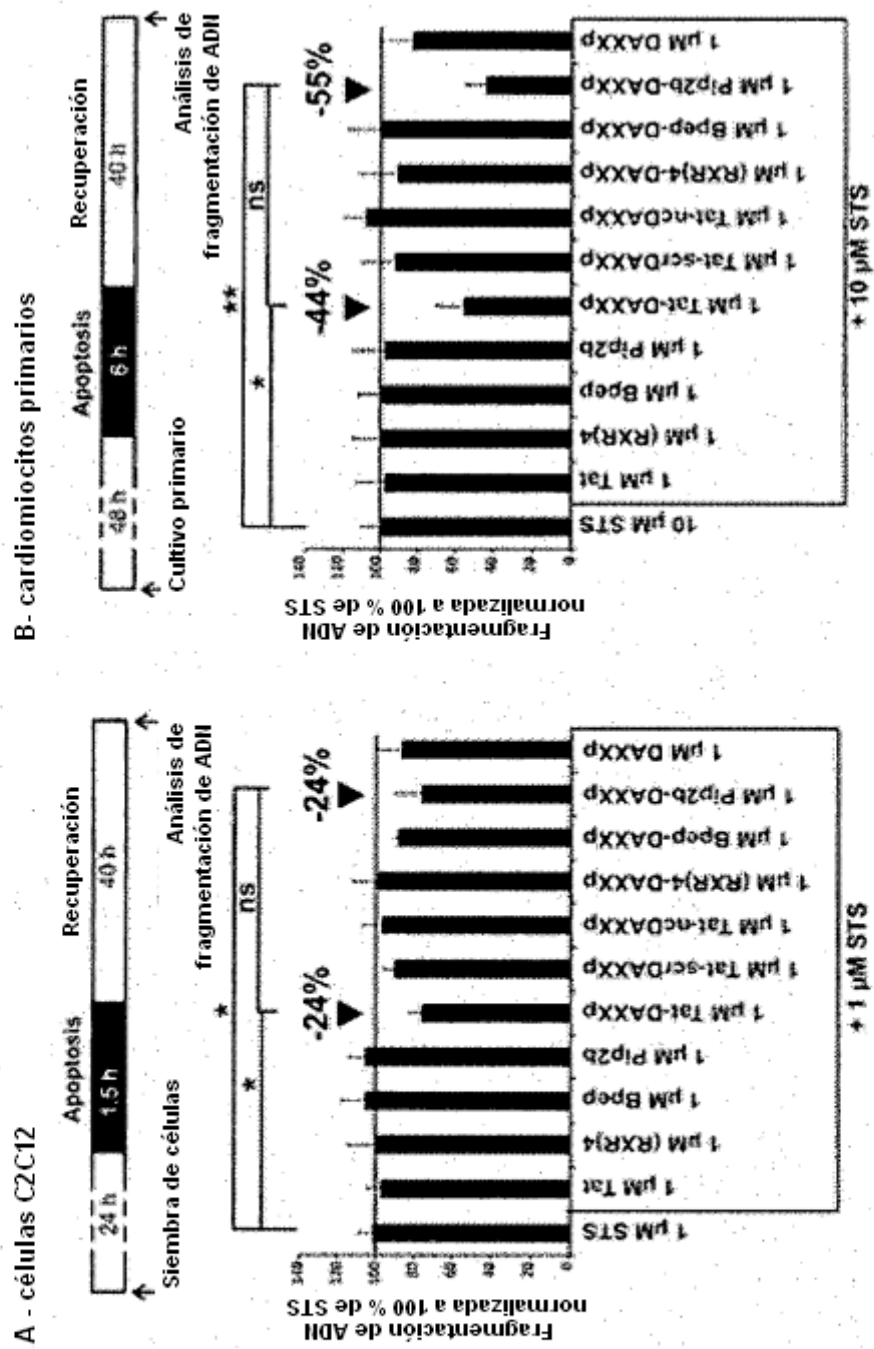


Figura 5(A) -(B)

