(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 555 524**

(51) Int. CI.:

A61K 47/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2008 E 08859906 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2229185**

(54) Título: **Coadministración de un agente unido a un péptido de interiorización tat con un agente antiinflamatorio**

(30) Prioridad:

05.12.2007 US 992678 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.01.2016

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

TYMIANSKI, MICHAEL y
GARMAN, JONATHAN DAVID

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Coadministración de un agente unido a un péptido de interiorización tat con un agente antiinflamatorio

Esta solicitud reivindica prioridad de la Sol. Provisional de EE.UU. Nº 60/992.678 presentada el 5 de diciembre de 2007.

Referencia a un "listado de secuencias"

El Listado de Secuencias proporcionado en el archivo SEQLIST026373000910US.txt, con un tamaño de 16.385 bytes y creado el 18 de noviembre de 2008, se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Antecedentes de la invención

Muchos fármacos necesitan ser captados por las células o pasar a través de las células y/o ser captados por orgánulos celulares para alcanzar su objetivo terapéutico deseado. Muchas moléculas grandes y algunas moléculas pequeñas tienen por sí mismas una capacidad limitada de pasar a través de las membranas celulares. La capacidad de pasar a través de las membranas celulares se puede incrementar uniendo un agente farmacológico a un péptido de interiorización (también conocido como dominios de transducción de proteínas, o dominios de translocación de membranas). Estos péptidos incluyen el péptido tat, el péptido antennapedia y los péptidos ricos en arginina. Estos péptidos son péptidos básicos cortos presentes en muchas proteínas celulares y virales, y sirven para mediar en la translocación a través de las membranas. Una característica común de estos péptidos es su naturaleza sumamente catiónica. Se ha informado que tales péptidos facilitan la absorción de muchos péptidos y proteínas diferentes en las células, así como oligonucleótidos, ácidos peptidonucleicos y moléculas pequeñas y nanopartículas. Se ha informado de la absorción en células y orgánulos y a través de la barrera hematoencefálica.

Como aplicación de los péptidos de interiorización, se ha unido un péptido tat a un inhibidor peptídico de la interacción entre la proteína de densidad postsináptica-95 (PSD-95) y NMDARs (Aarts et al., Science 298, 846-850 (2002)). El péptido quimérico resultante se ensayó en un modelo celular y animal de ictus. El péptido quimérico fue captado por las células neuronales, y se descubrió que redujo el daño cerebral isquémico en el modelo animal. Este resultado ha llevado a la propuesta de usar antagonistas peptídicos de PSD-95/NMDAR unidos a un péptido de interiorización para tratar el ictus y otras enfermedades mediadas por la excitotoxicidad.

Breve compendio de la invención

La presente descripción proporciona un método para administrar un agente farmacológico a un sujeto, el método. El método comprende administrar el agente farmacológico unido a un péptido de interiorización al sujeto; y administrar un agente antiinflamatorio al sujeto, por lo cual el agente antiinflamatorio inhibe una respuesta inflamatoria inducida por el péptido de interiorización. Opcionalmente, el agente antiinflamatorio es un antihistamínico o un corticosteroide. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat. Opcionalmente, el péptido tat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende GRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:3), o GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID Nº:4). Opcionalmente, el agente farmacológico es un péptido. Opcionalmente, el agente farmacológico es KLSSIESDV (SEQ ID Nº:5).

La invención también proporciona el uso de un agente antiinflamatorio en la fabricación de un medicamento para inhibir una respuesta inflamatoria inducida por un péptido de interiorización unido a un agente farmacológico.

La invención también proporciona un equipo que comprende un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización, y un agente antiinflamatorio que inhibe una respuesta inflamatoria inducida por el péptido de interiorización.

La presente descripción también proporciona un péptido de interiorización unido a biotina que tiene una capacidad reducida de inducir una respuesta inflamatoria en comparación con el péptido de interiorización sin la biotina.

La presente descripción también proporciona un método de administración de un agente farmacológico a un sujeto, y el método comprende administrar el agente farmacológico unido a un péptido de interiorización al sujeto; en el que el péptido de interiorización está biotinilado, y la biotinilación reduce la capacidad del péptido de interiorización de inducir una respuesta inflamatoria respecto del péptido de interiorización sin la biotina.

La presente descripción también proporciona un método para tratar o efectuar la profilaxis de una enfermedad mediada por la excitotoxicidad, que comprende administrar a un sujeto, que tiene o que corre el riesgo de tener la enfermedad, un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD95 a NDMAR 2B unido a un péptido de interiorización en un régimen eficaz para tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad; y administrar al sujeto un agente antiinflamatorio, por lo cual el agente antiinflamatorio inhibe una respuesta inflamatoria inducida por el péptido de interiorización. Opcionalmente, el agente farmacológico es un péptido PL de un receptor NMDAR. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat. Opcionalmente, el péptido de interiorización tiene una secuencia de aminoácidos que comprende GRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:3), o GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID Nº:4). Opcionalmente, el sujeto es de sexo

femenino. Opcionalmente, la enfermedad es ictus. En ciertos métodos, el sujeto corre el riesgo de ataque isquémico cerebral transitorio como resultado de haberse sometido a cirugía cardiaca.

La presente descripción proporciona además un método para tratar o efectuar la profilaxis de una enfermedad mediada por la excitotoxicidad, que comprende administrar a un sujeto, que tiene o que corre el riesgo de tener la enfermedad, un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD95 a NDMAR 2B unido a un péptido de interiorización en un régimen eficaz para tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad; en el que el péptido de interiorización está biotinilado, y la biotinilación reduce la capacidad del péptido de interiorización de inducir una respuesta inflamatoria.

La presente descripción proporciona además un método para tratar o efectuar la profilaxis de una enfermedad mediada por la excitotoxicidad, que comprende administrar a un sujeto de sexo femenino, que tiene o que corre el riesgo de tener la enfermedad, un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD95 a NDMAR 2B unido a un péptido de interiorización en un régimen eficaz para tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat.

La presente descripción proporciona además una mejora en un método de administración de un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización a un sujeto, en el que el péptido de interiorización está biotinilado o se administra con un inmunosupresor que inhibe una respuesta inflamatoria inducida por el péptido de interiorización. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat.

La presente descripción proporciona además un método para inhibir una respuesta inflamatoria, y el método comprende: administrar un agente antiinflamatorio a un sujeto al que se ha administrado o al que se administrará un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización; por lo cual el agente antiinflamatorio inhibe una respuesta inflamatoria inducida por el péptido de interiorización.

La presente descripción proporciona además un método de administración de un agente farmacológico a un sujeto, y el método comprende: administrar el agente farmacológico unido a un péptido de interiorización a un sujeto, en el que al sujeto se le ha administrado o se le administrará un agente antiinflamatorio, por lo cual el agente antiinflamatorio inhibe una respuesta inflamatoria inducida por el péptido de interiorización.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Diferencia por sexo del tamaño del infarto en el modelo P3VO de ictus en ratas. Machos con solución salina: ratas macho con ictus tratadas con solución salina (control). Machos con NA1: Ratas macho con ictus tratadas con Tat-NR2B9c, es decir, el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº:6), que contiene la secuencia Tat y los 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. Hembras con solución salina: ratas hembra con ictus tratadas con solución salina (control). Hembras con NA1: Ratas hembra con ictus tratadas con Tat-NR2B9c, es decir, el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº:6), que contiene la secuencia Tat y 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. Eje Y: Tamaño del infarto, medido (en porcentaje) respecto del tamaño de infarto en las ratas macho tratadas con solución salina solamente)

Figura 2: Los péptidos que contienen la secuencia Tat provocan la desgranulación de los mastocitos. IC: Ionóforo de Calcio (control positivo). NA-1: Tat-NR2B9c, es decir, el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº:6), que contiene la secuencia Tat y los 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. NR2B9c: péptido KLSSIESDV (SEQ ID Nº:5), secuencia de unión a PSD-95 de la subunidad NR2B de NMDA, desprovista de la secuencia Tat. AA: péptido YGRKKRRQRRRKLSSIEADA (SEQ ID Nº:7), idéntico a Tat-NR2B9c, pero con 2 mutaciones puntuales en el dominio de unión a PSD-95 que le hacen incapaz de unirse a PSD-95. La desgranulación se midió mediante la actividad relativa de triptasa (% respecto del control). Las barras indican las medias ± D.E. de 3-6 duplicados independientes.

Figura 3: La desgranulación de mastocitos por péptidos que contienen la secuencia Tat depende de la dosis. IC: Ionóforo de Calcio (control positivo). NA-1: Tat-NR2B9c, es decir, el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº:6), que contiene la secuencia Tat y los 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. AA: péptido YGRKKRRQRRRKLSSIEADA (SEQ ID Nº:7), idéntico a TAT-NR2B9C, pero con 2 mutaciones puntuales en el dominio de unión a PSD-95 que le hacen incapaz de unirse a PSD-95.

Figura 4: Desgranulación de mastocitos por péptidos que contienen variantes de la secuencia Tat. IC: Ionóforo de Calcio (control positivo). Tat-NR2B9c: el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº:6), que contiene la secuencia Tat y los 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. TAT: Secuencia del péptido tat YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:2). 2B9c: péptido KLSSIESDV (SEQ ID Nº:5), secuencia de unión a PSD-95 de la subunidad NR2B de NMDA desprovista de la secuencia Tat. AA: péptido YGRKKRRQRRRKLSSIEADA (SEQ ID Nº:7), idéntico a Tat-NR2B9c, pero con 2 mutaciones puntuales en el dominio de unión a PSD-95 que le hacen incapaz de unirse a PSD-95. F-Tat-NR2B9c: péptido FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº:8). Tat-NR2B9c K>A: YGRKKRRQRRRALSSIESDV (SEQ ID Nº:9). F-Tat-NR2B9c K>A: FGRKKRRQRRRALSSIESDV (SEQ ID Nº:10).

Figura 5: Los conjugados de péptidos que comprenden la secuencia Tat no provocan la desgranulación de los mastocitos.

Figura 6: Caída observada de la tensión arterial observada tras la administración de 50 mg/kg de Tat-NR2B9c a perros Beagle.

Descripción detallada

Definiciones

Un "péptido quimérico" significa un péptido que tiene dos componente peptídicos asociados de manera artificial unidos entre sí en forma de una proteína de fusión o mediante unión química.

Una proteína o polipéptido de "fusión" se refiere a un polipéptido compuesto, es decir, una única secuencia de aminoácidos contiguos, constituida por secuencias de dos (o más) polipéptidos heterólogos diferentes que normalmente no están fusionados en una única secuencia polipeptídica.

La expresión "dominio PDZ" se refiere a un dominio de proteína modular de alrededor de 90 aminoácidos, caracterizado por una identidad de secuencia significativa (p.ej., al menos un 60%) respecto de la proteína sináptica cerebral PSD-95, la proteína de unión septada de Drosophila Discs-Large (DLG), y la proteína de unión estrecha epitelial ZO1 (ZO1). Los dominios PDZ también se conocen como repeticiones de homología Discs-Large ("DHRs") y repeticiones GLGF. Los dominios PDZ en general parecen mantener una secuencia consenso central (Doyle, D. A., 1996, Cell 85: 1067-76). Las proteínas que contienen dominios PDZ ejemplares y las secuencias del dominio PDZ se describen en la Solicitud de EE.UU. Nº 10/714.537.

La expresión "proteína PL" o "proteína ligando de PDZ" se refiere a una proteína que se da de manera natural que forma un complejo molecular con un dominio PDZ, o una proteína cuyo extremo carboxiterminal, cuando se expresa por separado de la proteína de longitud completa (p.ej., en forma de un fragmento peptídico de 3-25 residuos, p.ej. 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 14 ó 16 residuos), forma tal complejo molecular. El complejo molecular se puede observar *in vitro* mediante el uso del "ensayo A" o del "ensayo G" descrito, p.ej., en la Solicitud de EE.UU. Nº 10/714.537, o *in vivo.*

La expresión "receptor de NMDA", o "NMDAR", se refiere a una proteína asociada a la membrana que se sabe que interacciona con NMDA. La expresión incluye así las diversas formas de subunidades descritas en la presente memoria. Tales receptores pueden ser humanos o no humanos (p.ej., de ratón, rata, conejo, mono).

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

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

Los términos "aislado" o "purificado" significan que la especie de interés (p.ej., un péptido) se ha purificado de contaminantes que están presentes en una muestra, tal como una muestra obtenida de fuentes naturales que contienen la especie de interés. Si una especie de interés está aislada o purificada, es la especie macromolecular predominante (p.ej., polipéptido) presente en una muestra (es decir, en base molar es más abundante que cualquier otra especie individual de la composición), y preferiblemente la especie de interés comprende al menos alrededor del 50 por ciento (en base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición aislada, purificada o sustancialmente pura comprende más del 80 al 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en una composición. Lo más preferiblemente, la especie de interés está purificada hasta una homogeneidad esencial (es decir, no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante los métodos de detección convencionales), en la que la composición consiste básicamente en una única especie macromolecular. El término aislado o purificado no excluye necesariamente la presencia de otros componentes destinados a actuar en combinación con una especie aislada. Por ejemplo, un péptido de interiorización se puede describir como aislado a pesar de estar unido a un péptido activo.

Una "molécula peptidomimética" se refiere a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de un péptido que consiste en aminoácidos naturales. La molécula peptidomimética puede contener análogos no naturales, completamente sintéticos, de aminoácidos, o puede ser una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y parcialmente análogos no naturales de aminoácidos. La molécula peptidomimética puede incorporar también cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales, con tal de que tales sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura de la molécula mimética y/o la actividad inhibitoria o de unión. Las composiciones de moléculas polipeptidomiméticas pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que en general son de tres grupos estructurales: a) grupos de unión de residuos distintos de las uniones mediante enlaces amida naturales ("enlaces peptídicos"); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos que se dan de manera natural; o c) residuos que inducen un mimetismo estructural secundario, es decir, que inducen o estabilizan

una estructura secundaria, p.ej., una conformación de giro beta, giro gamma, lámina beta, hélice alfa, y similares. En una molécula peptidomimética de un péptido quimérico que comprende un péptido activo y un péptido de interiorización, el resto activo o el resto de interiorización o ambos pueden ser una molécula peptidomimética.

La expresión "unión específica" se refiere a la unión entre dos moléculas, por ejemplo, un ligando y un receptor, caracterizada por la capacidad de una molécula (ligando) de asociarse con otra molécula específica (receptor) incluso en presencia de otras muchas moléculas diversas, es decir, de mostrar una unión preferente de una molécula por otra en una mezcla heterogénea de moléculas. La unión específica de un ligando a un receptor también se demuestra mediante una unión reducida de un ligando marcado de manera detectable al receptor en presencia de un ligando sin marcar en exceso (es decir, un ensayo de unión competitiva).

La excitotoxicidad es el proceso patológico mediante el cual las neuronas son dañadas y destruidas por la sobreactivación de receptores para el neurotransmisor excitador glutamato, tal como los receptores de NMDA, por ejemplo NMDAR 2B.

El término "sujeto" incluye seres humanos y animales veterinarios, tales como mamíferos.

El término "agente" incluye cualquier elemento, compuesto, o entidad, que incluye, pero sin limitación, p.ej., producto farmacéutico, terapéutico, farmacológico, cosmecéutico, fármaco, toxina, producto natural, compuesto sintético, o compuesto químico.

La expresión "agente farmacológico" significa un agente que tiene una actividad farmacológica. Los agentes incluyen los compuestos que son fármacos conocidos, compuestos para los que se ha identificado una actividad farmacológica pero que se están sometiendo a una evaluación terapéutica adicional. Un agente quimérico comprende un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización. Se puede describir que un agente tiene actividad farmacológica si exhibe una actividad en un sistema de cribado que indica que el agente activo es o puede ser útil en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad. El sistema de cribado puede ser in vitro, celular, animal o humano. Se puede describir que los agentes tienen actividad farmacológica a pesar de que pueden ser necesarios ensayos adicionales para establecer la utilidad profiláctica o terapéutica real en el tratamiento de una enfermedad.

Un péptido tat significa un péptido que comprende o que consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:1), en el que se delecionan, sustituyen o insertan como máximo 5 residuos dentro de la secuencia, que conserva la capacidad de facilitar la absorción de un péptido unido u otro agente en las células. Preferiblemente, cualquier cambio de aminoácidos son sustituciones conservativas. Preferiblemente, cualquier sustitución, deleción o inserción interna en el agregado deja el péptido con una carga neta catiónica, preferiblemente similar a la de la secuencia anterior. Los aminoácidos de un péptido tat se pueden derivatizar con biotina o una molécula similar para reducir una respuesta inflamatoria, como se describe adicionalmente más adelante.

