(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 655 112**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/07	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
A61P 25/00	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
C12N 9/02	(2006.01)
G01N 33/573	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2011** **PCT/US2011/047667**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012** **WO12021854**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2011** **E 11817146 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2616094**

(54) Título: **Tratamiento de una lesión penetrante en el cerebro**

(30) Prioridad:

12.08.2010 US 373204 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

TYMIANSKI, MICHAEL;
LU, PETER S. y
GARMAN, JOHATHAN DAVID

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 655 112 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de una lesión penetrante en el cerebro

Antecedentes de la invención

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC) y media la neurotransmisión a través de la mayoría de las sinapsis excitadoras. Tres clases de receptores de canales iónicos regulados por glutamato (N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) y Kainato) transducen la señal postsináptica. De estos, los receptores NMDA (NMDAR) son responsables de una parte significativa de la excitotoxicidad del glutamato. Los receptores NMDA son complejos que tienen una subunidad NR1 y una o más subunidades NR2 (2A, 2B, 2C o 2D) (véase, p. ej., McDain, C. y Caner, M. (1994) Physiol. Rev. 74: 723-760), y menos comúnmente, una subunidad NR3 (Chatterton et al. (2002) Nature 415: 793-798). Se ha demostrado que las subunidades NR1 unen glicina, mientras que las subunidades NR2 unen glutamato. Se requiere tanto la unión de glicina como la de glutamato para abrir el canal iónico y permitir la entrada de calcio en la célula. Las cuatro subunidades NR2 del receptor parecen determinar la farmacología y las propiedades de los receptores NMDA, con contribuciones adicionales del corte y empalme alternativo de la subunidad NR1 (Kornau et al. (1995) Science 269: 1737-40). Mientras que las subunidades NR1 y NR2A se expresan de manera ubicua en el cerebro, la expresión de NR2B está restringida al cerebro anterior, NR2C al cerebelo, y NR2D es escasa en comparación con los otros tipos.

Debido al papel clave de los receptores de NMDA en la respuesta de exocitotoxicidad, se han considerado objetivos para la terapia. Se han desarrollado compuestos que se dirigen al canal iónico (ketamina, fenciclidina, PCP, MK801, amantadina), al canal externo (magnesio), al sitio de unión a la glicina en las subunidades NR2, al sitio de unión al glutamato en las subunidades NR2, y a los sitios específicos en las subunidades NR2 (Zinc-NR2A; Ifenprodil, Traxoprodil-NR2B). Entre estos, los antagonistas no selectivos del receptor NMDA han sido los agentes más neuroprotectores en modelos animales del accidente cerebrovascular. Sin embargo, los ensayos clínicos con estos fármacos en el accidente cerebrovascular y la lesión cerebral traumática han fracasado hasta ahora, generalmente como resultado de efectos secundarios graves como alucinación e incluso coma.

La proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) se acopla con los NMDARs en vías que median la exocitotoxicidad y el daño cerebral isquémico (Aarts et al., Science 298, 846-850 (2002)). Este acoplamiento se ve interrumpido por neuronas transductoras con péptidos que unen dominios modulares a cada lado del complejo de interacción PSD-95/NMDAR. Este tratamiento atenuó la señalización de NMDAR correinte abajo sin bloquear la actividad de NMDAR, protegió las neuronas corticales en cultivo del agravio exocitotóxico y redujo el volumen de infarto cerebral en ratas sometidas a isquemia focal cerebral transitoria. También se comunicó este tratamiento de ser protector en un modelo de rata de lesión por percusión de fluido en el que se inyecta rápidamente un volumen en la cavidad craneal (véase documento de E.E.U.U. 20050059597). La lesión en un modelo de este tipo tiene un efecto primario suave en términos de daño tisular inmediato pero da como resultado grandes efectos secundarios por exocitotoxicidad.

Resumen de la invención reivindicada

La invención proporciona un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD-95 a un NMDAR para usar en el tratamiento o efectuar profilaxis de un efecto perjudicial de la lesión penetrante en el SNC. En algunas realizaciones, el sujeto a tratar tiene una herida de bala en la cabeza, o una herida penetrante por un objeto afilado en la cabeza, como un cuchillo. En algunas realizaciones, el sujeto es una persona militar o de la policía en riesgo de recibir un disparo. En algunas realizaciones, el sujeto está libre de y/o no corre el riesgo de otras enfermedades susceptibles de tratamiento con el agente farmacológico. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una lesión penetrante y la administración inhibe el desarrollo de deficiencias neurológicas en el sujeto. En algunas realizaciones, el agente farmacológico comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende T/SXV/L unido a un péptido de internalización.

En algunas realizaciones, el agente farmacológico comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende [E/D/N/Q]- [S/T]- [D/E/Q/N]- [V/L] (SEQ ID Nº: 38) unido a un péptido de internalización. En algunas realizaciones, el agente farmacológico comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende 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), o DTEV (SEQ ID Nº: 42) unido a un péptido de internalización. En algunas realizaciones, el agente farmacológico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en KLSSIESDV (SEQ ID Nº: 5) o KLSSIETDV (SEQ ID Nº: 43) unido a un péptido de internalización. En algunas realizaciones, el péptido de internalización es un péptido tat. En algunas realizaciones, el péptido de internalización tiene una secuencia de aminoácidos que comprende XGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº: 49), en donde X es un aminoácido distinto de Y o ninguno. En algunas realizaciones, en donde X es F (SEQ ID Nº: 3). En algunas realizaciones, el agente farmacológico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende FGYKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº: 37) o FGYKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID Nº: 68). En algunas realizaciones, el agente farmacológico tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en FGYKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº: 37) o FGYKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID Nº: 68). En algunas realizaciones, el agente farmacológico tiene una

secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº: 26) o YGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID Nº: 69). En algunas realizaciones, la dosis es de 0,1-10 mg/kg. En algunas realizaciones, se administra una sola dosis por episodio de lesión penetrante o riesgo de la misma. En algunas realizaciones, la administración es por infusión intravenosa.