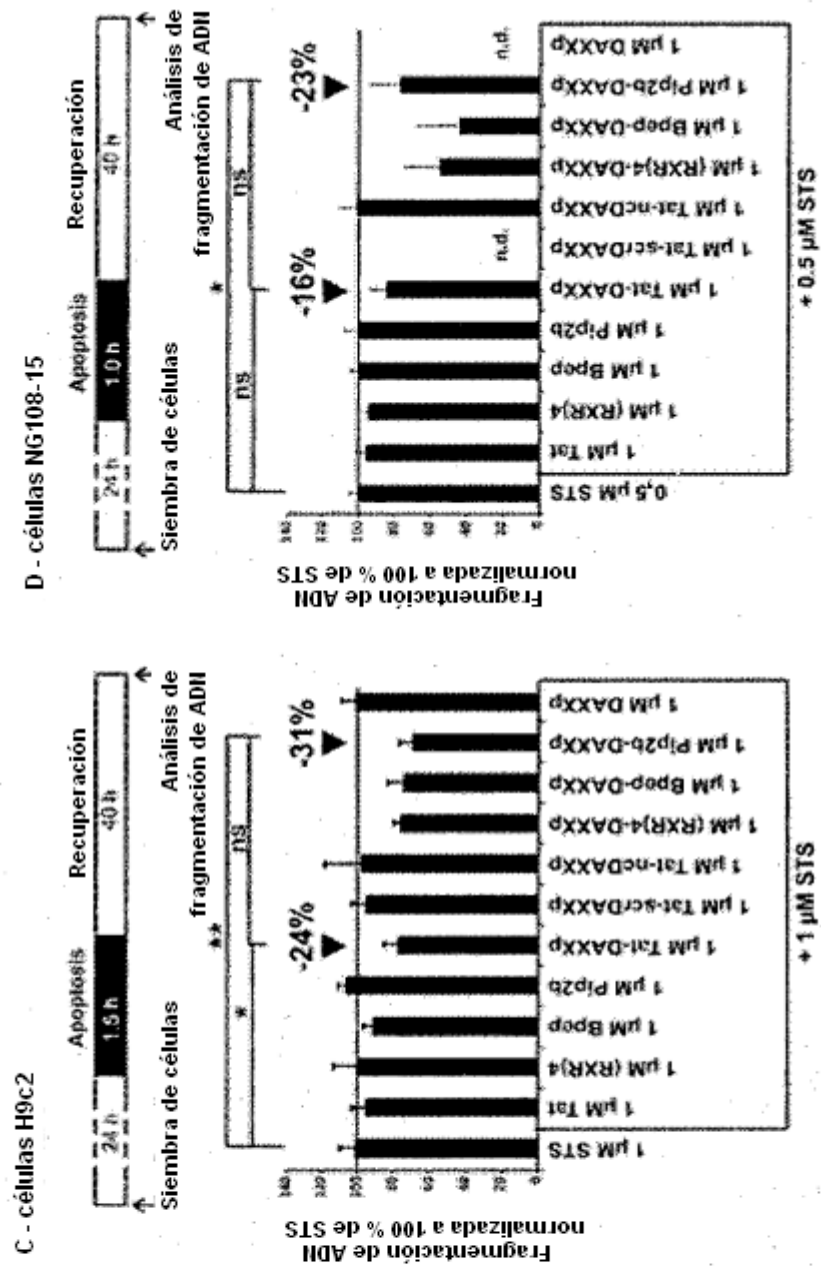


Figura 5(C) -(D)