La coadministración de un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización y un agente antiinflamatorio significa que los dos agentes se administran lo suficientemente próximos en el tiempo para que el agente antiinflamatorio pueda inhibir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización.

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

I. GENERAL

La presente descripción proporciona métodos de administración de agentes farmacológicos unidos a un péptido de interiorización, en los que una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización se inhibe mediante la coadministración de un antiinflamatorio o mediante la unión del péptido de interiorización a biotina o una molécula similar. Tales métodos se basan en parte en los resultados descritos en los ejemplos, por lo cual la administración de un agente farmacológico unido a tat a dosis elevadas va seguida estrechamente por una respuesta inflamatoria, que incluye la desgranulación de mastocitos, la liberación de histamina y las secuelas típicas de la liberación de histamina, tales como enrojecimiento, calor, hinchazón, e hipotensión. Aunque la práctica de los métodos de la invención no depende del entendimiento del mecanismo, se cree que la desgranulación de los mastocitos se desencadena mediante la interacción directa entre el péptido tat catiónico y los mastocitos, en vez de desencadenarse mediante una respuesta de anticuerpos IgE. La respuesta inflamatoria se puede inhibir coadministrando un agente antiinflamatorio con el agente farmacológico unido a tat u otro péptido de interiorización. Es adecuada una diversidad de agentes antiinflamatorios usados de manera generalizada, que incluyen antihistamínicos y corticosteroides. De manera alternativa, los inventores han descubierto que la capacidad de los péptidos de interiorización de inducir una respuesta inflamatoria se puede reducir uniéndolos a biotina o una molécula similar.

La presente descripción proporciona además un método para tratar o efectuar la profilaxis de enfermedades caracterizadas por la excitotoxicidad, tales como ictus. Tales enfermedades se pueden tratar mediante el uso de un agente farmacológico que inhibe la interacción entre NMDARs con la proteína de densidad postsináptica 95 unido a un péptido de interiorización. Preferiblemente, en tales métodos, el agente farmacológico se coadministra con un agente antiinflamatorio para inhibir una respuesta inmunitaria inducible por el péptido de interiorización, o el péptido

de interiorización se une a biotina o una molécula similar, por las razones discutidas anteriormente. Independientemente de si se usa un agente antiinflamatorio o péptido de interiorización biotinilado en tales métodos, el tratamiento o la profilaxis se puede administrar a sujetos de sexo masculino y femenino. La administración a sujetos de sexo femenino se basa en parte en los resultados descritos en el ejemplo, en el que se descubrió que el tratamiento en un modelo de ictus en ratas fue al menos tan eficaz en los sujetos de sexo femenino como en los de sexo masculino. La viabilidad de administrar un agente farmacológico que inhibe las interacciones entre PSD95 y NMDAR a un sujeto de sexo femenino contrasta con los resultados previos, en los que se descubrió que los inhibidores de nNOS son ineficaces para tratar la enfermedad excitotóxica en sujetos de sexo femenino. Se informó que la administración de los inhibidores de nNOS protege contra los efectos dañinos del ictus en ratas macho, pero incrementó la lesión celular en las ratas hembra en un modelo de MCAO. McCullough et al., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 25: 502-512 (2005).

II. AGENTES FARMACOLÓGICOS

Los péptidos de interiorización se pueden unir a cualquier agente farmacológico para estimular la absorción del agente a través de las membranas celulares, las membranas intracelulares tales como la membrana nuclear, y/o la barrera hematoencefálica. La unión de un péptido de interiorización a un agente farmacológico mejora la biodisponibilidad en el sitio deseado respecto del uso del agente farmacológico solo. El transporte incrementado debido a los péptidos de interiorización unidos puede permitir dosis disminuidas de los agentes farmacológicos, un transporte selectivo eficaz de los agentes farmacológicos hacia un compartimento celular específico, tal como el núcleo, y/o una toxicidad reducida debido al uso de dosis inferiores.

Los péptidos de interiorización son especialmente útiles para los agentes farmacológicos que requieren entrar en las células y/o el núcleo. Los agentes farmacológicos que tienen una biodisponibilidad escasa, dosis elevadas o semividas cortas, o los fármacos neuroactivos que necesitan atravesar la barrera hematoencefálica para ejercer su actividad, son especialmente adecuados para la unión a péptidos de interiorización. Los péptidos son un tipo de agente farmacológico que son susceptibles para la unión de interiorización, por ejemplo por medio del uso de un enlace peptídico que da como resultado un péptido quimérico que comprende una secuencia de aminoácidos derivada del agente farmacológico, y una secuencia de aminoácidos del péptido de interiorización. Los ácidos nucleicos, y las moléculas orgánicas pequeñas (menores de 500 Da) son otros ejemplos de compuestos que se pueden unir a los péptidos de interiorización.

Se proporciona ciertos consejos para la selección de agentes farmacológicos, métodos para las uniones y el uso de los mismos en la bibliografía científica y de patentes relacionada con los péptidos de interiorización, tales como tat (véanse, p.ej., los documentos US 6.316.003 y US 5.804.604). La tabla siguiente enumera los nombres de los agentes farmacológicos (algunos de los cuales son fármacos aprobados), los trastornos en los que son útiles para el tratamiento, si la enfermedad es aguda o crónica, las vías de administración de los fármacos (hasta el grado establecido) y los comentarios sobre los problemas con los fármacos existentes que se pueden superar en parte mediante el transporte mejorado a través de las membranas conferido mediante un péptido de interiorización.

Tabla 1

Agente farmacológico	Enfermedad	Aguda/crónica	Vía de admin.	Comentario	Referencia
Fenobarbitol (luminal sódico)	Epilepsia		IV / oral	Dependencia, problemas de tolerancia, interacciones, efectos secundarios, defectos congénitos	Motamedi y Meador (2006) Curr Neurol Neurosci Rep, 6(4): 341-6. Drugs.com
Primidona (miidona, misolina)	Epilepsia		Oral	Efectos secundarios, interacciones	Koristkova, et al (2006) Int J Clin Pharmacol Ther, 44(9): 438-42. Drugs.com
Diazepam (valium)	Ansiedad		IP / oral	Dependencia, efectos secundarios, interacciones	Beard, et al (2003) Health Technol Assess, 7(40): iii, ix-x, 1-111. Drugs.com

Dopamina	Parkinson			No puede atravesar la BHE, efectos secundarios	Ahlskog (2001) Neurol Clin, 19(3): 579-605. Drugs.com
Levodopa	Parkinson			Degradado antes de la BHE, efectos secundarios, semivida = 1,5 hrs	Nyholm (2006) Clin Pharmacokinet, 45(2): 109-36. USPTO.gov (patente nº 7160913)
Apomorfina			IP	Semivida corta	Nyholm (2006) Clin Pharmacokinet, 45(2): 109-36. Drugs.com
Mesilato de tirilazad (Freedox)	Ictus		IP	Eficacia baja, fase III detenida	Hickenbottom y Grotta (1998) Semin Neurol 18(4): 485-92. Strokecenter.org
Ciclosporina (Gengraf)	Inmunosu-presión		IP	Péptido, semivida de 5-18 hr	Kees, et al (2006) Ther Drug Monit, 28(3): 312-20. Drugs.com
Vancomicina	Antibiótico		IP	Péptido, absorción baja, semivida de 4-6 hr	de Hoog, et al (2004) Clin Pharmacokinet, 43(7): 417-40. Drugs.com
Lisinopril (Prinivil)	Hipertensión		IP / oral	Péptido, paso escaso a través de la BHE, semivida de 12 hr	Tan, et al (2005) Am J Hypertens, 18(2): 158-64. Drugs.com
Azidotimidina (AZT, zidoridina, combivir)	Antiviral		Oral	Paso escaso a través de la BHE, semivida de 05-3 hr, toxicología hematológica	Spitzenberger, et al (2006) J Cereb Blood Flow Metab, 25 de oct., publicación electrónica antes de impresión. Drugs.com
Piracetam	Dolor/ epilepsia			No puede atravesar la BHE	Loscher y Potschka (2002) J Pharmacol Exp Ther, 301(1): 7-14. USPTO.gov (patente nº 7157421)
Natrecor (péptido BNP)	Síndrome de descompen-sación cardio-renal		IV	Eficacia desconocida	Feldman y Sun (2004) Heart Fail Rev, 9(3): 203-8. Clinicaltrials.gov
AVR-118 (péptido)	Tratamiento paliativo del cáncer		Subcutá-neo	Eficacia desconocida, dosis desconocida	Clinicaltrials.gov
Oxitocina (péptido)	Trastornos del estado de ánimo		IV/IM	Interacciones, dosis desconocida	Swaab, et al (2005) Ageing Res Rev, 4(2): 141-94. Drugs.com

Pravastatina (Pravachol)	MS		Oral	Eficacia desconocida, biodisponibilidad baja	Hatanaka (2000) Clin Pharmacokinet, 39(6): 397-412. Clinicaltrials.gov
Remifentanilo	Dolor, quemazón		IV	Semivida de 3,5 min, metabolizado por esterasa desconocida	Scott y Perry (2005) Drugs, 65(13): 1793-1823. Clinicaltrials.gov
Neurotensina	Esquizofrenia, Parkinson, adicción			Péptido 13AA, fácilmente degradado, no puede atravesar la BHE	Boules, et al, (2006) Peptides, 27(10): 2523-33.
GDNF (factor neurotrófico derivado de glía)	Parkinson	Crónico	Intrapa-renquimal	Péptido, no puede atravesar la BHE	Grondin, et al (2003) Prog Drug Res, 61: 101-23.
Inhibidores de proteasas - lopinavir -ritonavir -saquinavir - darunavir - atazanavir - amprenavir	VIH	2	Oral	Todos los inhibidores de proteasas de VIH sufren la capacidad intensa del VIH de mutar, lo que genera cepas de VIH resistentes a fármacos	-Oldfield y Plosker (2006) Drugs 66(9): 1275-99. -Porter y Charman (2001) Adv Drug Deliv Rev, 1 de oct.; 50 Supl. 1: S127-47. -Piacenti (2006) Pharmacotherapy 26(8): 1111-33.
Dihidroergota-mina	Migraña		IV, IM, subc.	Las interacciones provocan isquemia periférica, semivida de 9 hr	Modi y Lowder (2006) Am Fam Physician 73(1): 72-8.
Sporamax (itaconazol)	Antifúngico		Oral	Finalmente se desarrolla resistencia al fármaco, insuficiencia cardiaca congestiva en ciertas poblaciones	Wang y Remold (2006) Cardiol Rev 14(5): 223-6.
Inhibidores de la Proteína Quinasa C	Infarto agudo de miocardio, ictus, isquemia, lesión por reperfusión				Publicaciones de pat. de EE.UU. 20050267030, 20060148702, 20060293237, 20050215483, 20040204364, 20040009922
AII-7	Cáncer, cáncer de mama	Crónico		Molécula peptidomimética que bloquea el dominio intracelular de Erbb2 e incrementa la sensibilidad a taxol	Kunz et al, Mol Cancer Res 2006;4(12):983-98

Péptido CRAMP	infección por Salmonella			Péptido anti-microbiano intracelular que reduce la replicación de Salmonella	Rosenberger, CM. PEAS | 24 de febrero, 2004 | vol. 101 | nº 8 | 2422-2427
Péptido de canales de sodio	Puede reducir los espasmos musculares (epilepsia, piernas inquietas, Parkinson, etc.)			El péptido que corresponde al segmento intracelular corto entre los dominios transmembrana homólogos III y IV de la subunidad alfa del canal de sodio retrasó la inactivación	Vassilev, Science (1988) 241: 1658-6
Aptámero KDI1	Bloquea la señalización de EGF-posible anti-neoplásico				Buerger. J. Biol. Chem., Vol. 278, Ejemplar 39, 37610-37621, 26 de septiembre, 2003
ARN/terapia génica				Se pueden usar péptidos transportadores para introducir ARNs o siARN/ARNi para el tratamiento	Turner et al (2007) Blood Cells Mol Dis, 38(1): 1-7.

Una clase de agentes de interés particular inhibe las interacciones entre PSD-95 y uno o más NMDARs. Tales agentes son útiles para reducir los efectos dañinos del ictus y otras afecciones neurológicas mediadas al menos en parte por la excitotoxicidad de NMDAR. Tales agentes incluyen péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que incluye o basada en el motivo PL de un Receptor de NMDA o dominio PDZ de PSD95. Tales péptidos pueden inhibir también las interacciones entre PSD-95 y nNOS y otros receptores de glutamato (p.ej., receptores de kainato o receptores de AMPA). Los péptidos preferidos inhiben la interacción entre los dominios PDZ 1 y 2 de la proteína de densidad postsináptica-95 (PSD-95) (secuencia de aminoácidos humana proporcionada por Stathakism, Genomics 44(1):71-82 (1997)) y la secuencia PL C-terminal de una o más subunidades del Receptor de NMDA 2 que incluyen la subunidad NR2B del receptor de N-metil-D-aspartato neuronal (Mandich et al., Genomics 22, 216-8 (1994)). NMDAR2B tiene la identificación de GenBank 4099612, 20 aminoácidos C-terminales FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID Nº:11) y un motivo PL ESDV (SEQ ID Nº:12). Los péptidos preferidos inhiben las formas humanas de PSD-95 y los receptores NMDAR humanos. Sin embargo, la inhibición se puede demostrar también a partir de variantes de especie de las proteínas. A continuación se muestra una lista de receptores de NMDA y de glutamato que se pueden usar:

Tabla 2: Receptores de NMDA Con Secuencias PL

Nombre	I.G. o nº de acc.	Secuencia 20mérica C-terminal	Secuencia 4mérica C-terminal	¿PL?	ID de PL interna
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID Nº:13)	STVV (SEQ ID Nº:27)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID Nº:13)	STW (SEQ ID Nº:27)	X	AA216
NMDAR-4	472845	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID Nº:13)	STW (SEQ ID Nº:27)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID Nº:13)	STVV (SEQ ID Nº:27)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID Nº:13)	STVV (SEQ ID Nº:27)	X	AA216

NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID Nº:14)	HRES (SEQ ID Nº:28)		
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID Nº:14)	HRES (SEQ ID Nº:28)		
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISSLES EV (SEQ ID Nº:15)	ESEV (SEQ ID Nº:29)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID Nº:11)	ESDV (SEQ ID Nº:12)	X	AA34.1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEYQRTSRT CES (SEQ ID Nº:16)	TCES (SEQ ID Nº:30)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID Nº:11)	ESDV (SEQ ID Nº:12)	X	
NMDAR2A	558748	LNSCSNRRVYKKMPSIE SDV (SEQ ID Nº:17)	ESDV (SEQ ID Nº:12)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGSAHFSSLE SEV (SEQ ID Nº:18)	ESEV (SEQ ID Nº:29)	X	
Receptor de glutamato delta 2	AF009014	QPTPTLGLNLGNDPDRGTSI (SEQ ID Nº:19)	GTSI (SEQ ID Nº:31)	X	
Receptor de glutamato 1	I28953	MQSIPCMSHSSGMPLGATGL (SEQ ID Nº:20)	ATGL (SEQ ID Nº:32)	X	
Receptor de glutamato 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIESVKI (SEQ ID Nº:21)	SVKI (SEQ ID Nº:33)	X	
Receptor de glutamato 3	AF167332	QNYATYREGYNVYGTESVKI (SEQ ID Nº:22)	SVKI (SEQ ID Nº:33)	X	
Receptor de glutamato 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASDLP (SEQ ID Nº:23)	SDLP (SEQ ID Nº:34)		
Receptor de glutamato 5	U16125	SFTSILTCHQRRTQRKETVA (SEQ ID Nº:24)	ETVA (SEQ ID Nº:35)	X	
Receptor de glutamato 6	U16126	EVINMHTFNDRRLPGKETMA (SEQ ID Nº:25)	ETMA (SEQ ID Nº:36)	X	
Receptor de glutamato 7	U16127	RRLPGKDSMACSTSLAPVFP (SEQ ID Nº:26)	PVFP (SEQ ID Nº:37)		

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

Los péptidos pueden incluir o basarse en un motivo PL del extremo C-terminal de cualquiera de las subunidades anteriores, y tener una secuencia de aminoácidos que comprende [S/T]-X-[V/L]. Esta secuencia se da preferiblemente en el extremo C-terminal de los péptidos de la invención. Los péptidos preferidos tienen una secuencia de aminoácidos que comprende [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID Nº:38) en su extremo C-terminal. Los péptidos ejemplares comprenden: ESDV (SEQ ID Nº:12), ESEV (SEQ ID Nº:29), ETDV (SEQ ID Nº:39), ETEV (SEQ ID Nº:40), DTDV (SEQ ID Nº:41), y DTEV (SEQ ID Nº:42) como aminoácidos C-terminales. Dos péptidos especialmente preferidos son KLSSIESDV (SEQ ID Nº:5), y KLSSIETDV (SEQ ID Nº:43). Tales péptidos tienen normalmente 3-25 aminoácidos (sin un péptido de interiorización), longitudes peptídicas de 5-10 aminoácidos, y se prefieren especialmente 9 aminoácidos (también sin un péptido de interiorización). En algunos de tales péptidos, todos los aminoácidos son del extremo C-terminal de un receptor de NMDA (y no incluyen los aminoácidos de un péptido de interiorización).