Algunas realizaciones comprenden además monitorizar el sujeto por las deficiencias neurológicas de la lesión penetrante. En algunas realizaciones, la monitorización determina el funcionamiento cognitivo. En algunas realizaciones, la monitorización determina la patología.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, la temperatura del sujeto se puede reducir en respuesta a la administración.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-B muestran el neuroscore después de la lesión PBBI y el tratamiento con Tat-NR2B9c (también conocido como NA1) o con vehículo en dos estudios que representan dosis variables.

La Fig. 2A muestra la media de las faltas de pie totales por ensayo sobre una barra de equilibrio después de la lesión PBBI y el tratamiento con Tat-NR2B9c o vehículo.

La Fig. 2B muestra datos similares a la Fig. 2A excepto que solo se muestra la media de faltas de pie por ensayo contralaterales al sitio de la lesión.

La Fig. 2C muestra datos similares a la Fig. 2A excepto que se muestra la media de faltas de pie realizadas por segmento de barra contralaterales al sitio de la lesión.

Las Figs. 3A y B muestran dos estudios dosis-respuesta en una prueba de rendimiento rotarod.

Las Figs. 4A, B, C muestran efectos dosis-respuesta de Tat-NR2B9c (0,5 y 5,0 mg/kg solamente) en neuropatología PBBI en secciones de cerebro. La Fig. 4A muestra el volumen de lesión global, la Fig. 4B derecha muestra la progresión del volumen de lesión, y las Figs. 4B izquierda y 4C muestran secciones caudales.

Las Figs. 5A-D muestran el efecto de una sola inyección de bolo de 20 mg/kg de Tat-NR2B9c en el neuroscore (A), en la prueba de rendimiento rotarod (B) y en las habilidades de navegación acuática de Morris después de PBBI (C y D).

Las Figs. 6A-D muestran el efecto de múltiples regímenes de dosificación (a 0,5 mg/kg y 5 mg/kg) en el neuroscore (A), en la prueba de rendimiento rotarod (B) y en las habilidades de navegación acuática de Morris (D).

Definiciones

Un “péptido quimérico” significa un péptido que tiene dos componentes peptídicos no asociaciados de forma natural uno con otro unidos entre si como una proteína de fusión o mediante enlace químico.

Una proteína o polipéptido de “fusión” se refiere a un polipéptido compuesto, es decir, una secuencia de aminoácidos contigua, compuesto por secuencias de dos (o más) polipéptidos heterólogos distintos que normalmente no están fusionados juntos en una sola secuencia polipeptídica.

El término “dominio PDZ” se refiere a un dominio de proteína modular de aproximadamente 90 aminoácidos, caracterizado por una identidad de secuencia significativa (p. ej., al menos 60%) con la proteína sináptica cerebral PSD-95, la proteína de unión de los septos de Drosófila Discs-Large (DLG), y la proteína de unión epitelial estrecha ZO1 (ZO1). Los dominios PDZ también se conocen como repeticiones de homología Discs-Large (“DHRs”) y repeticiones GLGF (SEQ ID Nº: 7). Generalmente los dominios PDZ parecen mantener una secuencia central consenso (Doyle, D.A., 1996, Cell 85: 1067-76). A modo de ejemplo, las secuencias de proteínas que contienen un dominio PDZ y secuencias del dominio PDZ se describieron en la solicitud de E.E.U.U. nº. 10/714.537, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

El término “proteína PL” o “proteína ligando PDZ” se refiere a una proteína de origen natural que forma un complejo molecular con un dominio PDZ, o con una proteína cuyo extremo carboxi-terminal, cuando se expresa de modo separado de la proteína de longitud completa (p. ej., como un fragmento peptídico de 3-25 residuos, p. ej., 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 14 o 16 residuos), forma un complejo molecular de este tipo. El complejo molecular se puede observar in vitro usando el “Ensayo A” o el “Ensayo G” descritos, p. ej., en la solicitud de E.E.U.U. Nº 10/714.537, o *in vivo*.

El término “receptor NMDA”, o “NMDAR”, se refiere a una proteína asociada a membrana que se sabe que interacciona con NMDA incluyendo las diversas formas de subunidades descritas a continuación. Tales receptores pueden ser humanos o no humanos (p. ej., 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 residuos contiguos al extremo C-terminal 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 20 o 25) (“secuencia PL C-terminal”) o a

una secuencia interna que se sabe que une un dominio PDZ (“secuencia PL interna”).

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

Los términos “aislado” o “purificado” significan que la especie objeto (p. ej., un péptido) se ha purificado de los contaminantes que están presentes en una muestra, como una muestra obtenida a partir de fuentes naturales que contienen la especie objeto. Si se aisla o purifica una especie objeto es la especie molecular predominante (p. ej., polipéptido) presente en una muestra (es decir, es más abundante sobre una base molar que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente la especie molecular comprende al menos aproximadamente el 50% (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición pura o sustancialmente purificada, aislada comprende más del 80 a 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en una composición. Lo más preferiblemente, la especie objeto se purifica a homogeneidad esencial (es decir, no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente 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 internalización se puede describir como aislado a pesar de que está unido a un péptido activo.

Un “peptidomimético” 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. El peptidomimético puede contener análogos de aminoácidos completamente sintéticos, no naturales, o puede ser una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y parcialmente no naturales análogos de aminoácidos. El peptidomimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales siempre que dichas sustituciones no alteren también sustancialmente la estructura y/o actividad inhibidora o de unión del mimético. Las composiciones de polipéptidos miméticos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son típicamente de tres grupos estructurales: a) grupos enlace de residuo distintos de los enlaces amida natural (“enlace peptídico”); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos de origen natural; o c) residuos que inducen mimetismo de estructura secundaria, p. ej., una conformación de giro beta, giro gamma, lámina beta, alfa hélice, y similares. En un peptidomimético de un péptido quimérico que comprende un péptico activo y un péptido de internalización, tanto la fracción activa como la fracción de internalización o ambas pueden ser un peptidomimético.