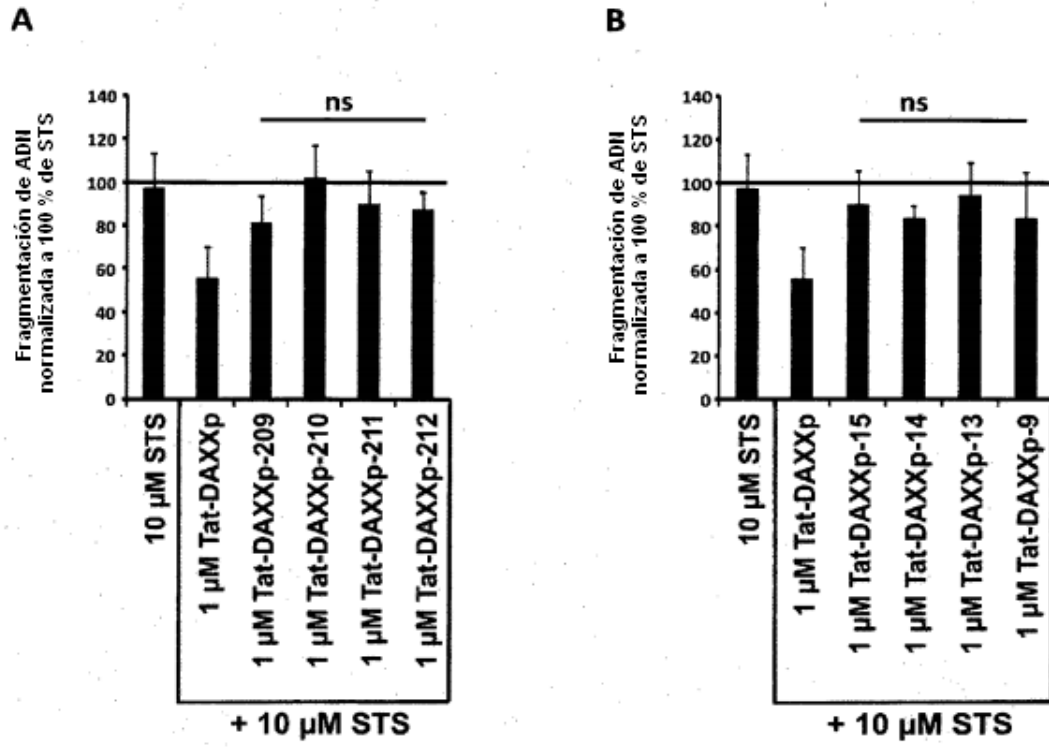


Figura 6

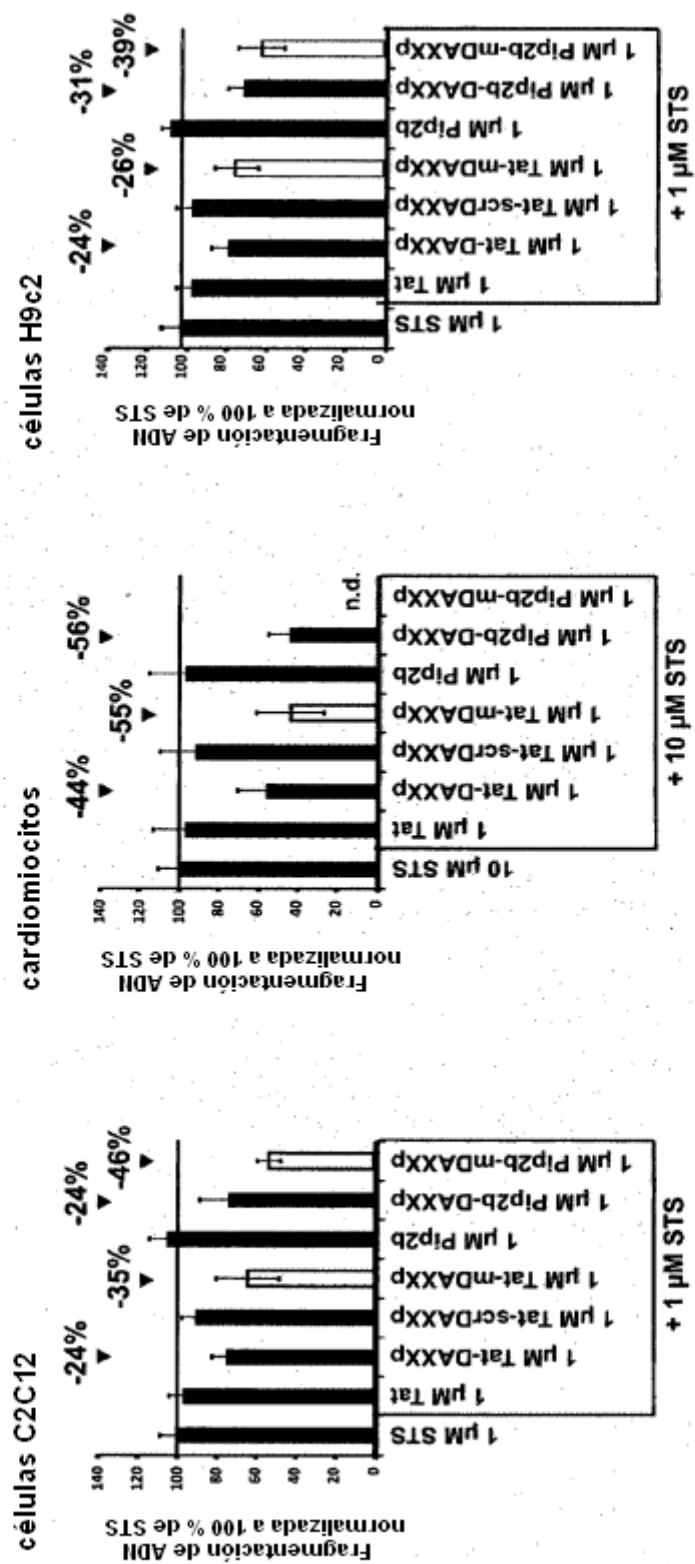


Figura 7

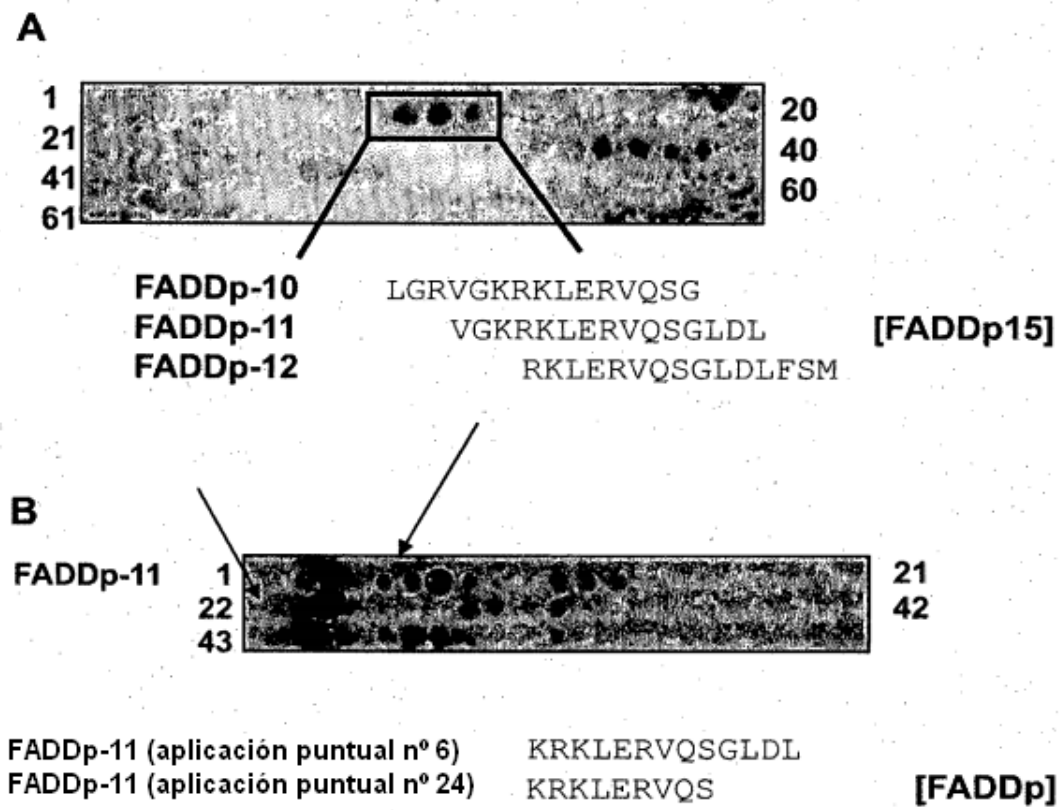