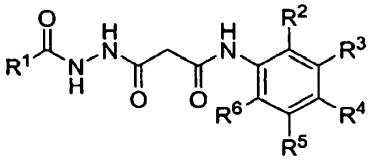
Otros péptidos que inhiben las interacciones entre PDS95 y NDMARs incluyen los péptidos del dominio PDZ 1 y/o 2 de PSD-95 o un subfragmento de cualquiera de estos que inhibe las interacciones entre PSD-95 y un receptor de NMDA, tal como NMDA 2B. Tales péptidos activos comprenden al menos 50, 60, 70, 80 ó 90 aminoácidos del dominio PDZ 1 y/o dominio PDZ 2 de PSD-95, que se dan dentro de aproximadamente los aminoácidos 65-248 de PSD-95 proporcionados por Stathakism, Genomics 44(1):71-82 (1997) (secuencia humana) o NP_031890.1, GI:6681195 (secuencia de ratón) o las regiones correspondientes de otras variantes de especie.

La actividad farmacológica adecuada de los péptidos, moléculas peptidomiméticas u otros agentes se puede confirmar, si se desea, mediante el uso del modelo animal descrito en los Ejemplos. Opcionalmente, los péptidos o las moléculas peptidomiméticas se pueden cribar también en función de la capacidad de inhibir las interacciones entre PSD-95 y NMDAR 2B mediante el uso de los ensayos descritos, p.ej., en el documento US 20050059597. Los péptidos útiles tienen en general valores de IC50 de menos de 50 µM, 25 µM, 10 µM, 0,1 µM o 0,01 µM en tal ensayo. Los péptidos preferidos tienen en general un valor de IC50 de entre 0,001-1 µM, y más preferiblemente 0,05-0,5 ó 0,05 a 0,1 µM

Los péptidos tales como los recién descritos se pueden derivatizar opcionalmente (p.ej., acetilar, fosforilar y/o glicosilar) para mejorar la afinidad de unión del inhibidor, para mejorar la capacidad del inhibidor de ser transportado a través de una membrana celular o para mejorar la estabilidad. Como ejemplo específico, para los inhibidores en los que el tercer residuo del extremo C-terminal es S o T, este residuo se puede fosforilar antes de usar el péptido.

Los agentes farmacológicos también incluyen moléculas pequeñas que inhiben las interacciones entre PSD95 y NMDAR 2B, y/u otras interacciones descritas anteriormente. Los inhibidores de moléculas pequeñas adecuados se describen en la Solicitud Internacional pendiente junto con la presente Nº PCT/US2006/062715 y 60/947.892 presentada el 3 de julio de 2007. Estas moléculas se identificaron mediante un cribado *in silico* de una biblioteca de compuestos en función de la unión a PSD95, y se verificó experimentalmente la unión de los compuestos ejemplares.

Se describen muchos compuestos adecuados en la Sol. Provisional de EE.UU. Nº 60/947.883. Una clase ejemplar de compuestos adecuados son de fórmula:



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

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

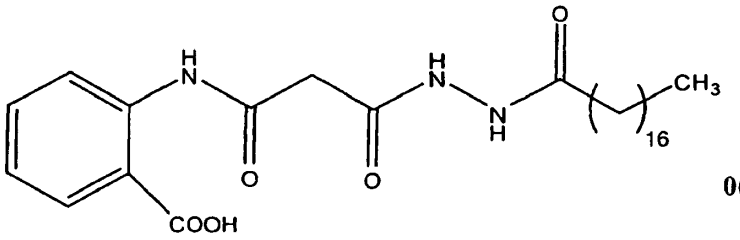
cada R^8 y R^9 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, OH, ciclohexano, ciclopentano, fenilo, fenilo sustituido y ciclopentadieno;

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

R^{12} es un miembro seleccionado del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} y arilo; y cada u y v son independientemente de 0 a 20;

en la que uno de R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 es -COOH, y en la que el resto de R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en F, H, OCH_3 y CH_3.

Un compuesto es 0620-0057, cuya estructura es:



0620-0057

.

III. PÉPTIDOS DE INTERIORIZACIÓN

Los péptidos de interiorización son una clase bien conocida de péptidos relativamente cortos que permiten que muchas proteínas celulares o virales atraviesen las membranas. Los ejemplos incluyen la proteína antennapedia (Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997) (y las variantes de la misma), la proteína tat del virus de la inmunodeficiencia humana, la proteína VP22, el producto del gen UL49 del virus herpes simplex de tipo 1, Penetratina, SynB1 y 3, Transportan, Anfipático, gp41NLS, poliArg, y varias toxinas proteicas vegetales y bacterianas, tales como ricina, abrina, modeccina, toxina de la difteria, toxina del cólera, toxina del carbunco, toxinas

termolábiles, y exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa (ETA). Se describen otros ejemplos en las siguientes referencias (Temsamani, Drug Discovery Today, 9(23):1012-1019, 2004; De Coupade, Biochem J., 390:407-418, 2005; Saalik Bioconjugate Chem. 15: 1246-1253, 2004; Zhao, Medicinal Research Reviews 24(1):1-12, 2004; Deshayes, Cellular and Molecular Life Sciences 62:1839-49, 2005).

Un péptido de interiorización preferido es tat del virus VIH. Un péptido tat informado en trabajos previos comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos estándar YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:2) hallada en la proteína Tat del VIH. Si hay presentes residuos adicionales que flanquean tal motivo tat (además del agente farmacológico), los residuos pueden ser, por ejemplo, aminoácidos naturales que flanquean este segmento de una proteína tat, aminoácidos espaciadores o ligadores de un tipo usado en general para unir dos dominios peptídicos, p.ej., gly $(ser)_4$ (SEQ ID Nº:44), TGEKP (SEQ ID Nº:45), GGRRGGGS (SEQ ID Nº:46), o LRQRDGERP (SEQ ID Nº:47) (véase, p.ej., Tang et al. (1996), J. Biol. Chem. 271, 15682-15686; Hennecke et al. (1998), Protein Eng. 11, 405-410)), o pueden ser otros aminoácidos que no reduzcan significativamente la capacidad de conferir la absorción de la variante sin los residuos flanqueantes. Preferiblemente, el número de aminoácidos flanqueantes distintos de un péptido activo no supera diez a cada lado de YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:2). Un péptido tat adecuado que comprende residuos de aminoácidos adicionales que flanquean el extremo C-terminal de YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:2) es YGRKKRRQRRRPQ (SEQ ID Nº:48). Sin embargo, preferiblemente, no hay presentes aminoácidos flanqueantes.

Las variantes del péptido tat anterior que tienen una capacidad reducida de unirse a los canales de calcio de tipo N se describen en el documento 60/904507, presentado el 02/03/2007. Tales variantes pueden comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos XGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:49), en la que X es un aminoácido distinto de Y o nada (en cuyo caso G es un residuo N-terminal libre). Un péptido tat preferido tiene el residuo Y N-terminal sustituido con F. Así, se prefiere un péptido tat que comprende o que consiste en FGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:3). Otra variante preferida del péptido tat consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:1). Otros péptidos tat que facilitan la absorción de un agente farmacológico sin inhibir los canales de calcio de tipo N incluyen los presentados en la Tabla 3.

Tabla 3

X-FGRKKRRQRRR (F-Tat3) (SEQ ID Nº:3)
X-GKKKKKQKKK (SEQ ID Nº:50)
X-RKKRRQRRR (SEQ ID Nº:51)
X-GAKKRRQRRR (SEQ ID Nº:52)
X-AKKRRQRRR (SEQ ID Nº:53)
X-GRKARRQRRR (SEQ ID Nº:54)
X-RKARRQRRR (SEQ ID Nº:55)
X-GRKKARQRRR (SEQ ID Nº:56)
X-RKKARQRRR (SEQ ID Nº:57)
X-GRKKRRQARR (SEQ ID Nº:58)
X-RKKRRQARR (SEQ ID Nº:59)
X-GRKKRRQRAR (SEQ ID Nº:60)
X-RKKRRQRAR (SEQ ID Nº:61)
X-RRPRRPRRPRR (SEQ ID Nº:62)
X-RRARRARRARR (SEQ ID Nº:63)
X-RRRARRRARR (SEQ ID Nº:64)
X-RRRPRRRPRR (SEQ ID Nº:65)
X-RRPRRPRR (SEQ ID Nº:66)
X-RRARRARR (SEQ ID Nº:67)

X puede representar un extremo aminoterminal libre, uno o más aminoácidos, o un resto conjugado.

Los péptidos de interiorización se pueden unir a agentes farmacológicos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los agentes se pueden unir a los péptidos de interiorización mediante unión química, por ejemplo por medio

de un agente de acoplamiento o conjugación. Hay numerosos agentes disponibles comercialmente, y se revisan en S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991). Algunos ejemplos de reactivos de entrecruzamiento incluyen 3-(2-piridilditio) propionato J-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenileno) bismaleimida; N,N'-etileno-bis-(yodoacetamida) u otro reactivo que tiene puentes de metileno de 6 a 11 carbonos (que son relativamente específicos para los grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno (que forma uniones irreversibles con los grupos amino y tirosina). Otros reactivos de entrecruzamiento incluyen p,p'-difluoro-m, m'-dinitrodifenilsulfona (que forma entrecruzamientos irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimidato de dimetilo (que es específico de los grupos amino); cloruro de fenol-1,4-disulfonilo (que reacciona principalmente con los grupos amino); diisocianato o diisotiocianato de hexametileno, o p-diisocianato de azofenilo (que reacciona principalmente con los grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobencidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

Para los agentes farmacológicos que son péptidos, la unión a un péptido de interiorización se puede conseguir generando una proteína de fusión que comprende la secuencia peptídica fusionada, preferiblemente en su extremo N-terminal, a un péptido de interiorización.

Los péptidos farmacológicos, opcionalmente fusionados a péptidos tat, se pueden sintetizar mediante síntesis en fase sólida o métodos recombinantes. Las moléculas peptidomiméticas se pueden sintetizar mediante el uso de una diversidad de procedimientos y metodologías descritas en la bibliografía científica y de patentes, p.ej., Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9:205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:114-119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267:220-234.

IV. RESPUESTA INFLAMATORIA A LOS PÉPTIDOS DE INTERIORIZACIÓN

Los presentes inventores han descubierto que los péptidos de interiorización, tales como tat, tienen la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria tras la administración a un sujeto. La respuesta inflamatoria es detectable normalmente en 1, 5, 10, 20, 30, o 60 min tras administrar el péptido, pero en general desaparece en 24 hr tras la administración del péptido (suponiendo que el péptido no se vuelva a administrar). La respuesta inflamatoria depende de la dosis. La respuesta inflamatoria en general se produce de nuevo a una intensidad similar al volver a administrar el péptido.

La respuesta inflamatoria se caracteriza por una desgranulación de los mastocitos y la liberación consiguiente de histamina y otros mediadores de la inflamación, tales como quimiocinas, citocinas, leucotrienos, lipasas, proteasas, cininas, citocinas, derivados de ácido araquidónico tales como prostaglandinas, interleucinas, y/u óxido nítrico. La histamina y/u otros mediadores liberados de la inflamación dan lugar a varios síntomas de inflamación, que incluyen enrojecimiento cutáneo, calor, hinchazón, hipertensión y/o pulso reducido. La liberación de histamina también puede dar como resultado vasodilatación, broncoconstricción, activación del músculo liso, separación de las células endoteliales (responsable de urticaria), dolor, picor, permeabilidad capilar incrementada, hipersecreción glandular, espasmo del músculo liso, y/o infiltración tisular de células inflamatorias, así como secreción de ácidos gástricos, y liberación disminuida de neurotransmisores tales como histamina, acetilcolina, norepinefrina, y serotonina.

V. AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

Hay disponibles fácilmente una amplia diversidad de agentes antiinflamatorios para inhibir el tipo de respuesta inflamatoria indicada anteriormente (véase, p.ej., la Patente de EE.UU. nº 6.204.245. Una clase de agente antiinflamatorio son los compuestos antihistamínicos. Tales agentes inhiben la interacción de la histamina con sus receptores, y de ese modo inhiben las secuelas resultantes de la inflamación indicadas anteriormente. Hay disponibles comercialmente muchos antihistamínicos, algunos sin receta médica. Los ejemplos de antihistamínicos son azatadina, azelastina, burfrolina, cetirizina, ciproheptadina, doxantrozol, etodroxizina, forskolina, hidroxizina, cetotifeno, oxatomida, pizotifeno, proxicromil, piperazinas N,N'-sustituidas o terfenadina. Los antihistamínicos varían en su capacidad de bloquear los receptores de histamina en el SNC así como los receptores periféricos, y los antihistamínicos de segunda y tercera generación tienen selectividad hacia los receptores periféricos. Acrivastina, Astemizol, Cetirizina, Loratadina, Mizolastina, Levocetirizina, Desloratadina, Fexofenadina, son ejemplos de antihistamínicos de segunda y tercera generación. Los antihistamínicos están disponibles de manera generalizada en formulaciones orales y tópicas.

Otra clase de agentes antiinflamatorios útiles para inhibir la respuesta inmunitaria son los corticosteroides. Estos compuestos son reguladores transcripcionales, y son inhibidores potentes de los síntomas inflamatorios puestos en funcionamiento por la liberación de histamina y otros compuestos que resultan de la desgranulación de los mastocitos. Los ejemplos de corticosteroides son Cortisona, Hidrocortisona (Cortef), Prednisona (Deltasona, Meticorten, Orasona), Prednisolona (Delta-Cortef, Pediapred, Prelona), Triamcinolona (Aristocort, Kenacort), Metilprednisolona (Medrol), Dexametasona (Decadron, Dexona, Hexadrol), y Betametasona (Celestona). Los corticosteroides están disponibles de manera generalizada en formulaciones orales, intravenosas y tópicas.

Otra clase de agentes antiinflamatorios son los inhibidores de la desgranulación de mastocitos. Esta clase de compuestos incluyen los derivados de 2-carboxilatocromon-5'-il-2-hidroxipropano tales como cromoglicato de bis(acetoximetilo), cromoglicato disódico y nedocromilo.

También se pueden usar fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). Tales fármacos incluyen compuestos de aspirina (acetilsalicilatos), salicilatos que no son aspirina, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, meclofenamato, naproxeno, naproxeno sódico, fenilbutazona, sulindac, y tometina. Sin embargo, los efectos antiinflamatorios de tales fármacos son menos eficaces que los de los antihistamínicos o corticosteroides.

También se pueden usar fármacos antiinflamatorios más potentes, tales como azatioprina, ciclofosfamida, leukeran, ciclosporina, pero no se prefieren porque son de acción más lenta y/o están asociados a efectos secundarios. También se pueden usar agentes antiinflamatorios biológicos, tales como Tysabri® o Humira®, pero no se prefieren por las mismas razones.

VI. CONJUGACIÓN

La respuesta inflamatoria inducible mediante un péptido de interiorización se puede reducir alternativamente (o adicionalmente) uniendo el péptido de interiorización a biotina o una molécula similar para formar un conjugado. El conjugado conserva la capacidad de facilitar la absorción de un agente farmacológico unido en las células, pero induce una respuesta inflamatoria reducida en comparación con el mismo péptido de interiorización sin biotina. Los péptidos de interiorización conjugados se pueden cribar para confirmar la absorción deseada y la ausencia (o disminución) de la respuesta inmunitaria resultante.

Las alternativas a biotina que se pueden usar para formar conjugados de un péptido de interiorización incluyen acetilo, benzoilo, grupo alquilo (alifático), piroglutamato, grupo alquilo con grupo cicloalquilo en el extremo, biotina con espaciador alquilo, (5,6)-FAM. La biotina u otra molécula se puede unir al péptido de interiorización por medio de la química de amidas, química de sulfamidas, química de sulfonas, y/o química de alquilación.