El término “unión específica” se refiere a la unión entre dos moléculas, por ejemplo, un ligando y un receptor, caracterizado por la capacidad de una molécula (ligando) a asociarse con otra molécula específica (receptor) incluso en presencia de muchas otras moléculas diversas, es decir, mostrar unión preferencial de una molécula por la otra en una mezcla heterogénea de moléculas. La unión específica de un ligando a un receptor también se evidencia por la unión reducida de un ligando detectable marcado a un receptor en presencia de un exceso de ligando no marcado (es decir, un ensayo de unión de competición).

La exocitotoxicidad es el proceso patológico por el cual se dañan y se mueren las neuronas debido a la sobreactivación de los receptores por el neurotransmisor excitador glutamato, como los receptores NMDA, p. ej., NMDAR 2B.

El término “sujeto” o “paciente” incluye seres humanos y animales veterinarios, como mamíferos.

El término “agente” incluye cualquier compuesto que incluye compuestos con o sin actividad farmacéutica, compuestos naturales, compuestos sintéticos, moléculas pequeñas, péptidos y peptidomiméticos.

El término “agente farmacológico” quiere decir un agente que tiene una actividad farmacológica. Los agentes farmacológicos incluyen compuestos que se conocen como fármacos, compuestos para los que se ha identificado actividad farmacológica pero que están sometidos a una evaluación terapéutica adicional en modelos animales o ensayos clínicos. Un agente quimérico comprende un agente farmacológico unido a un péptido de internalización. Se puede describir un agente farmacológico como que tiene actividad farmacológica si exhibe una actividad en un sistema de selección que indica que el agente activo es o puede ser útil en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad. El sistema de selección puede ser in vitro, celular, animal o humano. Los agentes pueden ser descritos como que poseen actividad farmacológica a pesar de que se pueda necesitar una prueba adicional para establecer la utilidad profiláctica o terapéutica real en el tratamiento de una enfermedad.

Un péptido tat significa un péptido que comprende o consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID Nº: 1), en el que se eliminan, sustituyen o insertan no más de 5 residuos dentro de la secuencia, que mantiene la capacidad de facilitar la captación de un péptido ligado u otro agente dentro de las células. Preferiblemente, cualquier cambio de aminoácidos son sustituciones conservativas. Preferiblemente, cualquier sustitución, eliminación o inserciones internas en el agregado dejan al péptido con una carga catiónica neta, preferiblemente similar a la de la secuencia anterior. Los aminoácidos de un péptido tat se pueden derivatizar con biotina o molécula similar para disminuir una respuesta antiinflamatoria.

La co-administración de unos agentes farmacológicos unidos a un péptido de internalización y un agente anti-

inflamatorio significa que se administran los dos agentes lo suficientemente próximos en el tiempo para que el agente anti-inflamatorio pueda inhibir una respuesta antinflamatoria inducible por el péptido de internalización.

Estadísticamente significativo quiere decir un valor p que es <0,05, preferiblemente <0,01 y lo más preferiblemente <0,001.

Un episodio de lesión penetrante o riesgo de la misma significa un periodo cuando los signos y/o síntomas de la afección o riesgo están presentes intercalados flanqueados por periodos más largos en los que los signos y/o síntomas o riesgo están ausentes o presentes en un menor grado.

Un sujeto en riesgo de una enfermedad o afección es un sujeto que actualmente no tiene una enfermedad o afección pero que está en mayor riesgo de desarrollar la enfermedad o afección por medida estadísticamente significativa u otra manera demostrable, como se describe adicionalmente más adelante.

Descripción detallada de la invención

I. Generalidades

La invención proporciona un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD-95 a NMDAR para usar en el tratamiento o efectuar la profilaxis de un efecto perjudicial de lesión penetrante en el SNC. El agente farmacológico de la presente invención se puede usar en métodos de tratamiento o profilaxis de efectos perjudiciales de lesión penetrante en el cerebro u otra parte del sistema nervioso central. Los métodos se basan en parte en los resultados de un modelo de roedor de lesión balística penetrante que demuestran que un inhibidor de la interacción PDF-95 NMDAR es eficaz en inhibir la deficiencia neurológica resultante de dicha lesión. Un modelo de este tipo difiere del modelo de percusión por fluido anteriormente informado en que el daño de tejido primario por lesión cerebral penetrante es extenso y se podría haber esperado que superase cualquier efecto del tratamiento en la lesión secundaria. El agente farmacológico es útil para tratar sujetos que tienen o están en riesgo de lesión cerebral penetrante, incluyendo sujetos que han recibido un disparo en la cabeza o en riesgo de tales lesiones (p. ej., personal militar o policial).

II. Agentes para tratar la enfermedad

Aunque cualquiera de los agentes se puede seleccionar por eficacia en los modelos animales o ensayos clínicos descritos más adelante, incluyendo agentes que han fracasado en los ensayos clínicos previos para el accidente cerebrovascular, una clase preferida de agentes inhibe las interacciones entre PSD-95 y uno o más NMDARs. Tales agentes son útiles para disminuir los efectos perjudiciales del accidente cerebrovascular y otras afecciones neurológicas mediadas al menos en parte por exocitotoxicidad NMDAR. Tales agentes incluyen péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que incluyen o se basan en el motivo PL de un receptor NMDAR o el dominio PDZ de PSD95. Tales péptidos también pueden inhibir las interacciones entre PSD-95 y nNOS y otros receptores de glutamato (p. ej., receptores de kainato o receptores AMPA), como KV1-4 y GluR6. Los péptidos preferidos inhiben la interacción entre 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 C-terminal PL de una o más subunidades del receptor NMDA 2 que incluyen la subunidad NR2B del receptor neuronal del N-metil-D-aspartato (Mandich et al., Genomics 22, 216-8 (1994)). NMDAR2B tiene un ID de GenBank 4099612, un extremo C-terminales de 20 aminoácidos 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, también se puede ver inhibición con especies variantes de las proteínas. A continuación aparece una lista de receptores NMDA y de glutamato que se pueden usar:

Tabla 1: Receptores NMDA con secuencias PL

Nombre	GI o Acc#	secuencia C-terminal 20mer	secuencia C-terminal 4mer	PL?	ID PL interno
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID Nº: 13)	STVV (SEQ ID Nº: 27)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID Nº: 13)	STVV (SEQ ID Nº: 27)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID Nº: 13)	STVV (SEQ ID Nº: 27)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID Nº: 13)	STVV (SEQ ID Nº: 27)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV	STVV (SEQ ID Nº: 27)	X	AA216

		(SEQ ID Nº: 13)			
NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID Nº: 14)	HRES (SEQ ID Nº: 28)		
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID Nº: 14)	HRES (SEQ ID Nº: 28)		
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISSLESEV (SEQ ID Nº: 15)	ESEV (SEQ ID Nº: 29)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID Nº: 11)	ESDV (SEQ ID Nº: 12)	X	AA34.1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEYQRTSRTCES (SEQ ID Nº: 16)	TCES (SEQ ID Nº: 30)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID Nº: 11)	ESDV (SEQ ID Nº: 12)	X	
NMDAR2A	558748	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV (SEQ ID Nº: 17)	ESDV (SEQ ID Nº: 12)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGSAHFSSLESEV (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	

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

Los péptidos pueden incluir o estar basados 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]. Se da preferiblemente esta secuencia 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 sus extremos C-terminales. Péptidos ilustrativos 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 los aminoácidos C-terminales. Dos péptidos particularmente preferidos son KLSSIESDV (SEQ ID Nº: 5), y KLSSIETDV (SEQ ID Nº: 43). Tales péptidos normalmente tienen de 3-25 aminoácidos (sin un péptido de internalización), se prefieren las longitudes de los péptidos de 5-10 aminoácidos, y particularmente 9 aminoácidos (también sin un péptido de internalización). En algunos péptidos de este tipo, todos los aminoácidos son del extremo C-terminal del receptor NMDA (no incluyendo los aminoácidos de un péptido de internalización).

Otros péptidos que inhiben las interacciones entre PDS95 y NDMARs incluyen péptidos de dominio PDZ 1 y/o 2 de PSD-95 o un subfragmento de cualquiera de estos que inhiben las interacciones entre PSD-95 y un receptor NMDA, como NMDA 2B. Tales péptidos activos comprenden al menos 50, 60, 70, 80 o 90 aminoácidos del dominio PDZ 1

y/o del dominio PDZ 2 de PSD-95, que se dan aproximadamente dentro de los 65-248 aminoácidos de PSD-95 proporcionado por Stathakism, Genomics 44(1): 71-82 (1997) (secuencia humana) o NP_031890.1, GI: 6681195 (secuencia de ratón) o regiones correspondientes de otras variantes de especie.

Los péptidos y peptidomiméticos de la invención pueden contener residuos de aminoácidos modificados por ejemplo, residuos que están N-alquilados. Las modificaciones de alquilo N-terminales pueden incluir p. ej., N-metilo, N-etilo, N-propilo, N-butilo, N-ciclohexilmetilo, N-ciclihexiletilo, N-bencilo, N-feniletilo, N-fenilpropilo, N-(3,4-diclorofenil)propilo, N-(3,3-difluorofenil)propilo, y N-(naftaleno-2-il)etilo.

Bach, J. Exp. Med. Chem. 51, 6450-6459 (2008) y WO 2010/004003 han descrito una serie de análogos de NR2B9c. La actividad de unión a PDZ es exhibida por péptidos que tienen solo tres aminoácidos C-terminales (SDV). Bach también presenta análogos que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en $X_1X_3X_2V$ (SEQ ID Nº: 8), en donde X_1 se selecciona de entre E, Q, y A, o un análogo de los mismos, X_2 se selecciona de entre A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D, y N-Me-N o un análogo de los mismos y X_3 se selecciona de aminoácidos alternativos t o S. Opcionalmente el péptido es N-alquilado en la posición P3 (tercer aminoácido del extremo C-terminal). El péptido se puede N-alquilar con un ciclohexano o sustituyente aromático, y comprende además un grupo espaciador entre el sustituyente y el grupo amino terminal del péptido o del análogo de péptido, en donde el espaciador es un grupo alquilo, preferiblemente seleccionado de entre metileno, etileno, propileno y butileno. El sustituyente aromático puede ser una fracción naftalen-2-ilo o un anillo aromático sustituido con uno o dos de halógeno y/o grupo alquilo.

Se pueden incorporar también otras modificaciones sin afectar adversamente a la actividad y estas incluyen sustitución de uno o más de los aminoácidos en la forma L-isomérica natural con aminoácidos en la forma D-isomérica. Por lo tanto, cualquier aminoácido natural en la configuración L (que también se puede denominar como el R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) se puede reemplazar con el aminoácido del mismo tipo de estructura química o un peptidomimético, pero de la quiralidad opuesta, denominado normalmente como el ácido D-amino, pero que además se puede denominar como la forma R o S. Por lo tanto, un peptidomimético puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, al menos un 50%, o todos los residuos de aminoácidos D. Un peptidomimético que contiene algunos o todos los residuos D a veces se denomina un péptido “inverso”.

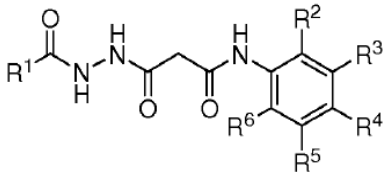
Los péptidomiméticos también incluyen retro péptidos. Un retro péptido tiene una secuencia de aminoácidos inversa. Los peptidomiméticos también incluyen péptidos retro inversos en los que se invierte el orden de los aminoácidos por lo que el aminoácido C-terminal original aparece en el extremo N-terminal y los D-aminoácidos se usan en lugar de los L-aminoácidos. El documento WO 2008/014917 describe un análogo retro inverso de Tat-NR2B9c que tiene la secuencia de aminoácidos vdseisslkrrrqrrkkrgyin (SEQ ID Nº: 4) de la cual los primeros nueve aminoácidos corresponden a NR2B9c y el resto a tat, (letras minúsculas que indican los aminoácidos D), e informa que es efectivo para inhibir la isquemia cerebral. Otro péptido eficaz descrito en esta memoria es RvTat-NR2B9c (RRRQRRKKRGYKLSSIESDV SEQ ID Nº: 6).