Figura 8

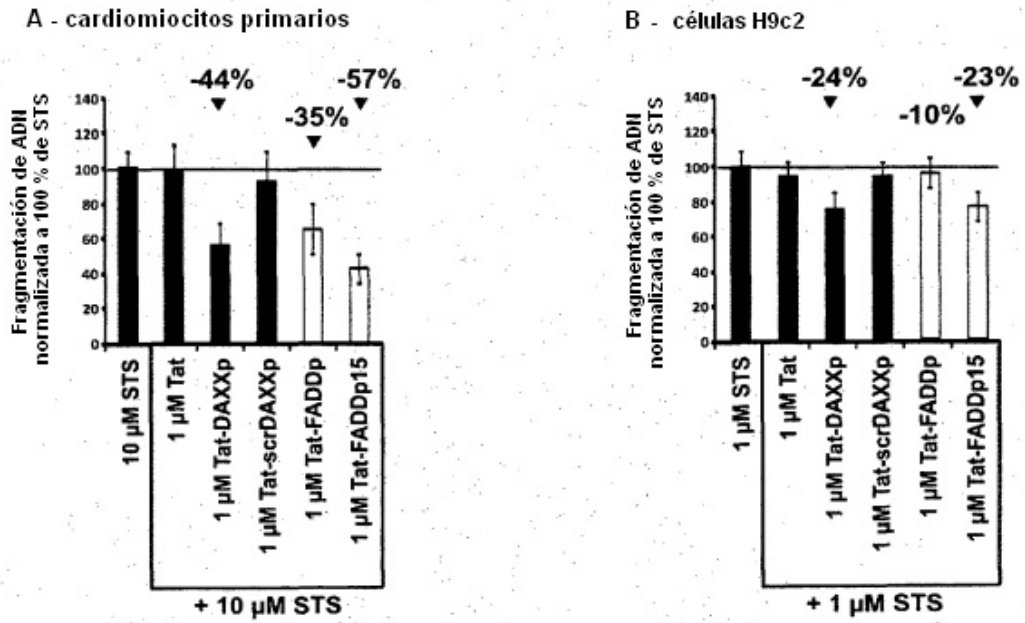


Figura 9

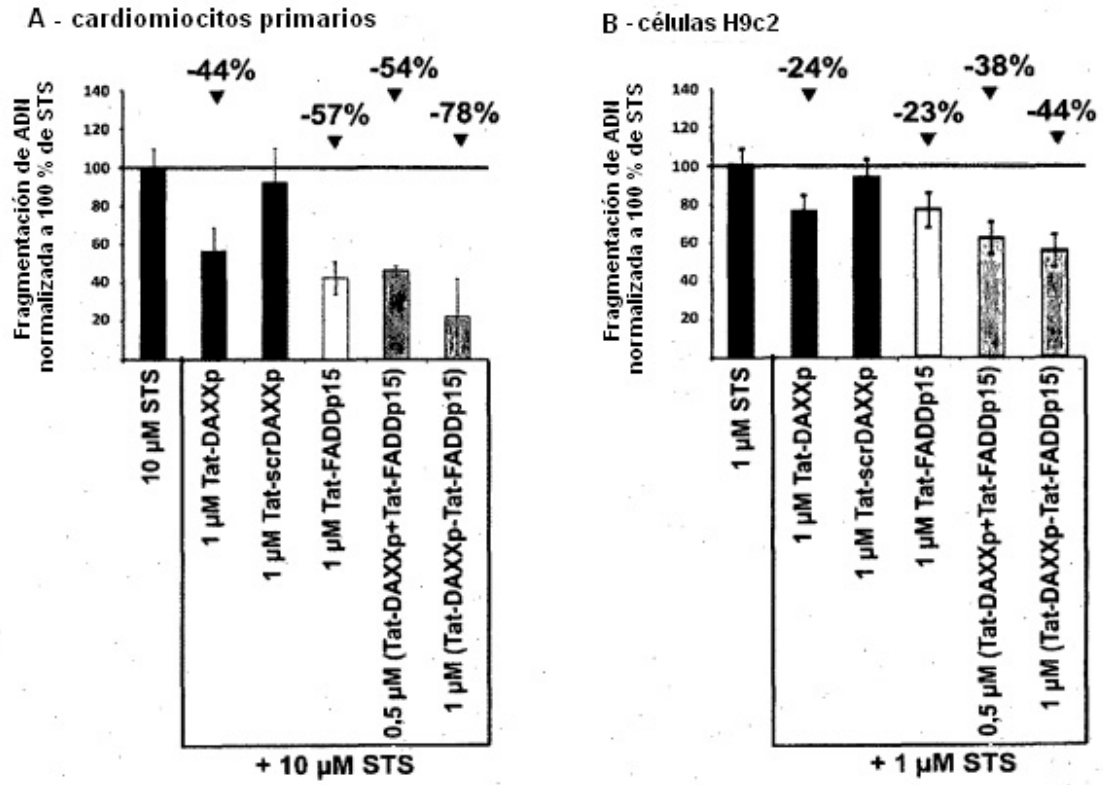


Figura 10