VII. PACIENTES SUSCEPTIBLES DE TRATAMIENTO/PROFILAXIS

Una amplia diversidad de pacientes son susceptibles de tratamiento mediante los métodos de la invención, como se ejemplifica mediante los agentes farmacológicos y afecciones asociadas enumeradas en la Tabla 1. Los métodos son de uso particular en los pacientes que tienen una afección que exacerbaría cualquier inflamación que resultase de un péptido de interiorización, por ejemplo, un paciente que padece hipertensión, pulso elevado u otros signos o síntomas de inflamación. Los métodos también son especialmente útiles en métodos de tratamiento que requieren una dosis elevada de agente farmacológico unido al péptido de interiorización. En sentido estricto, lo que determina la presencia y el grado de la respuesta inflamatoria, si la hay, es la dosis del péptido de interiorización más que el agente farmacológico unido. Sin embargo, la dosis del péptido de interiorización está determinada, por supuesto, por la dosis del agente farmacológico unido. Por ejemplo, se puede hacer perceptible una respuesta inflamatoria a una dosis de más de 1,5 mg/kg de péptido de interiorización. En el tratamiento de ciertas enfermedades, la dosis eficaz del agente farmacológico y por lo tanto del péptido de interiorización unido es demasiado baja para inducir una respuesta inflamatoria en la mayoría de pacientes. Sin embargo, la sensibilidad de los pacientes individuales a una respuesta inflamatoria puede variar, y el tratamiento con un agente antiinflamatorio suave, tal como una histamina, todavía puede ser una precaución conveniente.

Una clase de pacientes de interés particular son aquellos que tienen o que corren el riesgo de tener una enfermedad o afección caracterizada por la excitotoxicidad. Tales enfermedades y afecciones incluyen ictus, epilepsia, hipoxia, lesión traumática del SNC no asociada a ictus, tal como lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Los métodos de la invención son adecuados para tratar a pacientes de sexo masculino y femenino que tienen o que corren el riesgo de tener tales enfermedades y afecciones.

Un ictus es una afección que resulta del flujo sanguíneo reducido en el SNC independientemente de la causa. Las causas potenciales incluyen embolismo, hemorragia y trombosis. Algunas neuronas mueren inmediatamente como resultado del flujo sanguíneo reducido. Estas células liberan sus moléculas componentes, que incluyen glutamato, lo que a su vez activa los receptores de NMDA, que elevan los niveles intracelulares de calcio, y los niveles intracelulares de enzimas, lo que conduce a la muerte de más células neuronales (la cascada de excitotoxicidad). La muerte del tejido del SNC se denomina infarto. El volumen de infarto (es decir, el volumen de células neuronales muertas que son el resultado del ictus en el cerebro) se puede usar como indicador del grado de daño patológico resultante del ictus. El efecto sintomático depende del volumen del infarto y de dónde se localiza en el cerebro. Se puede usar el índice de discapacidad como medida del daño sintomático, tal como la Escala de Resultado de Ictus de Rankin (Rankin, Scott Med J;2:200-15 (1957)) y el Índice de Barthel. La Escala de Rankin se basa en valorar directamente las condiciones globales de un paciente como sigue.

Tabla 4

0	Sin ningún síntoma
1	Sin discapacidad significativa a pesar de los síntomas; capaz de llegar a cabo tareas y actividades normales.
2	Discapacidad ligera; incapaz de llevar a cabo todas las actividades previas, pero capaz de encargarse de sus propios asuntos sin ayuda.
3	Discapacidad moderada que requiere cierta ayuda, pero capaz de caminar sin ayuda
4	Discapacidad moderada a grave; incapaz de caminar sin ayuda e incapaz de atender sus propias necesidades corporales sin ayuda.
5	Discapacidad grave; postrado en cama, incontinente, y requiere constantes cuidados y atención de enfermería.

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

De manera alternativa, se puede medir la gravedad/resultado del ictus mediante el uso de la escala de ictus del NIH, disponible en el sitio de Internet ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_Scale_Booklet.pdf.

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

Un ictus isquémico se refiere de manera más específica a un tipo de ictus que está provocado por el bloqueo del flujo sanguíneo en el cerebro. Lo más frecuentemente, la afección subyacente para este tipo de bloqueo es el desarrollo de depósitos grasos que recubren las paredes de los vasos. Esta afección se denominada ateroesclerosis. Estos depósitos grasos pueden provocar dos tipos de obstrucción. La trombosis cerebral se refiere a un trombo (coágulo sanguíneo) que se desarrolla en la parte obstruida del vaso. "Embolia cerebral" se refiere en general a un coágulo sanguíneo que se forma en otra localización del sistema circulatorio, normalmente el corazón y las arterias de gran tamaño de la parte superior del pecho y del cuello. Después se desprende una porción del coágulo sanguíneo, entra en el torrente sanguíneo y viaja a través de los vasos sanguíneos del cerebro hasta que alcanza vasos demasiado pequeños para poder pasar. Una segunda causa importante de embolia es un ritmo cardiaco irregular, conocido como fibrilación arterial. Esto crea condiciones en las que se pueden formar coágulos en el corazón, desprenderse y viajar hacia el cerebro. Las causas potenciales adicionales de ictus isquémico son hemorragia, trombosis, disección de una arteria o vena, un paro cardiaco, choque de cualquier causa que incluye hemorragia, y causas yatrógenas tales como lesión quirúrgica directa en los vasos sanguíneos del cerebro o vasos que conducen al cerebro o cirugía cardiaca. El ictus isquémico representa alrededor del 83 por ciento de todos los casos de ictus.

Los ataques isquémicos transitorios (AITs) son ictus leves o de advertencia. En un AIT, están presentes las condiciones indicativas de un ictus isquémico, y se desarrollan los signos de advertencia típicos del ictus. Sin embargo, la obstrucción (coágulo sanguíneo) se da durante un tiempo corto y tiende a resolverse sola por medio de mecanismos normales. Los pacientes que se someten a cirugía cardiaca tienen un riesgo particular de ataque isquémico cerebral transitorio.

El ictus hemorrágico representa alrededor del 17 por ciento de los casos de ictus. Da como resultado un vaso debilitado que se rompe y sangra en el cerebro circundante. La sangre se acumula y comprime el tejido cerebral circundante. Los dos tipos generales de ictus hemorrágicos son la hemorragia intracerebral y la hemorragia subaracnoidea. El ictus hemorrágico resulta de la ruptura de un vaso sanguíneo debilitado. Las causas potenciales de ruptura de un vaso sanguíneo debilitado incluyen una hemorragia hipertensiva, en la que la tensión arterial elevada provoca una ruptura de un vaso sanguíneo, u otra causa subyacente de vasos sanguíneos debilitados tal como una malformación vascular cerebral rota que incluye un aneurisma cerebral, malformación arteriovenosa (MAV) o malformación cavernosa. Los ictus hemorrágicos también pueden surgir de una transformación hemorrágica de un ictus isquémico que debilita los vasos sanguíneos en el infarto, o una hemorragia de tumores primarios o metastásicos en el SNC que contienen vasos sanguíneos anormalmente débiles. El ictus hemorrágico también puede surgir de causas yatrógenas tales como lesión quirúrgica directa en un vaso sanguíneo cerebral. Un aneurisma es una dilatación de una región debilitada de un vaso sanguíneo. Si se deja sin tratar, el aneurisma continúa debilitándose hasta que se rompe y sangra en el cerebro. Una malformación arteriovenosa (MAV) es un agrupamiento de vasos sanguíneos formados de manera anormal. Una malformación cavernosa es una anormalidad venosa que puede provocar una hemorragia de las estructuras venosas debilitadas. Cualquiera de estos vasos puede romperse, lo que también provoca una hemorragia en el cerebro. El ictus hemorrágico puede resultar también de un traumatismo físico. El ictus hemorrágico en una parte del cerebro puede conducir a ictus isquémico en otra parte por la escasez de la sangre perdida en el ictus hemorrágico.

VIII. ADMINISTRACIÓN DE UN AGENTE FARMACOLÓGICO CON UN AGENTE ANTIINFLAMATORIO

En los métodos en los que se administra un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización con un agente antiinflamatorio, las dos entidades se administran lo suficientemente próximas en el tiempo de forma que el agente antiinflamatorio pueda inhibir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización. El agente antiinflamatorio se puede administrar antes, al mismo tiempo que o después del agente farmacológico, pero preferiblemente se administra antes. El momento preferido depende en parte de la farmacocinética y la farmacodinámica del agente antiinflamatorio. El agente antiinflamatorio se administra preferiblemente en un intervalo antes del agente farmacológico, de forma que el agente antiinflamatorio se aproxima a la concentración sérica máxima en el momento en el que se administra el agente farmacológico. En general, el agente antiinflamatorio se administra entre 6 horas antes del agente farmacológico y una hora después. Normalmente, el agente antiinflamatorio está presente a una concentración sérica detectable en cierto punto dentro del periodo de tiempo de una hora después de la administración del agente farmacológico. La farmacocinética de muchos agentes antiinflamatorios se conoce ampliamente, y el momento relativo de administración del agente antiinflamatorio se puede ajustar en consecuencia. El agente antiinflamatorio se administra normalmente de manera oral, intravenosa o tópica dependiendo del agente en cuestión. Si el agente antiinflamatorio se administra al mismo tiempo que el agente farmacológico, los dos se pueden administrar como una formulación combinada o por separado.

El agente antiinflamatorio se administra en un régimen de una cantidad, frecuencia y vía eficaces para inhibir una respuesta inflamatoria hacia un péptido de interiorización en condiciones en las que se sabe que se da tal respuesta inflamatoria en ausencia del agente antiinflamatorio. Una respuesta inflamatoria se inhibe si se da cualquier reducción de los signos o síntomas de inflamación como resultado del agente antiinflamatorio. Los síntomas de la respuesta inflamatoria pueden incluir enrojecimiento, calor, hinchazón, dolor, sensación de hormigueo, picor, náuseas, erupción cutánea, boca seca, insensibilidad, congestión de las vías respiratorias. La respuesta inflamatoria también se puede monitorizar midiendo signos tales como la tensión arterial o la frecuencia cardiaca. De manera alternativa, la respuesta inflamatoria se puede estudiar midiendo la concentración plasmática de histamina u otros compuestos liberados por la desgranulación de los mastocitos. Como cuestión práctica, las dosis, regímenes y vías de administración de la mayoría de los agentes antiinflamatorios discutidos anteriormente están disponibles en el vademécum y/o de los fabricantes, y tales antiinflamatorios se pueden usar en los presentes métodos de manera coherente con tal guía general.

IX. MÉTODOS DE TRATAMIENTO/PROFILAXIS

a) Métodos de tratamiento

Se administra un agente quimérico que comprende un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización en una cantidad, frecuencia y vía de administración eficaces para curar, reducir o inhibir el deterioro adicional de al menos un signo o síntoma de una enfermedad en un paciente que tiene la enfermedad a tratar. Una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de agente quimérico suficiente para curar, reducir o inhibir significativamente el deterioro adicional de al menos un signo o síntoma de la enfermedad o afección a tratar en una población de pacientes (o modelos animales) que padecen la enfermedad tratada con un agente quimérico de la invención respecto del daño en una población de control de pacientes (o modelos animales) que padecen esa enfermedad o afección que no se tratan con un agente quimérico de la invención. La cantidad también se considera terapéuticamente eficaz si un paciente individual tratado consigue un resultado más favorable que el resultado medio en una población de control de pacientes comparables no tratados mediante los métodos de la invención. Un régimen terapéuticamente eficaz implica la administración de una dosis terapéuticamente eficaz a una frecuencia y por una vía de administración necesaria para llevar a cabo el propósito deseado.

Para un paciente que padece ictus u otra afección isquémica, el agente quimérico se administra en un régimen que comprende una frecuencia de la cantidad y vía de administración eficaces para reducir los efectos dañinos del ictus u otra afección isquémica. Cuando la afección que requiere tratamiento es un ictus, el resultado se puede determinar mediante el volumen de infarto o el índice de discapacidad, y una dosis se considera terapéuticamente eficaz si un paciente individual tratado muestra una discapacidad de dos o menos en la escala de Rankin y 75 o más en la escala de Barthel, o si una población de pacientes tratados muestra una distribución significativamente mejorada (es decir, menos discapacidad) de puntuaciones en una escala de discapacidad que una población comparable sin tratar, véase Lees et at 1., N Engl J Med 2006;354:588-600. Una única dosis de agente quimérico normalmente es suficiente para el tratamiento del ictus.

b) Métodos de profilaxis

La presente descripción también proporciona métodos y composiciones para la profilaxis de un trastorno en un sujeto que corre el riesgo de tener ese trastorno. Normalmente, tal sujeto tiene una probabilidad incrementada de desarrollar el trastorno (p.ej., una afección, dolencia, trastorno o enfermedad) respecto de una población de control. La población de control, por ejemplo, puede comprender uno o más individuos seleccionados aleatoriamente de la población general (p.ej., coincidentes en edad, sexo, raza y/o etnia) a los que no se les ha diagnosticado o que no tienen antecedentes familiares del trastorno. Se puede considerar que un sujeto corre el riesgo de tener un trastorno si se descubre que un "factor de riesgo" asociado a ese trastorno está asociado a ese sujeto. Un factor de riesgo

puede incluir cualquier actividad, rasgo, suceso o propiedad asociada a un trastorno determinado, por ejemplo, por medio de estudios estadísticos o epidemiológicos en una población de sujetos. Un sujeto se puede clasificar así como en riesgo de un trastorno incluso si los estudios que identifican los factores de riesgo subyacentes no incluyeron de manera específica al sujeto. Por ejemplo, un sujeto que se somete a cirugía cardiaca tiene riesgo de ataque isquémico cerebral transitorio porque la frecuencia del ataque isquémico cerebral transitorio se incrementa en una población de sujetos que se han sometido a cirugía cardiaca en comparación con una población de sujetos que no se han sometido a ella.

Otros factores de riesgo habituales para el ictus incluyen la edad, antecedentes familiares, sexo, incidencia anterior de ictus, ataque isquémico transitorio o infarto de miocardio, tensión arterial elevada, tabaco, diabetes, arteriopatía de la carótida u otra arteriopatía, fibrilación auricular, otras cardiopatías tales como cardiopatía, insuficiencia cardiaca, cardiomiopatía dilatada, valvulopatía cardiaca y/o defectos cardiacos congénitos; colesterol sanguíneo elevado, y dietas elevadas en grasas saturadas, grasas trans o colesterol.

Los agentes farmacológicos unidos a un péptido de interiorización se administran a pacientes que corren el riesgo de tener una enfermedad, pero que todavía no tienen la enfermedad, en una cantidad, frecuencia y vía suficiente para prevenir, retrasar o inhibir el desarrollo de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. Una cantidad profilácticamente eficaz significa una cantidad de agente quimérico suficiente para prevenir, inhibir o retrasar significativamente al menos un signo o síntoma de la enfermedad en una población de pacientes (o modelos animales) que corren el riesgo de tener la enfermedad respecto de los tratados con el agente en comparación con una población de control de pacientes (o modelos animales) que corren el riesgo de tener la enfermedad que no se han tratado con un agente quimérico de la invención. La cantidad también se considera profilácticamente eficaz si un paciente individual tratado consigue un resultado más favorable que el resultado medio en una población de control de pacientes comparables no tratados mediante los métodos de la invención. Un régimen profilácticamente eficaz implica la administración de una dosis profilácticamente eficaz a una frecuencia y por una vía de administración necesaria para llevar a cabo el propósito deseado. Para la profilaxis del ictus en un paciente que corre un riesgo inminente de tener ictus (p.ej., un paciente que se somete a cirugía cardiaca), normalmente es suficiente una única dosis de agente quimérico.

X. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS, DOSIS, Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Los agentes quiméricos de la invención se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se fabrican en general en condiciones de GMP. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en una forma farmacéutica unitaria (es decir, la dosis para una única administración). Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar por medio de procesos de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Por ejemplo, se pueden usar los agentes quiméricos liofilizados de la invención en las formulaciones y composiciones descritas más adelante.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional mediante el uso de uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o agentes auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los agentes quiméricos hasta preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

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

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferiblemente estériles y sustancialmente isotónicas. Para inyección, los agentes quiméricos se pueden formular en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer, o solución salina fisiológica o tampón acetato (para reducir las molestias en el sitio de inyección). La disolución puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

De manera alternativa, los agentes quiméricos pueden estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, p.ej., agua estéril apirógena, antes del uso.

Para la administración transmucosa, se usan agentes penetrantes adecuados para la barrera a penetrar en la formulación. Esta vía de administración se puede usar para administrar los compuestos en la cavidad nasal o para la administración sublingual.

Para la administración oral, los agentes quiméricos se pueden formular con vehículos farmacéuticamente aceptables en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente a tratar. Para las formulaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen rellenos tales como carbohidratos, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcellulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada,

agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico. Si se desea, las formas farmacéuticas sólidas se pueden revestir con carbohidratos o con un revestimiento entérico mediante el uso de las técnicas habituales. Para las preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y disoluciones, los vehículos adecuados, excipientes o diluyentes incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes. Además, se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares.