Se puede usar un enlazador, p. ej., un enlazador de polietilenglicol, para dimerizar la fracción activa del péptido o del peptidomimético para mejorar su afinidad y selectividad hacia las proteínas que contienen dominios PDZ en tándem. Véase p. ej., Bach et al., (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48: 9685-9689 y WO 2010/004003. Un péptido que contiene un motivo PL se dimeriza preferiblemente a través de la unión los extremos N-terminales de dos de tales moléculas, dejando el extremo C-terminal libre. Bach además informa que un péptido pentámero IESDV (SEQ ID Nº: 9) del extremo C-terminal de NMDAR 2B fue eficaz para inhibir la unión de NMDAR 2B a PSD95. Opcionalmente, aproximadamente de 2-10 copias de monómero de etilenglicol se unen en tándem como un enlazador de PEG.

Si se desea se puede confirmar la actividad farmacológica apropiada de los péptidos, peptidomiméticos u otros agentes, usando modelos de rata de accidente cerebrovascular previamente descritos antes de la prueba en los ensayos de roedores y ensayos clínicos descritos en la presente solicitud. Los péptidos y peptidomiméticos también se pueden seleccionar por su capacidad de inhibir las interacciones entre PSD-95 y NMDAR 2B usando ensayos descritos en p. ej., documento de E.E.U.U. 20050059597, que se incorpora como referencia. Los péptidos útiles tiene típicamente valores de IC50 de menos de 50 □M, 25 □M, 10 □M, 0,1 □M o 0,01 □M en tal ensayo. Los péptidos preferidos tienen típicamente un valor de IC50 entre 0,001-1 □M, y más preferiblemente 0,05-0,5 o 0,05 a 0,1 □M. Cuando un péptido u otro agente se caracteriza por inhibir la unión de una interacción, p. ej., la interacción de PSD-95 a NMDAR 2B, tal descripción no excluye que el péptido o agente también inhiba otra interacción, por ejemplo, la inhibición de la unión de PSD-95 a nNOS.

Los péptidos tales como los que acaban de describirse pueden opcionalmente derivatizarse (p. ej., acetilados, fosforilados y/o glicosilados) 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 inhibidores en los que el tercer residuo del extremo C-terminal es S oT, este residuo puede fosforilarse antes de usar el péptido.

Los agentes farmacológicos también incluyen pequeñas moléculas que inhiben las interacciones entre PSD95 y NMDAR 2B, y/o otras interacciones descritas anteriormente. Se describen inhibidores adecuados de moléculas pequeñas en WO/2009/006611. Una clase a modo de ejemplo de compuestos adecuados tienen la fórmula:



en donde 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 ramificado C_{1-6} (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}, alcoxilo C_{1-6}, $-C(O)R^{12}$, OH, COOH, -NO, indolina N-sustituida y un péptido de translocación de membrana celular;

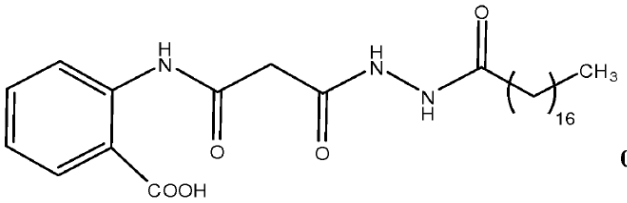
cada R^8 y R^9 es independientemente seleccionado del grupo que consiste en H, OH, ciclohexano, ciclopentano, fenilo, fenilo sustituido y ciclopentadieno;

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

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

en donde uno de R^2, R^3, R^4, R^5 y R^6 es –COOH, y en donde 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.

Uno de tales compuestos es 0620-0057, cuya estructura es:



0620-0057

Un agente farmacológico puede estar unido a un péptido de internalización para facilitar la capatación dentro de las células y/o a través de la barrera hematoencefálica. Los péptidos de internalización, también conocidos como péptidos de transducción de membrana celular o péptidos penetrantes, son una clase bien conocida de péptidos relativamente cortos (p. ej., 8-30 aminoácidos) que permiten que muchas proteínas celulares o virales atraviesen las membranas. Tales péptidos tienen típicamente una carga catiónica a partir de una representación normal anterior (con respecto a las proteínas en general) de residuos de arginina y/o lisina que se cree facilitan su paso a través de las membranas. Algunos de tales péptidos tienen al menos 5, 6, 7 u 8 residuos de arginina y/o lisina. Ejemplos incluyen la proteína antennapedia (Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997)) (y variantes de la misma), la proteína tat del virus de la inmunodeficiencia humana, la proteína VP22, el producto del gen UL49 del virus del herpes simplex tipo 1, Penetratina, SynB1 y 3, Transportan, Anfipático, gp41NLS, poliArg, y varias toxinas de plantas y bacterias, como ricina, abrina, modeccina, toxina de la difteria, toxina del cólera, toxina del ántrax, toxinas termosensibles, 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) (todas incorporadas por referencia).

Un péptido de internalización preferido es tat del virus de VIH. Un péptido tat informado en trabajos anteriores comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos estándar YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº: 2) encontrado en la proteína Tat del VIH. Así, dos agentes preferidos que incorporan este péptido tat son los péptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRRKLSSIESDV SEQ ID Nº: 26 (también conocida como Tat-NR2B9c o NA1) o YGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID Nº: 69). Si están presentes residuos adicionales flanqueando dicho 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 enlazadores de una clase típicamente usados 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 puede ser cualquier otro aminoácido que no reduzca significativamente la capacidad de conferir capatción de la variante sin los residuos flanqueantes. Preferiblemente, el número de aminoácidos flanqueantes distintos de un péptido activo no excede de diez en ninguno de los lados 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 están presentes aminoácidos flanqueantes.