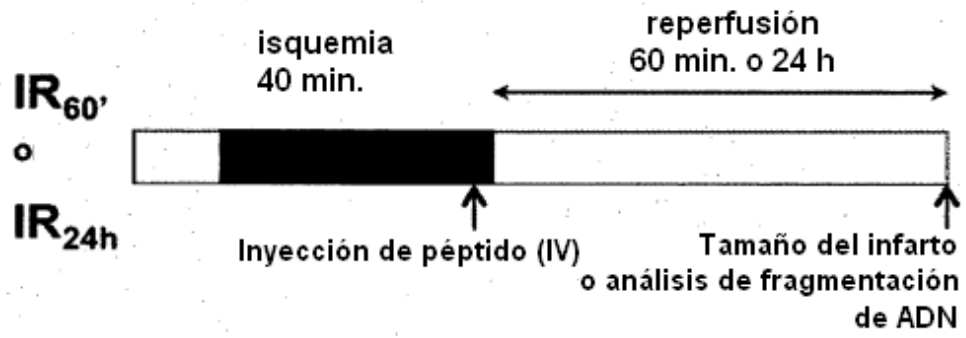


Figura 11

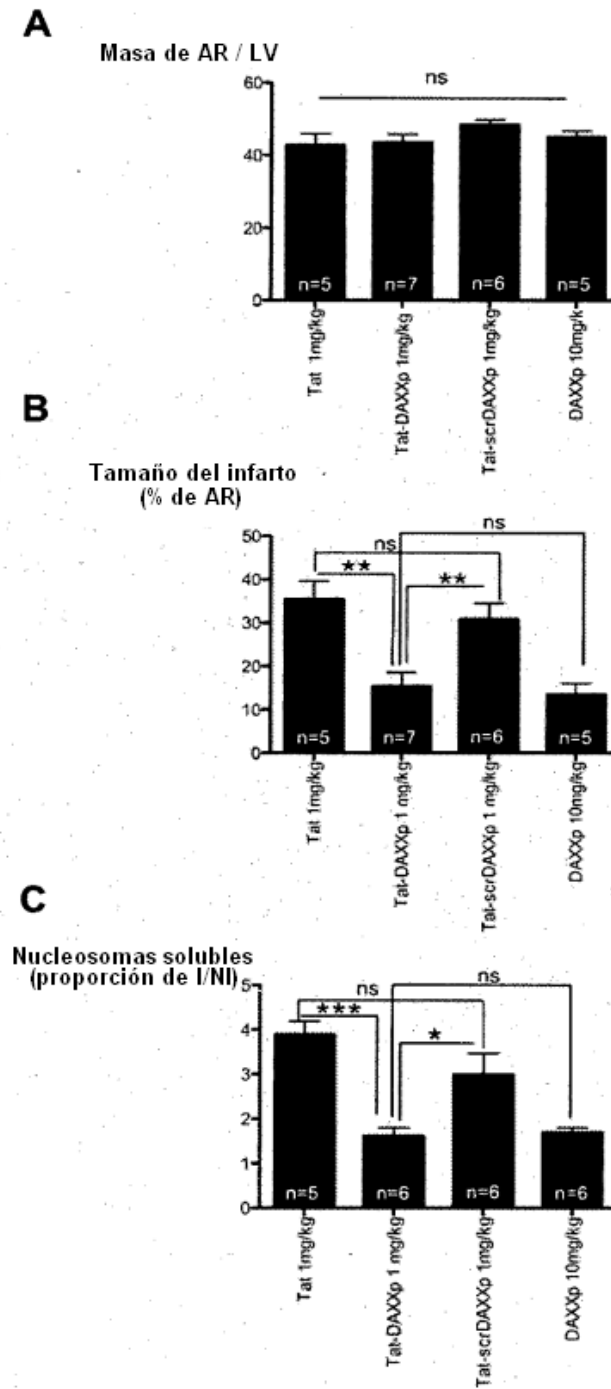


Figura 12

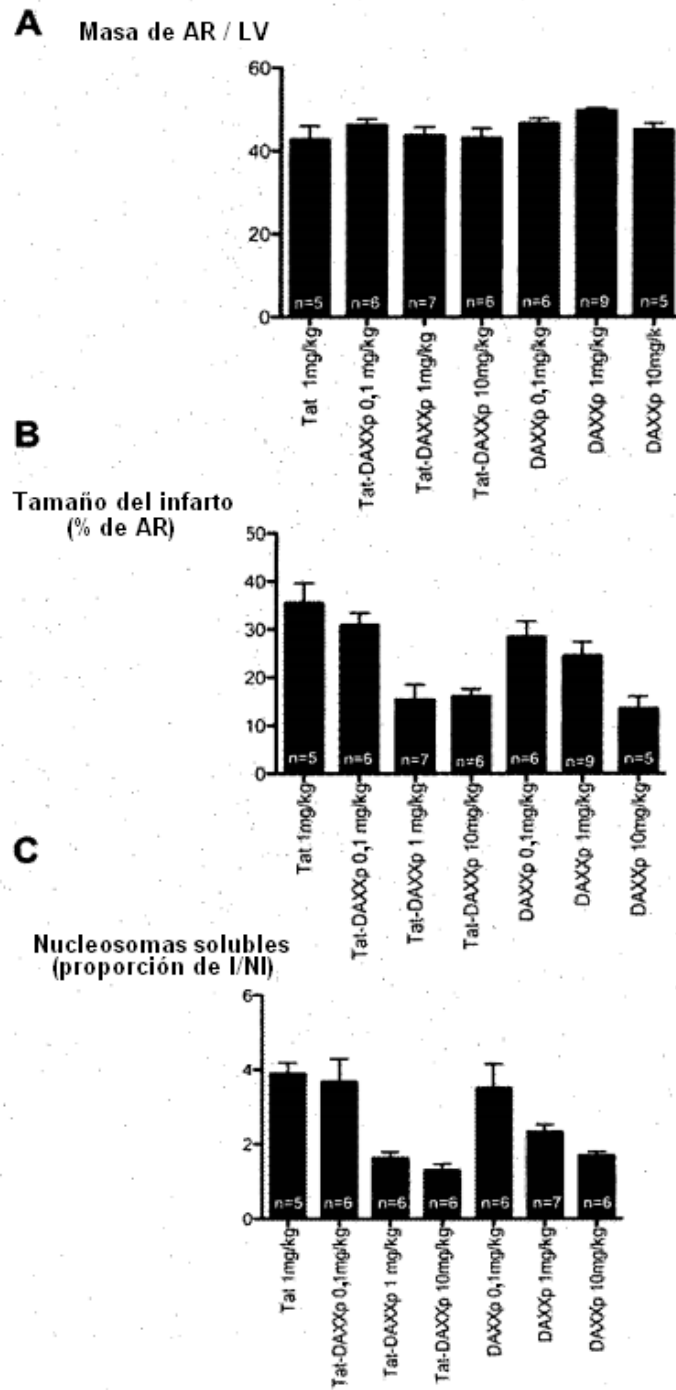