Además de las formulaciones descritas previamente, los agentes quiméricos se pueden formular también en forma de una preparación de liberación lenta. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, de manera subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados poco solubles, por ejemplo, en forma de una sal poco soluble.

De manera alternativa, se pueden emplear otros sistemas de administración farmacéutica. Se pueden usar liposomas y emulsiones para administrar los agentes quiméricos. También se pueden emplear ciertos disolventes orgánicos tales como sulfóxido de dimetilo, aunque normalmente a costa de una toxicidad mayor. Además, los compuestos se pueden administrar mediante el uso de un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico.

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

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

Los agentes quiméricos que comprenden un péptido de interiorización unido a un agente farmacológico se pueden usar a la misma dosis o a una dosis inferior en una escala molar que el agente farmacológico solo, y se pueden administrar mediante la misma vía que el agente farmacológico solo, y para el tratamiento de la(s) misma(s) enfermedad(es) que el agente farmacológico solo.

Para el tratamiento del ictus, los intervalos de dosis preferidos incluyen 0,001 a 20 µmol de péptido quimérico o molécula peptidomimética por kg de peso corporal del paciente, opcionalmente 0,03 a 3 µmol de péptido quimérico por kg de peso corporal del paciente. En ciertos métodos, se administran 0,1-20 µmol de péptido quimérico o molécula peptidomimética por kg de peso corporal del paciente. En ciertos métodos, 0,1-10 µmol de péptido quimérico o molécula peptidomimética por kg de peso corporal del paciente, más preferiblemente alrededor de 0,3 µmol de péptido quimérico por kg de peso corporal del paciente. En otros casos, el intervalo de dosis es de 0,005 a 0,5 µmol de péptido quimérico o molécula peptidomimética por kg de peso corporal del paciente. La dosis por kg de peso corporal se puede convertir de ratas a seres humanos dividiendo por 6,2 para compensar las proporciones diferentes del área superficial respecto de la masa. Las dosis se pueden convertir de unidades de moles a gramos multiplicando por el peso molecular de un péptido quimérico o molécula peptidomimética. Las dosis adecuadas de péptidos quiméricos o moléculas peptidomiméticas para el uso en seres humanos pueden incluir 0,001 a 5 mg/kg de peso corporal del paciente, o más preferiblemente 0,005 a 1 mg/kg de peso corporal del paciente o 0,05 a 1 mg/kg, o 0,09 a 0,9 mg/kg. En peso absoluto para un paciente de 75 kg, estas dosis se traducen a 0,075-375 mg, 0,375 a 75 mg o 3,75 mg a 75 mg o 6,7 a 67 mg. Redondeada para abarcar las variaciones, p.ej., del peso del paciente, la dosis está normalmente dentro de 0,05 a 500 mg, preferiblemente 0,1 a 100 mg, 0,5 a 50 mg, o 1-20 mg.

La cantidad de agente quimérico administrado depende del sujeto a tratar, del peso del sujeto, la gravedad de la aflicción, la forma de administración y el criterio del médico que prescribe el tratamiento. La terapia se puede repetir de manera intermitente mientras los síntomas sean detectables o incluso cuando no son detectables. La terapia se puede proporcionar sola o en combinación con otros fármacos. Para el tratamiento del ictus, la dosis del agente farmacológico unido a un péptido de interiorización se administra normalmente dentro de 24 horas del inicio del ictus, preferiblemente dentro de 6 horas del inicio del ictus.

XI. EQUIPOS

Se proporcionan equipos para llevar a cabo los presentes métodos. Los equipos incluyen uno o más agentes farmacológicos de interés, unidos a un péptido de interiorización. El péptido de interiorización puede estar biotinilado, y/o el equipo puede contener un agente antiinflamatorio. El presente equipo contiene opcionalmente medios para administrar los agentes farmacológicos y/o el agente antiinflamatorio. El equipo puede incluir además uno o más tampones, aditivos, rellenos o diluyentes. El equipo puede proporcionar además una o más instrucciones impresas sobre la administración y el régimen de dosis a seguir.

XII. MÉTODOS DE CRIBADO

A. Medida de la Actividad de Interiorización

Las variantes del péptido tat o de otro péptido de interiorización se pueden ensayar por la actividad de transporte en un animal. Los péptidos de interiorización se pueden ensayar solos o cuando están unidos a un agente activo, tal como un péptido activo, p.ej., KLSSIESDV (SEQ ID Nº:5). El péptido de interiorización, opcionalmente unido a un agente activo, tal como un péptido, se marca, preferiblemente con un marcador fluorescente, tal como cloruro de dansilo. El péptido de interiorización se inyecta después de manera periférica en un animal, tal como un ratón. Es adecuada la inyección intraperitoneal o intravenosa, por ejemplo. Alrededor de una hora después de la inyección, los ratones se sacrifican, se perfunden con disolución fijadora (3% de paraformaldehído, 0,25% de glutaraldehído, 10% de sacarosa, 10 U/mL de heparina en solución salina). Después se extraen los cerebros, se congelan y se cortan. Se analiza la fluorescencia en los cortes mediante el uso de un microscopio confocal. La actividad de interiorización se determina a partir de la fluorescencia, opcionalmente respecto de controles positivos y negativos. Un control positivo adecuado es el péptido tat estándar unido al mismo péptido activo (si está presente) como péptido de interiorización a ensayar. Un control negativo adecuado es el péptido activo marcado de manera fluorescente sin unir a un péptido de interiorización. También se puede usar el vehículo sin marcar como control negativo.

Se pueden llevar a cabo experimentos similares en cultivo celular para ensayar variantes de tat o de otro péptido de interiorización (véase el documento US20030050243). Se aplica una variante del péptido tat marcada de manera fluorescente, opcionalmente unida a un péptido activo, a un cultivo neuronal cortical. La absorción se determina mediante el uso de microscopía de fluorescencia a lo largo de varios minutos después de la aplicación. Se puede determinar la absorción incrementada respecto de controles positivos y negativos como se describe para los experimentos de absorción en un animal.

2. Medida de la Actividad en el Tratamiento del Ictus

La actividad de los agentes quiméricos que comprenden un péptido de interiorización unido a un agente se puede ensayar en diversos modelos animales de ictus. En tal modelo, se somete a ratas macho Sprague-Dawley adultas a oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) transitoria durante 90 minutos mediante el método de sutura intraluminal (36,37). Se hace ayunar a los animales durante la noche y se les inyecta sulfato de atropina (0,5 mg/kg IP). Después de 10 minutos, se induce la anestesia. Se intuba a las ratas de manera oral, se ventilan mecánicamente, y se paralizan con bromuro de pancuronio (0,6 mg/kg IV). La temperatura corporal se mantiene a 36,5-37,5 °C con una lámpara de calentamiento. Se usan catéteres de polietileno en la arteria y vena femoral para registrar continuamente la tensión arterial y para tomar muestras de sangre para las medidas de gases y de pH. La MCAO transitoria se lleva a cabo durante 90 min introduciendo una sutura de nailon de monofilamento 3-0 revestido de poli-L-lisina (Harvard Apparatus) en el círculo de Willis por medio de la arteria carótida interna, lo que ocluye de manera eficaz la arteria cerebral media. Esto produce un infarto considerable que abarca la corteza cerebral y los ganglios basales. Los animales se tratan con un agente quimérico de ensayo o un control negativo o positivo. El tratamiento puede ser antes o hasta una hora después de inducir la isquemia. Un control negativo puede ser el vehículo. Un control positivo puede ser el péptido Tat-NR2B9c, YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº:6), que se ha demostrado previamente que es eficaz. El agente quimérico se administra mediante una única inyección rápida intravenosa 45 min antes de la MCAO (3 nmoles/g). Después de administrar los compuestos a los animales, se determina el volumen de infarto y/o el índice de discapacidad. Los volúmenes de infarto se determinan normalmente 24 hr tras el tratamiento, pero se pueden determinar en un momento posterior tal como 3, 7, 14 ó 60 días. El índice de discapacidad se puede monitorizar a lo largo del tiempo, p.ej., 2 hr tras el tratamiento, 24 hr tras el tratamiento, una semana y un mes tras el tratamiento. Los agentes quiméricos que muestran una reducción estadísticamente significativa del volumen de infarto y/o del índice de discapacidad respecto de los animales de control sin tratar con los compuestos se identifican por tener una actividad útil para poner en práctica los métodos de la invención.

Se pueden llevar a cabo experimentos similares en animales sometidos a isquemia permanente. La isquemia permanente del vaso de la piamadre de la arteria cerebral media se puede llevar a cabo como se describió en Forder et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 288:H1989-H1996 (2005). Brevemente, se introduce una cánula en la ACE derecha con un tubo de polietileno PE 10. El cráneo se expone por medio de una incisión en la línea media, y se hace una ventana craneal de 6 a 8 mm a lo largo de la corteza somatosensorial derecha (2 mm caudal y 5 mm lateral respecto a bregma). Las arterias de la piamadre se visualizan realizando inyecciones rápidas pequeñas (10-20 µL) del colorante vital azul violeta patente (10 mMol/L; Sigma) en solución salina normal, en la ACE. Las mismas tres ramas arteriolares de la ACM de la piamadre se cauterizan eléctricamente, y se repiten las inyecciones de colorante para asegurar la interrupción del flujo a través de las arteriolas cauterizadas. La incisión se cierra después y el animal se devuelve a su jaula y se le da acceso libre a alimento y agua. Este modelo de isquemia permanente produce un pequeño infarto muy reproducible limitado a la corteza por debajo de las arterias de la piamadre terminales coaguladas.

La arteria cerebral media izquierda se puede ocluir mediante el método de sutura intraluminal descrito por Longa, Stroke 20, 84-91 (1989). Brevemente, la arteria carótida común izquierda (ACC) se expone por medio de una incisión en el cuello en la línea media y se diseca sin nervios ni fascia circundantes, desde su bifurcación hasta la base del cráneo. Después se aíslan las ramas arteriales occipitales de la arteria carótida externa (ACE), y estas

ramas se disecan y coagulan. La ACE se diseca adicionalmente de manera distal y se coagula junto con las ramas arteriales lingual y maxilar terminales, que después se dividen. La arteria carótida interna (ACI) se aísla y se separa del nervio vago adyacente, y la arteria pterigopalatina se liga cerca de su origen. La punta de una sutura de nailon de monofilamento 3-0 de 4 cm de longitud (Harvard Apparatus) se redondea quemándola para conseguir un diámetro de punta de 0,33-0,36 mm y una longitud de punta de 0,5-0,6 mm, y se reviste con poli-L-lisina (*Belayev et al.*, 1996). La sutura se introduce a través de la ACC y se hace avanzar hacia la ACI y desde allí hacia el círculo de Willis (alrededor de 18-20 mm desde la bifurcación de la carótida), ocluyendo de manera eficaz la arteria cerebral media. La sutura de seda alrededor de la ACC se tensa alrededor de la sutura de nailon intraluminal para sujetarla y ocluir permanentemente la arteria cerebral media.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Impacto del Sexo sobre la Eficacia Neuroprotectora de Tat-NR2B9c

La eficacia neuroprotectora de Tat-NR2B9c se estudió en ratas macho y hembra mediante el uso del modelo de ictus de oclusión de 3 vasos de la piamadre (P3VO) in vivo (Forder JP, Munzenmaier DH, Greene AS. Angiogenic protection from focal ischemia with angiotensin II type 1 receptor blockade in the rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol, abril de 2005;288(4):H1989-H1996).

MÉTODOS

Animales

Se hizo ayunar a ratas Sprague Dawley adultas (10-12 semanas de edad) (machos ~ 300 g, hembras ~ 250 g) durante 12-18 horas antes de someterlas a oclusión permanente de vasos de la piamadre de 3 ramas terminales de la Arteria Cerebral Media sobre la corteza de barriles de los bigotes (P3VO). Tat-NR2B9c se ensayó en ratas macho más un grupo de control con solución salina (n=8 en cada grupo). Tat-NR2b9c y un control de solución salina se ensayó en ratas hembra (n=8 en cada grupo). El grupo de tratamiento se sometió a enmascaramiento para el investigador durante la cirugía hasta el análisis del tamaño de infarto.

Procedimiento General

Las ratas se anestesiaron con una inyección intramuscular de 0,5 ml/kg de ketamina (100 mg/kg), acepromazina (2 mg/kg), y xilazina (5 mg/kg), complementada con un tercio de la dosis inicial según fuera necesario. Se insertó una sonda de temperatura anal y el animal se colocó sobre una almohadilla de calentamiento mantenida a 37 ºC. Se insertó una cánula en la arteria carótida externa (ACE) derecha con un tubo de polietileno PE 10 para las inyecciones de colorante. El cráneo se expuso por medio de una incisión en la línea media, se retiró el tejido, y el músculo temporal se desconectó del cráneo en el lado derecho. Mediante el uso de un microscopio de disección y un taladro dental neumático, se hizo una ventana craneal de 6x4 mm sobre la corteza somatosensorial derecha (2 mm caudal y 5 mm lateral respecto a bregma) taladrando un rectángulo a través del cráneo y levantando el fragmento de cráneo a la vez que se mantenía intacta la duramadre. Después de bañarlo con líquido cefalorraquídeo artificial, se realizaron pequeñas inyecciones rápidas (10 a 20 µL) del colorante vital azul violeta patente (10 mmol/L; Sigma) en solución salina normal, en la arteria carótida externa derecha para demostrar el tránsito a través de los vasos superficiales de la corteza. Se seleccionaron tres ramas arteriolares críticas de la ACM alrededor de la corteza de barriles y se cauterizaron eléctricamente a través de la duramadre. Tras las cauterizaciones, las inyecciones rápidas y los tránsitos del colorante se repitieron para asegurar que se bloquearon los tránsitos a través de las arteriolas cauterizadas. El rectángulo del cráneo se sustituyó sobre la ventana y se suturó el cuero cabelludo. El catéter se retiró de la ACE, se ligó la ACE, y se suturó el cuello anterior. Una hora tras el inicio de la oclusión focal, se infundieron 0,3 ml de fármaco (3 nMol/g de peso corporal) o control de solución salina a través de la vena de la cola a una velocidad de 0,06 ml/min. Cada rata se devolvió a su jaula individual con una lámpara de calentamiento para mantener la temperatura corporal hasta que la rata se recuperó completamente. Se suministró alimento y agua a voluntad.

Recogida del Tejido Cerebral y Análisis del Tamaño de Infarto

Veinticuatro horas tras la cirugía, se volvió a anestesiar a los animales con 1 mL de pentobarbital y se recogió rápidamente el cerebro. Se tomó un corte frontal a través de la región del infarto y se incubó en un 2% de cloruro de trifeniltetrazolio (CTT) durante 15 minutos a 37 ºC. Las imágenes se escanearon y los cortes cerebrales se almacenaron a -80 °C. El tamaño del infarto se midió como un porcentaje del hemisferio para cada rata del estudio. Tras obtener las medidas del tamaño del infarto, los animales se separaron en sus respectivos grupos. Se realizaron comparaciones entre los grupos de tratamiento como las medias±EE.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El modelo de ictus P3VO en rata da como resultado un infarto intenso y reproducible en ratas SD macho y hembra. El péptido Tat-NR2B9c es neuroprotector en ratas macho y hembra, como se observa en un tamaño de infarto

significativamente disminuido 24 horas después de someterlas a cirugía P3VO (Figura 1). El tratamiento con Tat-NR2B9c (3 nM/g) 1 h después del ictus redujo drásticamente los infartos en los animales de ambos sexos (Figura 1). Esta respuesta neuroprotectora pareció ser más pronunciada en las hembras que en los machos, como se observa por una ausencia completa de infarto en las ratas hembra tratadas con la concentración equivalente de Tat-NR2B9c. Sin embargo, los controles tratados con solución salina indican que el tamaño medio del infarto en las ratas hembra es más pequeño (71%) que en las ratas macho.

EJEMPLO 2

Los Péptidos que Contienen la Secuencia Tat Inducen la Desgranulación de Mastocitos con Liberación de Histamina In Vitro

MÉTODOS

Cultivo celular

Se esterilizaron ratones C57 con etanol del 70%, y el fémur se disecó de la piel y del tejido conectivo. Se recogieron las células de la médula ósea y se resuspendieron en OPTI-MEM (Gibco) que contenía un 5% de FBS termoinactivado, 6% de medio acondicionado con WEHI (como fuente de IL-3), y 2-mercaptoetanol 55 µM. Las células se cultivaron a aproximadamente $1x10^6$ células/mL. Después de 2 días, se recogieron las células y se centrifugaron, y el sedimento se colocó en una placa nueva con medio nuevo. Se añadió medio acondicionado con WEHI nuevo cada semana. Las células se cultivaron durante alrededor de 4 semanas, tras lo cual fueron >95% de mastocitos, y se usaron para el ensayo de desgranulación de mastocitos.