Se describen variantes del péptido tat anterior que tienen capacidad reducida de unirse a canales de calcio tipo N en el documento WO/2008/109010. 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 ninguno (en cuyo caso G es un residuo N-terminal libre). Un péptido tat preferido tiene un residuo Y N-terminal sustituido por F. Por lo tanto, se prefiere un péptido tat que comprende o consiste en FGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº: 3). Otra variante preferida de péptido tat consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID Nº: 1). Otros péptidos derivados de tat que facilitan la capatación de un agente farmacológico sin inhibir los canales de calcio de tipo N incluyen aquellos presentados en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

X-FGRKKRRQRRR (F-Tat) (residuos 2-12 de esta secuencia están englobadados en la SEQ ID Nº: 3; secuencia de longitud completa descrita como SEQ ID Nº: 10)
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 amino libre, uno o más aminoácidos, o una fracción conjugada. Se pueden usar péptidos de internalización en forma inversa o retro o retro inversa con o sin el péptido o peptidomimético unido en dicha forma. Por ejemplo, un péptido quimérico preferido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en RRRQRRKKRGYKLSSIESDV (SEQ ID Nº: 7).

Los péptidos de internalización se pueden unir a agentes farmacológicos por métodos convencionales. Por ejemplo, los agentes se pueden unir a los péptidos mediante enlace químico, por ejemplo a través de un agente de acoplamiento o de conjugación. Numerosos agentes de este tipo están disponibles comercialmente y son revisados por S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991). Algunos ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen J-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) o N,N'-(1,3-fenilen) bismaleimida; N,N'-etilen-bis-(yodoacetamida) u otro agente de este tipo que tenga 6 a 11 puentes de metileno de carbono (los cuales son relativamente específicos para grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno (que forma enlaces irreversibles con grupos amino y tirosina). Otros reactivos de entrecruzamiento incluyen p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona (que forma entrecruzamientos irreversibles con grupos amino y fenólicos); dimetil adipimidato (que es específico para grupos amino); fenol-1,4-disulfonilcloruro (que reacciona principalmente con

grupos amino); hexametilendiisocianato o diisotiocianato, o azofenil-p-diisocianato (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobencidina (que reacciona primariamente con tirosina e histidina).

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

Los péptidos farmacológicos, opcionalmente fusionados a péptidos tat, se pueden sintetizar mediante síntesis en fase sólida o métodos recombinantes. Los peptidomiméticos se pueden sintetizar usando una variedad de procedimientos y metodologías descritos en la literatura 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. Drivers. 3: 17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267: 220-234.

III. Pacientes susceptibles de tratamiento

El agente farmacológico de la presente invención se puede usar para el tratamiento en sujetos que tienen lesión penetrante del cerebro u otro componente del SNC. Una lesión penetrante es una resultante del desplazamiento o destrucción del tejido del SNC por un objeto sólido que pasa desde el exterior del cuerpo en y/o a través del SNC (p. ej., a través del cráneo), y no incluiría por ejemplo, una lesión por percusión por fluido en la que la lesión se produce por presión de un fluído inyectado. En la lesión penetrante, el objeto sólido puede pasar transitoriamente a través del cerebro dejando daño en su camino o puede incrustarse hasta o a no ser que se elimine por procedimiento quirúrgico. Lesiones penetrantes pueden ser, por ejemplo, el resultado de la guerra, otro combate, aplicación de la ley, actividad delictiva u otras situaciones violentas, en las que está más presente el daño tisular primario que un daño por percusión por fluido o un daño imprevisto de la cirugía. La lesión puede ser el resultado de una herida de bala, de materia sólida liberada por una explosión, como una bomba, un objeto punzante, como un cuchillo, lanza, cuchilla, o de empalamiento. Dicha lesión puede ser en el cerebro o en la médula espinal. Dichos pacientes se tratan preferiblemente tan pronto como sea posible, y en cualquier caso dentro de una ventana de 24, 12, 6, 3 o 1 hora después de que haya ocurrido la lesión penetrante.

Los pacientes tratados por los presentes métodos pueden ser objeto de cirugía por el daño de tejido primario resultante de una lesión penetrante en el SNC (p. ej., extraer una bala, detener el sangrado, reparar un nervio). En tal caso, el tratamiento también puede ser útil para reducir los efectos secundarios del daño de la cirugía en sí (p. ej., infarto) así como efectos secundarios de la lesión penetrante. Sin embargo, el daño primario de la lesión penetrante es usualmente mayor que cualquier daño incidental resultante de la cirugía, así que en tales situaciones, los presentes métodos son primariamente para el tratamiento del daño secundario resultante de la lesión penetrante. Aunque también se puede tratar el daño al SNC resultante exclusivamente de la cirugía terapéutica o diagnóstica con los agentes farmacológicos descritos en la presente solicitud (véase el documento E.E.U.U. Nº Ser. 61/185.989 presentado el 10 de junio de 2009, publicado como WO2010/144721), lesiones que resultan unicamente incidentales a la cirugía terapéutica o diagnóstica no se consideran lesiones penetrantes como se define en esta memoria.

El agente farmacológico de la presente invención también se puede usar para el tratamiento de sujetos en mayor riesgo de tales lesiones. Tales sujetos incluyen personal militar a punto de entrar en un campo de batalla u otro lugar de personal anticipado de combate o policial cuyos deberes los situan en proximidad con actividades delictivas armadas. Tales individuos se tratan preferiblemente a o lo más cerca posible al momento de ser situado en riesgo de lesión penetrante (p. ej., antes de entrar en un campo de batalla o confrontación con delincuentes armados) y en cualquier caso dentro de una ventana de menos de 24, 12, 6, 3 o 1 hora antes de tal acontecimiento.