Figura 13

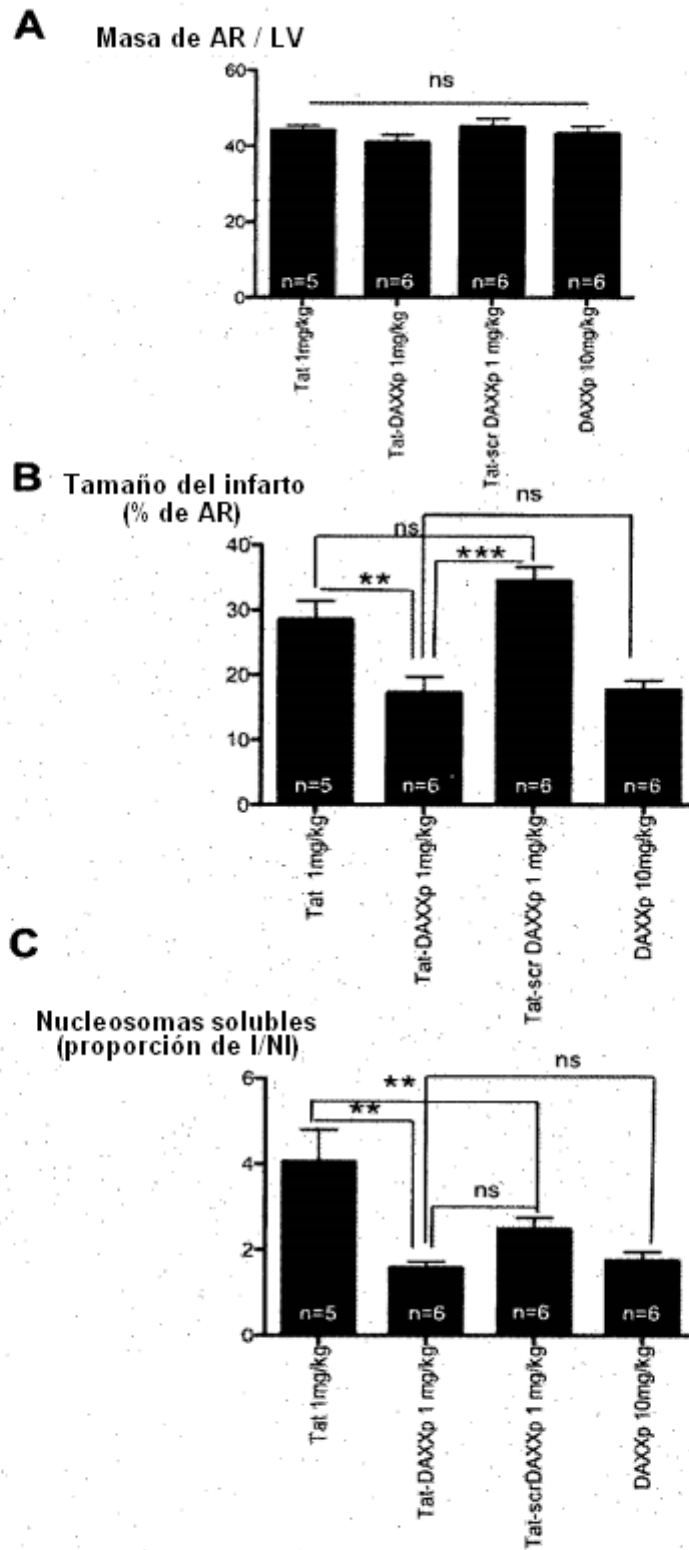
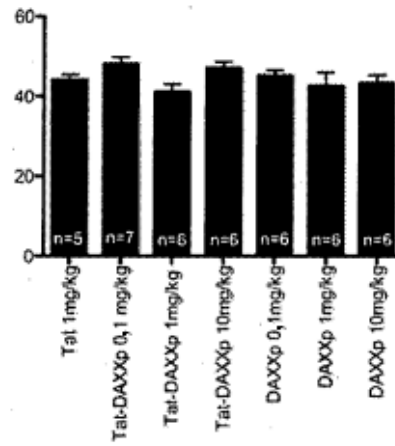


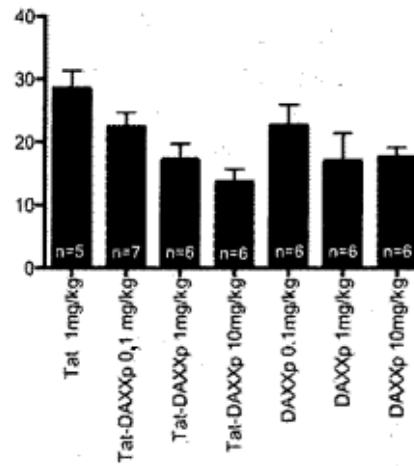
Figura 14

A Masa de AR / LV



B

Tamaño del infarto
(% de AR)



C

Nucleosomas solubles
(proporción de I/NI)