Ensayo de desgranulación de mastocitos

Se determinó la actividad de triptasa mediante el uso del Equipo de Ensayo de Desgranulación de Mastocitos (CHEMICON, Temecula, CA). Tras el aislamiento, las células se lavaron y se resuspendieron hasta aproximadamente $1x10^6$ células/mL en Tampón de Ensayo 1X. Para el tratamiento con TAT-NR2B9C u otros péptidos, se añadieron 50 µL de disolución de las concentraciones siguientes: 0,125 mg/mL, 1,25 mg/mL, 12,5 mg/mL, o 125 mg/mL a la suspensión celular, y se usó A23187 500 nM (Calcimicina), un inductor conocido de la liberación de triptasa en mastocitos, como control positivo. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO_2 durante 60 minutos. La suspensión celular se centrifugó a 700 x g y el sobrenadante se recogió con cuidado. Se preparó una mezcla de ensayo (proporcionada en el equipo) en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La reacción colorimétrica se inició añadiendo 20 µL del Sustrato de Triptasa a cada pocillo experimental y de control. Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Se leyó la densidad óptica a 405 nm en un lector de microplacas.

Se usaron los tratamientos siguientes para inducir la desgranulación de mastocitos.

1) Control negativo (tampón de ensayo desprovisto de péptidos)

2) Control Positivo (el ionóforo de calcio A23187)

3) Tat-NR2B9C

4) La secuencia derivada de Tat de T-NR2B9C desprovista de la secuencia de unión a PSD-95

5) NR2B9c que comprende la secuencia de unión a PSD-95 de TAT-NR2B9C pero desprovista de la secuencia Tat, y

6) AA (un péptido de 20 aminoácidos compuesto de la secuencia Tat fusionada a los 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B de NMDA, pero con 2 mutaciones de aminoácidos que la hacen incapaz de unirse a PSD-95).

Todos los péptidos se aplicaron a una concentración de 125 mg/mL para aproximarse a las concentraciones séricas máximas alcanzadas en perros que recibieron una dosis de 10 mg/kg de Tat-NR2B9C en algunos de los experimentos con animales descritos más adelante (basados en suponer un volumen sanguíneo del 8% del peso corporal total).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Como se observa a partir de la Figura 2, todos los péptidos que contenían el dominio de transducción Tat provocaron la desgranulación de los mastocitos, mientras el péptido NR2B9c, desprovisto de la secuencia Tat, no lo hizo. Los ensayos de desgranulación de mastocitos *in vitro* se llevaron a cabo en ausencia de anticuerpos y, por lo tanto, la desgranulación de mastocitos no se pudo deber a un fenómeno inmunitario. En particular, mediante el uso de RT-PCR y transferencia de Western, se investigó si los mastocitos contuvieron proteína PSD-95, el objetivo terapéutico de Tat-NR2B9c. No se pudo detectar PSD-95 en estas células (resultados no mostrados), lo que

proporcionó pruebas adicionales sobre la baja probabilidad de que la desgranulación de los mastocitos estuviera provocada por una interacción de TAT-NR2B9c con PSD-95.

En un experimento adicional, se determinó que el grado de desgranulación de mastocitos mediante Tat-NR2B9c y mediante el péptido AA dependió de la dosis. De manera específica, las concentraciones crecientes de Tat-NR2B9c provocaron una desgranulación de mastocitos incrementada como se muestra en la Figura 3.

En experimentos adicionales, se investigó el efecto de la variación de la secuencia en Tat-NR2B9c sobre la desgranulación de mastocitos. Mediante el uso del mismo ensayo, se ensayaron los siguientes compuestos (todos a 50 µM):

Tabla 5

ID del Péptido	Nombre del Péptido (concentración)	Secuencia/Estructura
	control	(Sin péptido)
	IC (500 nM)	Ionóforo de Calcio
	Tat-NR2B9c (125 mg/ml)	YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº:6)
1990	TAT (125 mg/ml)	YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº:2)
1991	2B9c (125 mg/ml)	KLSSIESDV (SEQ ID Nº:5)
1992	AA (125 mg/ml)	YGRKKRRQRRRKLSSIEADA (SEQ ID Nº:7)
1993	F-Tat-NR2B9c (125 mg/ml)	FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº:8)
1994	Tat-NR2B9c K>A (125 mg/m)	YGRKKRRQRRRALSSIESDV (SEQ ID Nº:9)
1995	F-Tat-NR2B9c K>A (125 mg/m)	FGRKKRRQRRRALSSIESDV (SEQ ID Nº:10)
1992	AA (12,5 mg/ml)	YGRKKRRQRRRKLSSIEADA (SEQ ID Nº:7)

Como se puede observar en la Figura 4, todos los compuestos que contienen la secuencia Tat y la secuencia del péptido Tat provocaron la desgranulación de los mastocitos, mientras NR2B9c solo no provocó esta reacción.

EJEMPLO 3

Los Conjugados de Péptidos que Contienen la Secuencia Tat no Inducen la Desgranulación de Mastocitos In Vitro

El efecto de ciertas modificaciones, tales como la conjugación a péptidos que contienen Tat, sobre la desgranulación de mastocitos se estudió mediante el uso de los métodos descritos en el Ejemplo 2. Los péptidos modificados incluyeron Tat-NR12B9c, el isómero D de Tat-NR2B9c (denominado D-Tat-NR2B9c), un Tat-NR2B9c conjugado a biotina, un AMP-KLSSIESDV conjugado a biotina (SEQ ID Nº:5). Como se muestra en la Figura 5, los péptidos Tat o AMP conjugados a biotina no indujeron la desgranulación de mastocitos.

EJEMPLO 4

Tat-NR2B9c Provoca Niveles Incrementados de Histamina y una Respuesta a Histamina en Animales

Estudios en Perros Beagle

Se llevó a cabo un estudio GLP de toxicidad intravenosa de 14 días en perros Beagle sin experimentación previa (3/sexo/grupo) (Estudio CRM Nº 501448) en el que los animales recibieron inyecciones diarias de 0, 0,25, 1,0, o 10 mg/kg de Tat-NR2B9c. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 1 mL) de todos los animales en los Días 1, 6 y 12 antes de la dosis, 5 y 15 minutos tras la inyección. Las muestras de sangre se recogieron mediante venopunción (yugular, safena y cefálica) en tubos que contenían EDTA. Las muestras se centrifugaron después (en 30 minutos desde la recogida) en una centrífuga refrigerada (aprox. 4 °C) a 2700 rpm durante 10 minutos. El plasma se separó en un segundo tubo con la etiqueta adecuada, y se almacenó a -80 °C hasta el análisis en CRM. Se usaron las muestras de plasma para investigar los niveles de histamina. Las muestras de los animales a los que se administró de manera intravenosa una dosis de Tat-NR2B9c se analizaron mediante el uso de un método validado.

Todos los animales a los que se administraron 10 mg/kg de Tat-NR2B9c exhibieron signos clínicos relacionados con el tratamiento, que consistieron en un enrojecimiento del hocico, encías (que también se observó que estuvieron pálidas), orejas, región periorbital y extremidades, y a menudo estuvieron asociadas a hinchazón. Estos efectos estuvieron asociados a letargia y un pulso no palpable, caracterizados como una reacción hipotensiva grave por el veterinario adjunto. Estos efectos se observaron diariamente, comenzando el primer día de dosificación y persistiendo a lo largo del periodo de dosificación de 14 días, sin una adaptación aparente de los animales. Estos

efectos no se debieron al desarrollo de una respuesta inmunitaria basada en anticuerpos, ya que estos animales no se expusieron a Tat-NR2B9c el primer día de dosificación, y no se observó una gravedad incrementada de la respuesta a lo largo de los 14 días de tratamiento. De manera específica, se observaron niveles incrementados de histamina inmediatamente tras la primera administración de Tat-NR2B9c a estos perros Beagle sin experimentación previa (véase la Tabla 6 para un resumen de los niveles plasmáticos de histamina en los perros). Estos animales nunca se habían expuesto a Tat-NR2B9c, y así no debería haber células T de memoria o anticuerpos circulantes contra Tat-NR2B9c. Además, no se observó un incremento coherente de los niveles de histamina durante el estudio de toxicidad de dosis repetidas de 14 días a ningún nivel de dosis, lo que indica que no hay una expansión de una respuesta específica a antígenos. Así, los incrementos observados de los niveles de histamina debidos a Tat-NR2B9c son el resultado de la desgranulación directa de los mastocitos, en vez de una respuesta de anticuerpos específicos de un antígeno.

Tabla 6

Determinación de Histamina en Plasma de Perro mediante Inmunoensayo Enzimático

DÍA 12 Hembras

ID del Ensayo	Fecha	ID del Animal	Momento	Muestra Hemolizada	Factor de Dilución	**Resultado Final (ng/mL)**
HIS-16	12-Feb-06	151	Pre		1	**<LLOQ**
HIS-18	3-Mar-06		5 min		1	**0.204**
			15 min		1	**0.201**
HIS-10	2-Feb-06	152	Pre		1	**<LLOQ**
			5 min		1	**0.234**
			15 min		1	**0.398**
HIS-10	2-Feb-06	153	Pre		1	**0.187**
			5 min	h	1	**0.546**
			15 min		1	**0.513**
HIS-10	2-Feb-06	154	Pre		1	**0.184**
			5 min		1	**0.392**
			15 min		1	**0.207**
HIS-10	2-Feb-06	155	Pre		1	**<LLOQ**
			5 min		1	**0.609**
			15 min		1	**3.339**
HIS-10	2-Feb-06	156	Pre		1	**<LLOQ**
			5 min		1	**0.190**
			15 min		1	**<LLOQ**
HIS-10	2-Feb-06	251	Pre		1	**<LLOQ**
HIS-16	12-Feb-06		5 min		1	**<LLOQ**
			15 min		1	**0.273**
HIS-10	2-Feb-06	252	Pre		1	**<LLOQ**
HIS-11	3-Feb-06		5 min		1	**0.252**
			15 min		1	**0.193**
HIS-11	3-Feb-06	253	Pre		1	**<LLOQ**
			5 min		1	**0.213**
			15 min		1	**0.293**

ID del Ensayo	Fecha	ID del Animal	Momento	Muestra Hemolizada	Factor de Dilución	**Resultado Final (ng/mL)**
			5 min	h	1	**0.912**
			15 min		1	**0.196**
HIS-11	3-Feb-06	353	Pre		1	**0.385**
			5 min	h	1	**0.282**
			15 min		1	**0.446**
HIS-12	6-Feb-06	451	Pre		1	**<LLOQ**
			5 min	h	3	**1.642**
HIS-17	3-Mar-06		15 min		1	**<LLOQ**
HIS-12	6-Feb-06	452	Pre		1	**0.188**
			5 min	h	3	**6.154**
			15 min	h	3	**0.565**
HIS-12	6-Feb-06	453	Pre	h	1	**0.302**
			5 min		3	**13.937**
HIS-17	3-Mar-06		15 min	h	1	**0.587**
HIS-12	6-Feb-06	454	Pre		1	**<LLOQ**
HIS-17	3-Mar-06		5 min		1	**0.504**
			15 min		1	**0.312**
HIS-12	6-Feb-06	455	Pre	h	1	**<LLOQ**
			5 min	h	3	**2.335**
HIS-17	3-Mar-06		15 min		1	**0.312**
HIS-18	3-Mar-06	456	Pre		1	**0.351**
			5 min	h	1	**0.485**
HIS-16	12-Feb-06		15 min		1	**0.330**

LLOQ = 0.180 ng/mL
h = la muestra estuvo hemolizada

Efectos Cardiovasculares de Tat-NR2B9c Indicativos de la Liberación de Histamina en Perros

En un estudio de telemetría cardiovascular GLP en perros Beagle conscientes sin inmovilizar (Estudio CRM Nº 691106), se administraron a 6 animales (3 machos, 3 hembras) dosis crecientes de Tat-NR2B9c (0,25, 1,0, o 5,0 mg/kg de péptido bruto), con un periodo de reposo farmacológico de 3 días entre los niveles de dosis. No se observaron efectos sobre la tensión arterial a 0,25 ó 1,0 mg/kg. Se observó una caída transitoria de la tensión arterial en 4 de 6 perros a 5 mg/kg, que duró aproximadamente 30 minutos. El hallazgo de que la caída de la tensión arterial puede haber estado relacionada con la dosis indica que la caída no se debió a una respuesta inmunitaria alérgica (mediada por anticuerpos). Además, el periodo de tiempo entre la dosis baja (0,25 mg/kg) y la dosis elevada (5,0 mg/kg) fue de alrededor de 6 días, es decir, de duración insuficiente para permitir la generación de una respuesta inmunitaria. El efecto está provocado, por tanto, por una desgranulación directa de los mastocitos que provoca la liberación de histamina.

Para obtener una información cardiovascular detallada al nivel de dosis más elevado ensayado en el estudio de toxicidad de dosis repetidas en perros de 14 días (es decir, 10 mg/kg), se llevó a cabo un estudio GLP de telemetría cardiovascular adicional en perros Beagle conscientes sin inmovilizar (Estudio CRM Nº 691429). Seis animales (3 machos, 3 hembras) recibieron vehículo por la mañana y 10 mg/kg de Tat-NR2B9c por la tarde del mismo día (al menos 4 horas entre dosis). Los incrementos de la frecuencia cardiaca se observaron durante hasta 15 minutos tras la dosis en los animales tratados, y el efecto máximo se observó a los 10 minutos en machos y hembras. Se observaron disminuciones de los valores de tensión arterial (hasta un 62%) en animales individuales de 5 a 10 minutos tras la dosis. Los animales hembra usados en este estudio cardiovascular adicional se obtuvieron de la colonia de Charles River, y fueron animales con experimentación previa, que se habían usado previamente en el

primer estudio cardiovascular de Tat-NR2B9c (Estudio CRM Nº 691106). Los efectos observados a 10 mg/kg en el Estudio CRM Nº 691429 fueron comparables a los signos clínicos observados en el estudio de toxicidad en perros de 14 días (Estudio CRM Nº 501448), con efectos más graves sobre la tensión arterial observados para los animales tratados que los observados al nivel de dosis más alta (5 mg/kg) ensayado en el Estudio CRM Nº 691106. Estos resultados indican de nuevo una desgranulación directa de los mastocitos.

Se llevaron a cabo estudios no GLP de los efectos de Tat-NR2B9c sobre la tensión arterial en ratas anestesiadas que recibieron 50 mg/kg de Tat-NR2B9c. Esta dosis se seleccionó para la rata, ya que se produjo un volumen corriente, frecuencia respiratoria y volumen por minuto derivado disminuidos. En un experimento, 5 ratas macho Sprague-Dawley recibieron una dosis en inyección rápida de 50 mg/kg de Tat-NR2B9c durante 3 minutos. La tensión arterial se monitorizó por medio de un catéter en la arteria femoral.

Todos los animales experimentaron reducciones transitorias de la tensión arterial media como se muestra en la Figura 6. Otro experimento, en el que se ensayaron 6 animales de forma similar, mostró resultados similares. Como se discutió anteriormente en el caso de los perros, estas reacciones en ratas se observaron también en los animales sin experimentación previa que no tuvieron ninguna oportunidad anterior de desarrollar una respuesta inmunitaria a Tat-NR2B9c. Estos datos proporcionan pruebas en una segunda especie de la desgranulación de mastocitos por péptidos que contienen la secuencia Tat.

Reacciones Inflamatorias Indicativas de la Liberación de Histamina en Perros

Se llevó a cabo un estudio no GLP para examinar un intervalo de dosis para Tat-NR2B9c, administrado a perros Beagle mediante una única inyección intravenosa lenta. Se administraron de manera intravenosa dosis de Tat-NR2B9c a dos animales (un perro Beagle macho y una hembra) en siete ocasiones. Hubo un periodo de reposo farmacológico de 3 - 4 días entre las dosis. La primera dosis se administró a 2,5 mg/kg. Debido a que los animales no mostraron ningún signo de toxicidad, la segunda dosis se administró a 7,5 mg/kg. El animal macho exhibió un edema angioneurótico del tejido blando de la cabeza y un tipo de reacción de urticaria, especialmente en la cara ventral del abdomen. No hubo reacción en el perro hembra. Los signos vitales (frecuencia cardiaca, tensión arterial, frecuencia respiratoria y temperatura corporal) permanecieron dentro de los intervalos fisiológicos normales en ambos animales. La tercera dosis se administró a 12,5 mg/kg. Después de la dosificación, se observó el edema angioneurótico y la urticaria en ambos animales. Se valoró que la reacción en el perro macho fue moderada, y en el animal hembra, la reacción fue leve. La siguiente dosis se administró a 20,0 mg/kg. Después de la dosificación, el animal macho entró en choque, y la tensión arterial (TA) y el pulso fueron indetectables. El animal se trató con administración i.v. de benadrilo y dexametasona. La TA registrada a los 5 minutos tras la dosificación fue 37/13 mm de Hg (TA normal en un perro es ~ 160/90). Se tomó la decisión de no administrar la dosis al animal hembra.