Los pacientes susceptibles de tratamiento pueden o no tener y/o estar en mayor riesgo de otras enfermedades o trastornos para los que previamente se ha propuesto el tratamiento con antagonistas de PSD-95 (es decir, enfermedades co-mórbidas susceptibles de tratamiento con un antagonista de PSD-95). Estas enfermedades y afecciones incluyen enfermedades mediadas por exocitotoxicidad, accidente cerebrovascular, epilepsia, hipoxia, lesión traumática en el SNC no asociada con accidente cerebrovascular como daño cerebral traumático y lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Un accidente cerebrovascular es una lesión de rápido desarrollo en el SNC debido a la perturbación del suministro de sangre a un área del SNC. La co-morbilidad con accidente cerebrovascular quiere decir por lo tanto contemporánea con tal lesión en desarrollo. En pacientes, en los que está presente una enfermedad co-mórbida de este tipo, los agentes de la invención pueden ser eficaces contra las lesiones penetrantes y la enfermedad co-mórbida.

IV. Métodos de tratamiento

Un agente farmacológico opcionalmente unido a un péptido de internalización se administra en una cantidad, frecuencia y ruta de administración eficaces para curar o reducir, o inhibir un mayor deterioro de al menos un signo o síntoma de lesión cerebral penetrante. A menos que se indique lo contrario, las dosificaciones para un agente farmacológico unido a un péptido de internalización se refieren al agente completo más que solo al agente farmacológico componente del agente quimérico. Una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de un

agente farmacológico (que incluye el péptido de internalización) si está presente, suficiente para curar o reducir o inhibir un mayor deterioro de al menos un signo o síntoma de lesión cerebral penetrante en una población de pacientes (o modelos animales) que padecen la enfermedad tratada con un agente de la invención en relación con el daño en una población control de pacientes (o modelos animales) que padecen esa enfermedad o afección que no son tratados con el agente. La cantidad también se considera terapéuticamente eficaz si un paciente individual tratado logra un resultado más favorable que el resultado medio en una población control de pacientes comparables no tratados por métodos de la invención. Un régimen terapéuticamente eficaz implica la administración de una dosis terapéuticamente eficaz a una frecuencia y ruta de administración necesaria para conseguir el objetivo pretendido. Una sola dosis de agente es a menudo suficente para el tratamiento de una lesión cerebral penetrante. También son eficaces regímenes de dosificación múltiples.

La invención también proporciona agentes y composiciones farmacológicos para la profilaxis de la lesión penetrante en el cerebro u otro componente del SNC. Usualmente un sujeto de este tipo tiene una mayor probabilidad de desarrollar este tipo de lesión (p. ej., personal militar, policial) en relación con la población control. La población control por ejemplo puede comprender uno o más individuos seleccionados al azar de la población en general (p. ej., coincidentes en edad, género, raza y/o etnia). Un sujeto se puede considerar en riesgo de un trastorno si se encuentra que un “factor de riesgo” está asociado con ese trastorno con ese sujeto. Un factor de riesgo puede incluir cualquier actividad, rasgo, evento o propiedad asociado con un trastorno dado, por ejemplo, a través de estudios estadísticos o epidemiológicos en una población de sujetos. Así, un sujeto se puede considerar en riesgo de un trastorno incluso si los estudios que identifican los factores de riesgo subyacentes no incluían específicamente al sujeto.

Un agente farmacológico opcionalmente unido a un péptido de internalización se administra a un paciente en riesgo de lesión penetrante en el cerebro u otro componente del SNC en una cantidad, frecuencia y ruta suficiente para prevenir, retrasar o inhibir el desarrollo de al menos un signo o síntoma de la lesión penetrante en el cerebro u otro componente del SNC. Una cantidad profilácticamente eficaz quiere decir una cantidad de agente farmacológico suficiente significativamente para prevenir, inhibir o retrasar al menos un signo o síntoma de tal lesión penetrante en una población de pacientes (o modelos animales) en riesgo de la lesión tratada con el agente en comparación con una población de pacientes control en riesgo de la lesión no tratada con un agente quimérico de la invención. La cantidad también se considera profilácticamente eficaz si un paciente individual tratado logra un resultado más favorable que el resultado medio en una población control de pacientes comparables no tratados por el método de la invención. Un régimen profilácticamente eficaz implica la administración de una dosis profilácticamente eficaz en una frecuencia y ruta de administración necesaria para conseguir el propósito pretendido. Para la profilaxis de los efectos dañinos de la lesión penetrante en el cerebro u otro componente del SNC, es normalmente suficiente una sola dosis de agente por episodio de riesgo.

Dependiendo del agente, la administración puede ser parenteral, intravenosa, nasal, oral, subcutánea, intra-arterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. Se prefiere la administración intravenosa para agentes peptídicos.

Para agentes quiméricos que incluyen un péptido de internalización, particularmente un péptido tat del VIH que comprende la secuencia de aminoácidos, el agente puede o no ser co-administrado con un agente anti-inflamatorio para disminuir la liberación de histamina y sus efectos corriente abajo asociados con altos niveles del péptido de internalización. Los agentes preferidos para co-administración son inhibidores de la desgranulación de mastocitos, como el cromoglicato. Se pueden también usar anti-histamínicos o corticosteroides, en particular en combinaciones o dosis más altas (véase el documento WO/2009/076105 y E.E.U.U. Nº Ser. 61/185.943, presentado el 10 de junio, 2009, publicado como WO 2010/144742).

Para la administración en seres humanos, una dosis preferida del agente quimérico Tat-NR2B9c puede ser, por ejemplo, de 0,1-20 mg/kg, 0,1-10 mg/kg o 0,5-3 mg/kg, 1-3 mg/kg, 2-3 mg/kg, 0,5-2 mg/kg o 2,7 mg/kg. Las dosificaciones indicadas deben entenderse como que incluyen el margen de error inherente a la precisión con que se pueden medir las dosis en un entorno hospitalario normal. Las dosis en ratas se pueden convertir a las dosis en seres humanos dividiendo por un factor de corrección de 6,2 que da cuenta de las diferentes áreas de superficie de las especies. Sin embargo, la dosis en ratas también se puede usar en seres humanos sin un factor de corrección de este tipo. Debido a la naturaleza extremadamente aguda de las lesiones penetrantes en el cerebro y otros componentes del SNC puede dejar muy poco espacio para una segunda administración si la la primera administración resulta inadecuada o insuficiente, se prefiere una dosis que se aproxime a la dosis máxima tolerada en algunos pacientes.