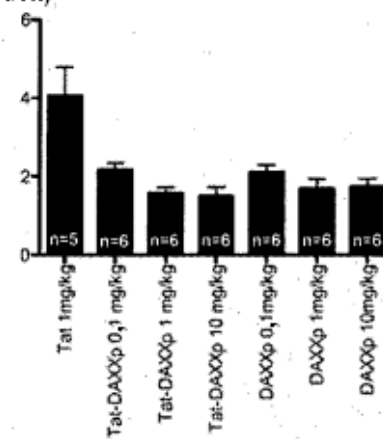


Figura 15

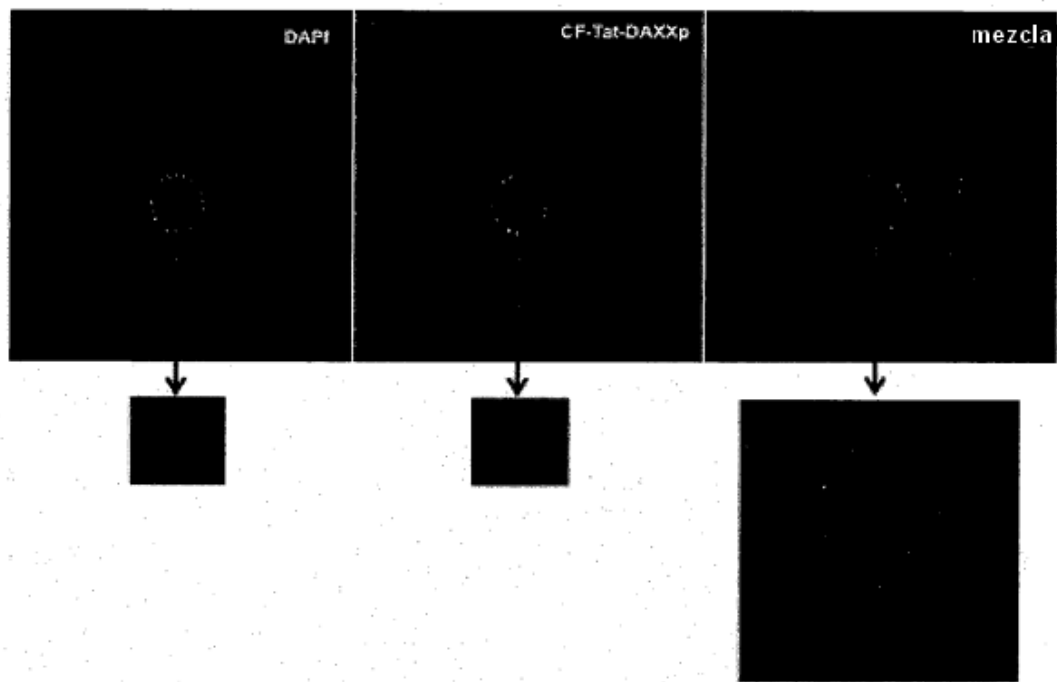


Figura 16

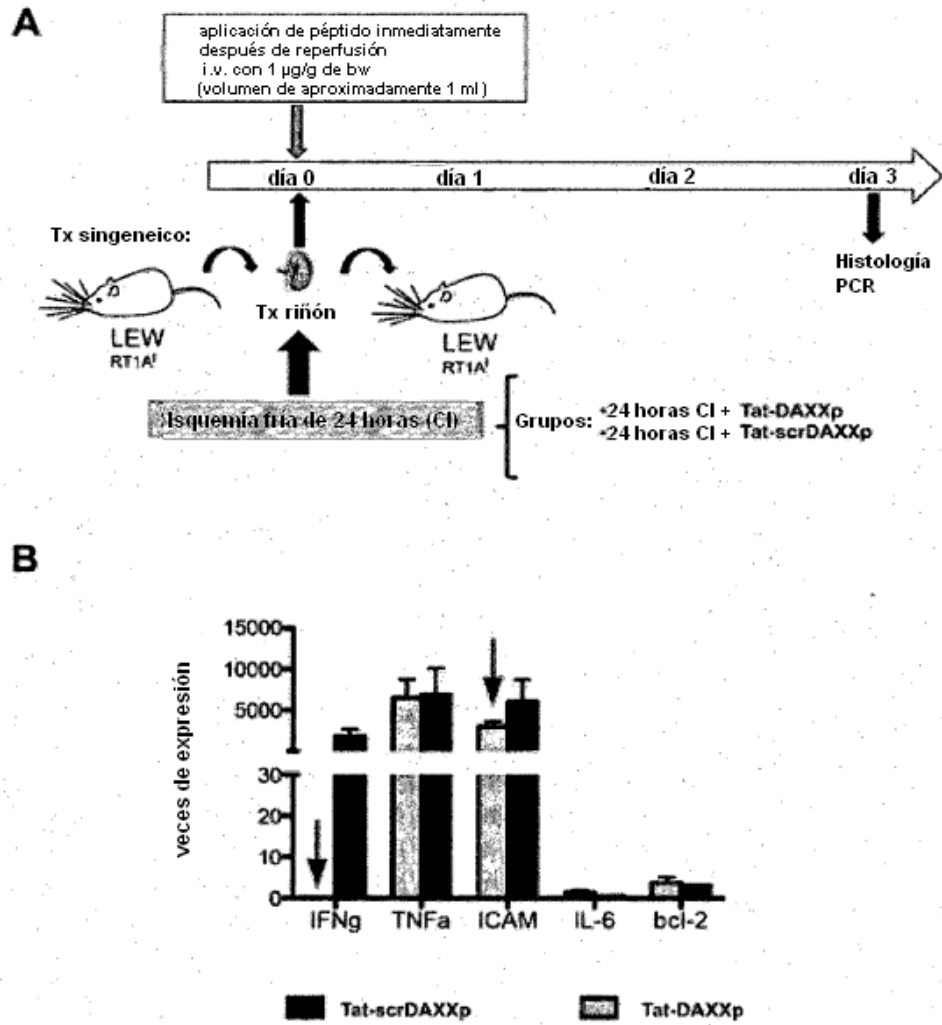


Figura 17