Las siguientes dosis se administraron para entender mejor el tipo de reacciones observadas en las dosis precedentes. La quinta y sexta dosis se ajustaron a 2,5 y 5,0 mg/kg. A 2,5 mg/kg, con la excepción del enrojecimiento del oído y la cara del perro macho, no se observaron otras reacciones adversas en ningún perro. A 5,0 mg/kg, se observó una reacción moderada en el animal macho, mientras no hubo reacción en el perro hembra.

Se concluyó que Tat-NR2B9c a dosis elevadas es capaz de inducir una hipotensión transitoria profunda y reacciones cutáneas similares a urticaria. Estas reacciones parecieron depender de la dosis, y el animal macho pareció ser más sensible al artículo de ensayo que el animal hembra.

EJEMPLO 5

El Tratamiento con Antihistamínico Previene los Síntomas Inducidos por Tat-NR2B9c en Perros

A los dos animales del Ejemplo 4 se les administraron a continuación 12,5 mg/kg de Tat-NR2B9c después de un pre-tratamiento con benadrilo a 1 mg/kg administrado 30 minutos antes de Tat-NR2B9c. Hubo un enrojecimiento ligero de la piel interna de los oídos en el animal macho. El animal macho también vomitó ~ 15 - 20 minutos después de la administración de Tat-NR2B9c. No se observó reacción en el perro hembra. Por lo tanto, el pretratamiento con el fármaco antihistamínico benadrilo previno el edema angioneurótico y las reacciones de urticaria que se observaron anteriormente en ambos animales al mismo nivel de dosis de Tat-NR2B9c. Los resultados indican que los antihistamínicos tales como benadrilo, y los corticosteroides tales como dexametasona, tratan de manera eficaz las consecuencias adversas de la desgranulación de mastocitos.

En conjunto, estos resultados proporcionan una prueba experimental directa de que la administración de Tat-NR2B9c provoca una elevación de los niveles de histamina en sangre en los animales experimentales, que los niveles de histamina incrementados se deben a la desgranulación de los mastocitos, y que el tratamiento de esta respuesta con medicaciones de antihistamínicos y con corticosteroides puede constituir un medio eficaz mediante el cual administrar Tat-NR2B9c y otros compuestos que contienen dominios de translocación de proteínas tales como Tat.

EJEMPLO 6

Pruebas Directas de que Tat-NR2B9c Provoca Elevaciones de Histamina en Sangre en Seres Humanos

MÉTODOS

Se llevó a cabo un Estudio de Seguridad, Tolerabilidad y Farmacocinética de Tat-NR2B9c en seres humanos. Los sujetos fueron hombres normales, sanos, no fumadores o mujeres posmenopáusicas o quirúrgicamente estériles con una edad mínima de 18 años. A los sujetos se les administró Tat-NR2B9c, nº de Lote: 124-134-001B, o se les administró placebo (solución salina tamponada con fosfato), nº de Lote: 124-134-001A, administrado como una infusión intravenosa (10±1 minutos). Se administraron dosis a cuatro sujetos en cada una de las Cohortes 1 a 3, y se administraron dosis a 10 sujetos en cada una de las Cohortes 4 a 8. Los 62 sujetos completaron el estudio. Los periodos de tratamiento para cada cohorte fueron como sigue: Cohorte 1: 14 de septiembre de 2006; Cohorte 2: 26 de septiembre de 2006; Cohorte 3: 6 de octubre de 2006; Cohorte 4: 20 de octubre de 2006; Cohorte 5: 6 de noviembre de 2006; Cohorte 6: 4 de diciembre de 2006; Cohorte 7: 17 de diciembre de 2006; Cohorte 8: 25 de febrero de 2007.

Momentos de la Extracción de Sangre:

Durante el periodo de estudio, se recogieron 11 muestras de sangre para el análisis farmacocinético de cada sujeto en los siguientes momentos: 0,00 (pre-dosis), 0,08 (5 minutos), 0,17 a 0,25 (10 a 15 minutos, exactamente al final de cada infusión de fármaco individual), 0,33 (20 minutos), 0,50, 0,75, 1,00, 2,00, 6,00, 12,00, y 24,00 horas tras la dosis. Además, se recogieron 8 muestras de sangre para el análisis de histamina de cada sujeto en los siguientes momentos: 0,00 (pre-dosis), y a 0,08 (5 minutos), 0,17 (10 minutos), 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, y 24,00 horas tras la dosis.

Determinación de la seguridad:

La determinación de la seguridad se llevó a cabo en todos los sujetos que recibieron al menos 1 dosis durante el desarrollo del estudio. Los incidentes de todos los eventos adversos (EAs) se tabularon por tratamiento y número de sujeto. También se documentaron los valores absolutos para los signos vitales, los parámetros del electrocardiograma (ECG), los parámetros de laboratorio y los exámenes físicos, y se marcaron los valores fuera del intervalo normal. Se tabularon los desplazamientos de los valores del valor inicial. Los EAs se documentaron mediante el uso de los términos del Diccionario Médico y de Investigación para Actividades Regulatorias (MedDRA).

RESULTADOS

Parte 1: Efectos de Tat-NR2B9c sobre los Niveles de Histamina en Sangre:

Se ilustra un resumen de los resultados anormales de histamina por dosis en la Tabla 7. Siete de 8 sujetos en el grupo de dosis de 3,75 mg/kg tuvieron niveles de histamina mayores de 10 nmol/L (media 24,3 nmol/L; máximo de 39,8 nmol/L) 10 minutos después del inicio de la administración de NA 1, y 3 de los sujetos todavía tuvieron niveles de histamina mayores de 10 nmol/L (media 15,3 nmol/L; máximo de 20,3 nmol/L) 15 minutos después del inicio de la administración de NA 1.

Aparte del grupo de dosis de 3,75 mg/kg, ningún grupo de tratamiento tuvo niveles anormales significativos de histamina. El grupo de placebo y el grupo de dosis de 0,375 mg/kg tuvieron cada uno 1 sujeto que tuvo un nivel elevado de histamina en 1 punto de tiempo, pero estos resultados fueron en el cribado y a las 2,00 horas tras la dosis, respectivamente. Todos los resultados anormales de histamina volvieron al intervalo normal en 24,00 horas desde la administración del fármaco.

Tabla 7: Número de Sujetos con Niveles de Histamina >10 nmol/L por Grupo de Tratamiento

Día	Tiempo (hr)	Número de Sujetos								
		Placebo (n=16)	Dosis de NA-1 (mg/kg)							
			0,02 (n=2)	0,08 (n=2)	0,20 (n=2)	0,375 (n=8)	0,75 (n=8)	1,50 (n=8)	2,60 (n=8)	3,75 (n=8)
Cribado	N/AP	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	7
	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	1,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,00	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	24,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	N/AP	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	N/AP	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28 Final del estudio	N/AP	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Parte 11: Datos de Seguridad

Cuarenta sujetos que participaron en el estudio experimentaron un total de 168 efectos adversos (EAs) durante el estudio. La mayoría de EAs fueron de gravedad leve. Treinta y cuatro de 46 sujetos en tratamiento activo (73,9%) experimentaron al menos 1 EA, mientras 6 de 16 sujetos en tratamiento con placebo (37,5%) experimentaron al menos 1 EA. Los sujetos en los grupos de dosis de 2,60 y 3,75 mg/kg experimentaron significativamente más EAs que los sujetos en los grupos de dosis inferiores. No se informaron Eventos Adversos Graves (EAGs). Los EAs más habituales experimentados por los sujetos que recibieron Tat-NR2B9c fueron sensación de calor (13/46; 28,3%), prurito (12/46; 26,1%), rubor (10/46; 21,7%), y boca seca (9/46; 19,6%). Todos los EAs se resolvieron con la excepción de 2 casos de glucemia incrementada, ya que se perdió el contacto con los sujetos para su seguimiento.

La incidencia de EAs en los grupos de dosis de 2,60 y 3,75 mg/kg fue mayor que la tasa de incidencia de EAs en los grupos de dosis de placebo, 0,02, 0,08, 0,20, 0,375, 0,75 y 1,50 mg/kg. A dosis de Tat-NR2B9c ≥2,60 mg/kg, se informaron con frecuencia varios EAs. Estos incluyeron: (1) disminuciones de la tensión arterial, (2) sensación de hormigueo (parestesia), (3) insensibilidad (hipoestesia), (4) enrojecimiento (eritema), (5) erupción cutánea, (6) picor (prurito), (7) boca seca, (8) náuseas, (9) sensación de calor, y (10) rubor. El inicio de estos EAs coincidió con la administración del fármaco de estudio y estuvo relacionado probablemente con el fármaco de estudio.

En los ensayos preclínicos con Tat-NR2B9c, se observaron niveles elevados de histamina en los grupos de dosis elevadas, y probablemente fueron el origen de efectos secundarios que incluyeron hinchazón, enrojecimiento e hipotensión. En el estudio actual, los niveles de histamina estuvieron elevados en 7 de los 8 sujetos del grupo de dosis más alta (3,75 mg/kg) 10 minutos tras el inicio de la administración intravenosa del fármaco, y permanecieron elevados en 3 de estos sujetos 15 minutos tras la administración del fármaco, tras cuyo tiempo los niveles volvieron al intervalo normal. Durante el mismo periodo de tiempo en el que los niveles de histamina estuvieron elevados, se observaron la mayoría de los EAs en el grupo de dosis de 3,75 mg/kg. Esto sugiere que los niveles elevados de histamina fueron el origen de los EAs informados con más frecuencia (que incluyen una tensión arterial disminuida, hormigueo, insensibilidad, enrojecimiento, erupción cutánea, picor, boca seca, náuseas, sensación de calor, y rubor).

La mayoría de los EAs enumerados también se observaron en ensayos con animales preclínicos en los que la Dosis Tolerada Máxima (DTM) se estableció en 12,5 y 100 mg/kg para perros y ratas, respectivamente. No se observaron la mayoría de los EAs en los grupos de dosis de 2,60 y 3,75 mg/kg, o se observaron en solamente 1 sujeto en los grupos de dosis entre 0,02 y 1,50 mg/kg. Esto sugiere que los EAs que se observaron a dosis mayores de Tat-NR2B9c fueron mínimos o inexistentes en este intervalo de dosis inferior.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NoNO, Inc.
Arbor Vita Corporation
Tymianski, Michael
Garman, Jonathan D

<120> COADMINISTRACIÓN DE UN AGENTE UNIDO A UN PÉPTIDO DE INTERIORIZACIÓN CON UN ANTIINFLAMATORIO

<130> 026373-000910US

<150> US 60/992.678
<151> 05-12-2007

<160> 67

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 1

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

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

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 3

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

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 4

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

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Agente farmacológico sintético

<400> 5

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val
1 5

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido Tat-NR2B9c sintético

<400> 6

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido Tat-NR2B9c sintético con 2 mutaciones puntuales en el dominio de unión a PSD-95

<400> 7

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ala Asp Ala
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido F-Tat-NR2B9c sintético

<400> 8

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

Glu Ser Asp Val
20

<210> 9

<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido Tat-NR2B9c K>A sintético

<400> 9

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido F-Tat-NR2B9c K>A sintético

<400> 10

Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética de NMDAR2B

<400> 11

Phe Asn Gly Ser Ser Asn Gly His Val Tyr Glu Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Motivo PL sintético de NMDAR2B

<400> 12

Glu Ser Asp Val
1

<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética de NMDAR1, NMDAR1-1, NMDAR1-4, NMDAR1-3b, NMDAR1-4b

<400> 13

His Pro Thr Asp Ile Thr Gly Pro Leu Asn Leu Ser Asp Pro Ser Val
1 5 10 15

Ser Thr Val Val
20

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética de NMDAR1-2, NMDAR1-3

<400> 14

Arg Arg Ala Ile Glu Arg Glu Glu Gly Gln Leu Gln Leu Cys Ser Arg
1 5 10 15
His Arg Glu Ser
20

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética de NMDAR2C

<400> 15

Thr Gln Gly Phe Pro Gly Pro Cys Thr Trp Arg Arg Ile Ser Ser Leu
1 5 10 15

Glu Ser Glu Val
20

<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética de NMDAR3A

<400> 16

Ala Val Ser Arg Lys Thr Glu Leu Glu Glu Tyr Gln Arg Thr Ser Arg
1 5 10 15

Thr Cys Glu Ser
20

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética de NMDAR2A

<400> 17

Leu Asn Ser Cys Ser Asn Arg Arg Val Tyr Lys Lys Met Pro Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética de NMDAR2D

<400> 18

Gly Gly Asp Leu Gly Thr Arg Arg Gly Ser Ala His Phe Ser Ser Leu
1 5 10 15

Glu Ser Glu Val
20

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato delta 2

<400> 19

Gln Pro Thr Pro Thr Leu Gly Leu Asn Leu Gly Asn Asp Pro Asp Arg
1 5 10 15

Gly Thr Ser Ile
20

<210> 20
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 1

<400> 20

Met Gln Ser Ile Pro Cys Met Ser His Ser Ser Gly Met Pro Leu Gly
1 5 10 15

Ala Thr Gly Leu
20

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 2

<400> 21

Gln Asn Phe Ala Thr Tyr Lys Glu Gly Tyr Asn Val Tyr Gly Ile Glu
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile
20

<210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 3

<400> 22

Gln Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Glu Gly Tyr Asn Val Tyr Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile
20

<210> 23
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 4

<400> 23

His Thr Gly Thr Ala Ile Arg Gln Ser Ser Gly Leu Ala Val Ile Ala
1 5 10 15

Ser Asp Leu Pro
20

<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 5

<400> 24

Ser Phe Thr Ser Ile Leu Thr Cys His Gln Arg Arg Thr Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Thr Val Ala
20

<210> 25
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 6

<400> 25

Glu Val Ile Asn Met His Thr Phe Asn Asp Arg Arg Leu Pro Gly Lys
1 5 10 15

Glu Thr Met Ala
20

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 20-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 7

<400> 26

Arg Arg Leu Pro Gly Lys Asp Ser Met Ala Cys Ser Thr Ser Leu Ala
1 5 10 15

Pro Val Phe Pro
20

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética de NMDAR1, NMDAR1-1, NMDAR1-4, NMDAR1-3b, NMDAR1-4b

<400> 27

Ser Thr Val Val
1

<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética de NMDAR1-2, NMDAR1-3

<400> 28

His Arg Glu Ser
1

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética de NMDAR2C, NMDAR2D

<400> 29

Glu Ser Glu Val
1

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética de NMDAR3A

<400> 30

Thr Cys Glu Ser
1

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato delta 2

<400> 31

Gly Thr Ser Ile
1

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 1

<400> 32

Ala Thr Gly Leu
1

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 2 y del receptor de glutamato 3

<400> 33

Ser Val Lys Ile
1

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 4

<400> 34

Ser Asp Leu Pro
1

<210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 5

<400> 35

Glu Thr Val Ala
1

<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 6

<400> 36

Glu Thr Met Ala
1

<210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia 4-mérica C-terminal sintética del receptor de glutamato 7

<400> 37

Pro Val Phe Pro
1

<210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Glu, Asp, Asn o Gln

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Ser o Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Asp, Glu, Gln o Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Val o Leu

<400> 38

Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 39

Glu Thr Asp Val
1

<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 40

Glu Thr Glu Val
1

<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 41

Asp Thr Asp Val
1

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 42

Asp Thr Glu Val
1

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 43

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 44

Gly Ser Ser Ser Ser
1 5

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 45

Thr Gly Glu Lys Pro
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 46

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 47

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

<210> 48
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<900> 48

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

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Variante sintética del péptido tat

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es cualquier aminoácido distinto de Tyr o está ausente

<400> 49

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 50

Gly Lys Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 51

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 52

Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 53

Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 54

Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 55

Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 56

Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 57

Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido tat sintético

<400> 58

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 59

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg
1 5

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 60

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg
1 5 10

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 61

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg
1 5

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 62

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg
1 5 10

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 63

Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 64

Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 65

Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg
1 5 10

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 66

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg
1 5

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 67

Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad, en el que se administra un inhibidor de la desgranulación de mastocitos o un agente antihistamínico que inhibe una respuesta inflamatoria debida a la desgranulación de mastocitos inducible por el péptido tat con el agente farmacológico.

2. El agente farmacológico para el uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la desgranulación de mastocitos o el agente antihistamínico se administra antes que el agente farmacológico.

3. El agente farmacológico para el uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la desgranulación de mastocitos o el agente antihistamínico se administra al mismo tiempo que el agente farmacológico.

4. El agente farmacológico para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido tat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende RKKRRQRRR (SEQ ID Nº: 51), GRKKRRQRRR (SEQ ID Nº 1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº 2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº 3) o GRKKRRQRRRP (SEQ ID Nº 4).

5. El agente farmacológico para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente farmacológico es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos KLSSIESDV (SEQ ID nº 5) o KLSSIETDV (SEQ ID Nº 43).

6. El agente farmacológico para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el inhibidor de la desgranulación de mastocitos o antihistamínico se administra de manera intravenosa, oral o tópica.

7. Un inhibidor de la desgranulación de mastocitos o antihistamínico para el uso en la inhibición de una respuesta inflamatoria debida a la desgranulación de mastocitos inducible por un agente farmacológico unido a un péptido tat.

8. Un equipo que comprende un agente farmacológico unido a un péptido tat, y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos o antihistamínico inhibe una respuesta inflamatoria debida a la desgranulación de mastocitos inducible por el péptido tat.

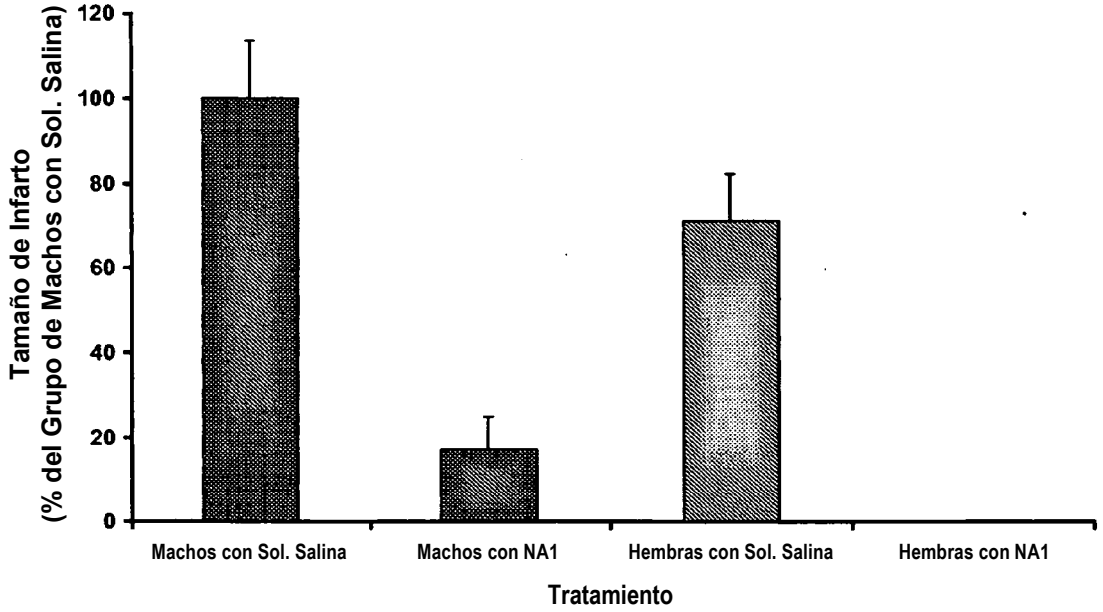
9. Un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD95 a NDMAR 2B, que es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID Nº 38) en su extremo C-terminal, unido a un péptido tat para el uso en el tratamiento o la profilaxis de ictus, epilepsia, hipoxia, lesión traumática del SNC no asociada a ictus, enfermedad de Alzheimer o Parkinson en combinación con un inhibidor de la desgranulación de mastocitos o antihistamínico, por lo cual el inhibidor de la desgranulación de mastocitos o antihistamínico inhibe una respuesta inflamatoria debida a la desgranulación de mastocitos inducible por el péptido tat.

10. El agente farmacológico para el uso según la reivindicación 9, en el que el péptido tat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende RKKRRQRRR (SEQ ID Nº: 51), GRKKRRQRRR (SEQ ID Nº 1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº 2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº 3) o GRKKRRQRRRP (SEQ ID Nº 4).

11. El agente farmacológico para el uso según la reivindicación 9, en el que el sujeto es de sexo femenino.

12. El agente farmacológico para el uso según la reivindicación 9, en el que el uso es la profilaxis de un sujeto que corre el riesgo de tener un ataque isquémico cerebral transitorio o ictus como resultado de someterse a cirugía cardiaca.

13. El agente farmacológico para el uso según la reivindicación 9, en el que el agente farmacológico es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos KLSSIESDV (SEQ ID Nº 5) o KLSSIETDV (SEQ ID Nº 43).



	% de Machos con Sol. Salina	Desv. Est.	Error Est.
Machos con Sol. Salina	100	36.14998	13.66341
Machos con NA1	17.1938348	20.55267	7.76818
Hembras con Sol. Salina	70.94671832	29.68894	11.22136
Hembras con NA1	0.00	0	0

FIGURA 1

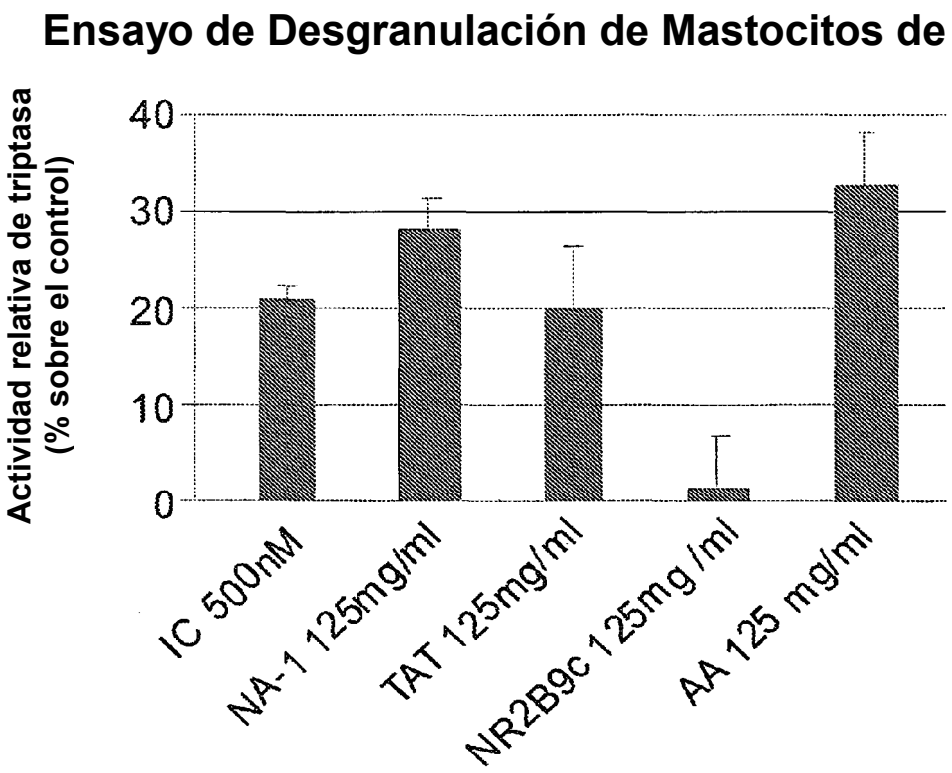

Ensayo de Desgranulación de Mastocitos de Ratón
Actividad relativa de triptasa (% sobre el control)
40
30
20
10
0
IC 500nM
NA-1 125mg/ml
TAT 125mg/ml
NR2B9c 125mg /ml
AA 125 mg/ml

FIGURA 2

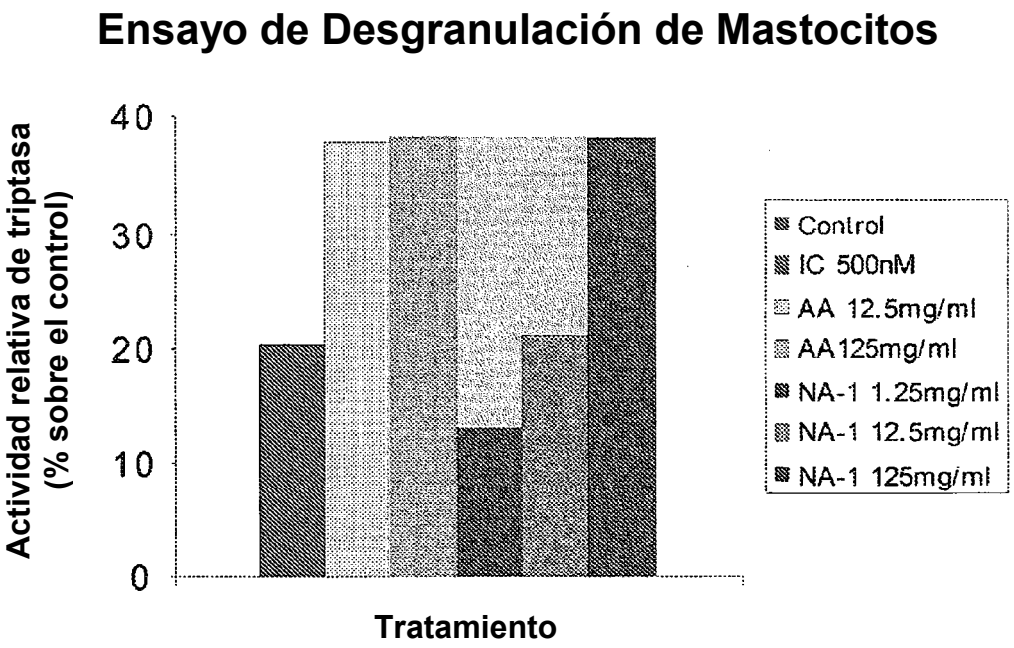

Ensayo de Desgranulación de Mastocitos
Actividad relativa de triptasa (% sobre el control)
40
30
20
10
0
Tratamiento
Control
IC 500nM
AA 12.5mg/ml
AA125mg/ml
NA-1 1.25mg/ml
NA-1 12.5mg/ml
NA-1 125mg/ml

FIGURA 3

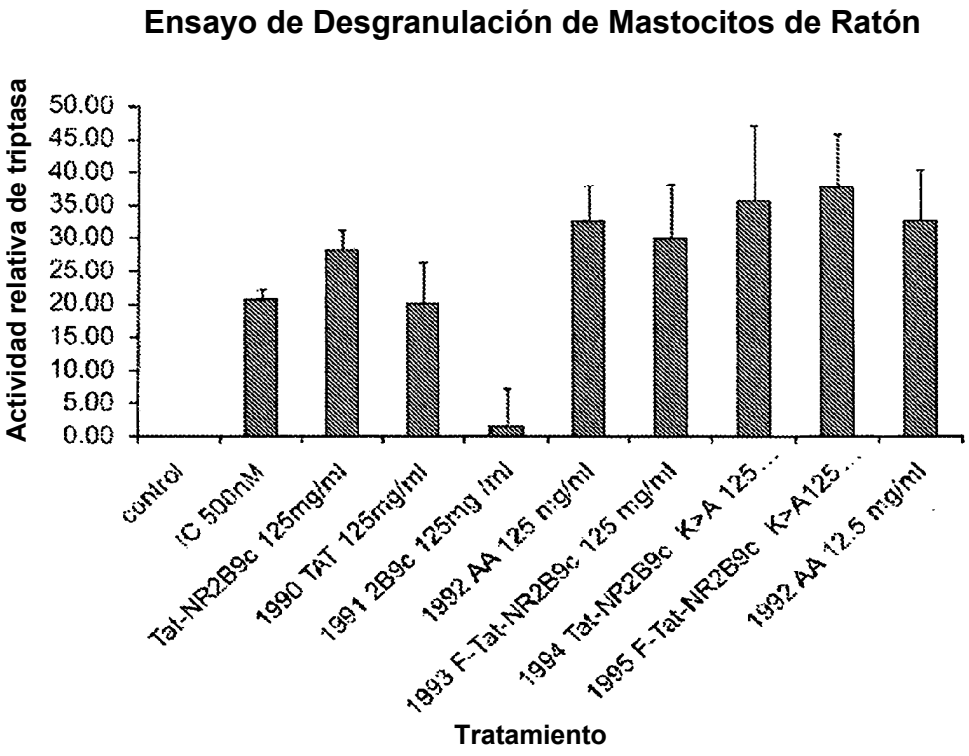

Ensayo de Desgranulación de Mastocitos de Ratón
Actividad relativa de triptasa
50.00
45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
control
tC 500nM
Tat-NR2B9c 125mg/ml
1990 TAT 125mg/ml
1991 2B9c 125mg /ml
1992 AA 125 mg/ml
1993 F-Tat-NR2B9c 125 mg/ml
1994 Tat-NR2B9c K>A 125 ...
1995 F-Tat-NR2B9c K>A125 ...
1992 AA 12.5 mg/ml
Tratamiento

FIGURA 4

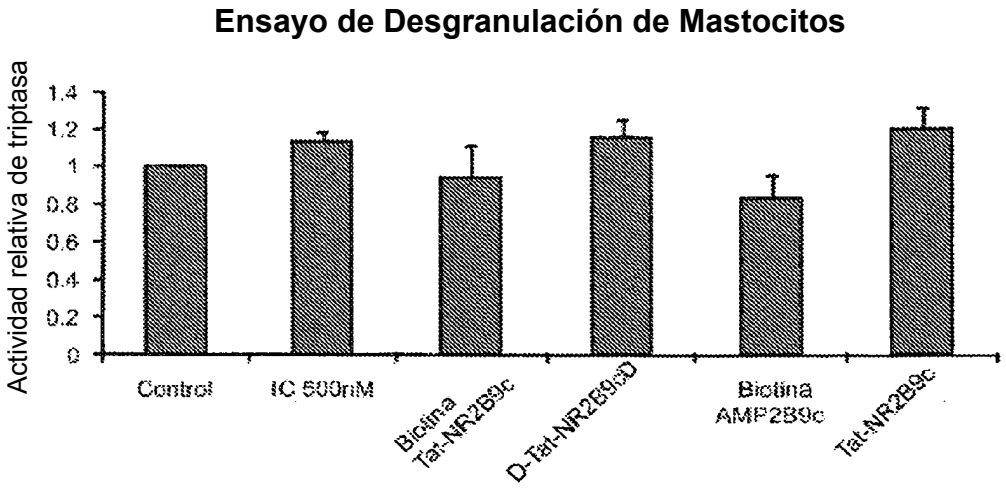

Ensayo de Desgranulación de Mastocitos
Actividad relativa de triptasa
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
IC 500nM
Biotina Tat-NR2B9c
D-Tat-NR2B9cD
Biotina AMP2B9c
Tat-NR2B9c

FIGURA 5

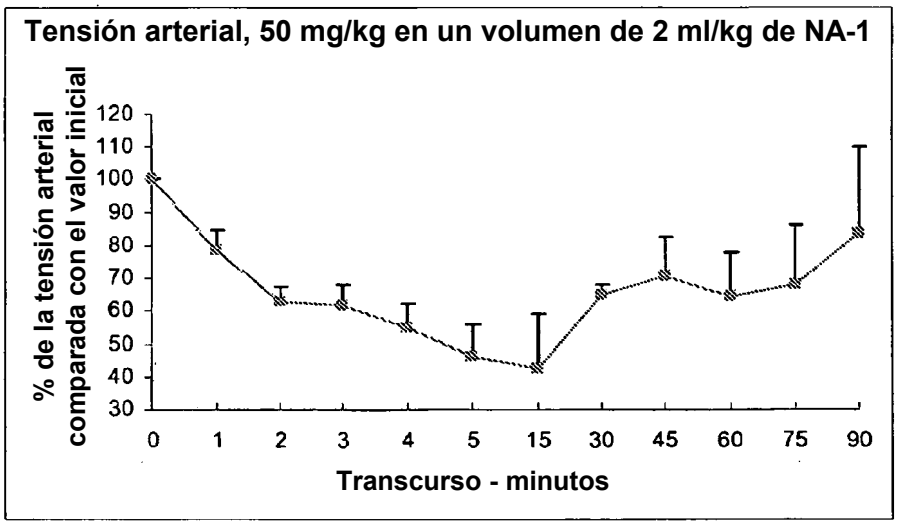

Tensión arterial, 50 mg/kg en un volumen de 2 ml/kg de NA-1
% de la tensión arterial comparada con el valor inicial
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
0
1
2
3
4
5
15
30
45
60
75
90
Transcurso - minutos

FIGURA 6