Las dosificaciones indicadas anteriormente son para el agente quimérico Tat-NR2B9c (YGRKKRRQRRRKLSSIESDV, SEQ ID Nº: 26). Se pueden determinar dosificaciones equivalentes para otros agentes para lograr el mismo efecto a través de varios enfoques. Para variantes cercanas de que el agente en el que están sustituidos, insertados o suprimidos uno o unos pocos aminoácidos y el peso molecular sigue siendo el mismo dentro de aproximadamente +/- 25%, las dosificaciones anteriores son aún una buena guía. Sin embargo, en general, para otros agentes, las dosificaciones equivalentes pueden variar dependiendo del peso molecular del agente con y sin péptido de internalización si está presente, su Kd para su diana, y sus parámetros farmacocinétcos y farmacodinámicos. Para algunos agentes, se pueden calcular dosificaciones equivalentes de manera que se

distribuya una cantidad equimolar del agente farmacológico. Para otro agente, se hace un ajuste adicional para tener en cuenta las diferencias en Kd o parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos. Para algunos agentes, se determinan dosificaciones equivalentes de modo empírico a partir de la dosis obtenida para alcanzar el mismo punto final en un modelo animal o en un ensayo clínico.

Agentes peptídicos, como Tat-NR2B9c, se suministran preferiblemente por infusión dentro de un vaso sanguíneo, más preferiblemente por infusión intravenosa. El tiempo de la infusión puede afectar tanto a los efectos secundarios (debido p. ej., a la desgranulación de mastocitos y liberación de histamina) como a la eficacia. En general, para un nivel de dosificación dado, un tiempo de infusión más corto es más probable que origine una liberación de histamina. Sin embargo, un tiempo de infusión más corto puede también dar como resultado una eficacia mejorada. Aunque la práctica de la invención no depende de una comprensión del mecanismo, se puede explicar el último resultado tanto por ser significativo el retraso en relación con el desarrollo de patología en el paciente como por ser ser significativo el retraso en relación a la vida media en plasma del agente quimérico, como resultado del cual el agente quimérico no alcanza un nivel terapéutico óptimo. Para el agente quimérico Tat-NR2B9c, un tiempo preferido de infusión que proporciona un equilibrio entre estas consideraciones es 5-15 minutos y más preferiblemente 10 minutos. Se deben entender los tiempos indicados como que incluyen un margen de error de +/- 10%. Los tiempos de infusión no incluyen ningún tiempo adicional para una difusión de lavado para eliminar cualquier gota restante de una difusión inicial que de otra manera se ha completado. Los tiempos de infusión para Tat-NR2B9c pueden también servir como una guía para otros agentes farmacológicos, opcionalmente unidos a péptidos de internalización, particularmente variantes cercanas de Tat-NR2B9c, como se discutió anteriormente.

VII. Composiciones farmacéuticas

Los agentes quiméricos u otros de la invención se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se fabrican típicamente bajo condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferentemente estériles (p. ej., esterilización por filtración de péptido) y libres de pirógenos. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma de dosificación unitaria (es decir, la dosificación para una única administración). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de la manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los agentes quiméricos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación correcta es dependiente de la ruta de administración elegida.

Una formulación ejemplar del agente quimérico Tat-NR2B9c contiene el péptido en solución salina normal (0,8-1,0% y preferiblemente 0,9% de solución salina) a una concentración de 10-30 mg/ml, por ejemplo 18-20 mg/ml. Cuando se almacena congelada, una composición de este tipo es estable (degradación o agregación del péptido insignificante) durante un periodo de 2 o más años. Aunque se pueden añadir excipientes adicionales, la solución salina normal sin tales excipientes es suficiente para obtener esta estabilidad. Para usar una composición de este tipo se descongela y se diluye en un volumen mayor de solución salina normal para la infusión en un vaso sanguíneo. Se puede hacer otra composición por liofilización del agente quimérico Tat-NR2B9c a una concentración de 1-50 mg/ml en solución salina normal en presencia o ausencia de excipientes. Tales excipientes pueden incluir aquellos para aumentar la estabilidad o inhibir el crecimiento bacteriano, viral o de otro patógeno que pueda degradar el fármaco. La composición liofilizada es estable a -20ºC o a temperatura ambiente. La composición liofilizada se puede reconstituir en solución salina normal (es decir, reconstituido con el fin de proporcionar Tat-NR2B9c en solución salina normal).

Ejemplos

1. Modelo de rata de lesión cerebral penetrante

Se sometieron ratas macho Sprague-Dawley (250-300 g) a una herida balística simulada en el hemisferio frontal derecho implementado por una sonda penetrante hinchable. Se compararon tres niveles de gravedad de la lesión con animales control. Se evaluó el resultado neurológico y fisiológico durante un periodo de recuperación de 3 días y se recogió el tejido cerebral a las 72 h para evaluación histopatológica. Las regiones con lesiones cerebrales incluyen la corteza frontal ipsilateral y el cuerpo estriado con aumentos volumétricos de hemorragia intracraneal (5-18 mm3) y de tamaño de lesión (9-86 mm3) en relación con la severidad. De manera similar, aumentó la inflamación hemisférica (3-14%) después de PBI, asociada con un aumento significativo de la presión intracraneal. La astrogliosis estaba presente en regiones adyacentes al núcleo de la lesión junto con infiltración microgrial y de leucocitos. Se observó una lesión remota a la lesión en el pedúnculo cerebral que puede haber explicado, en parte, las deficiencias neurológicas observadas. Las pruebas neurológicas y de la barra de equilibrio revelaron deficiencias que persistieron a través de 72 h. Alteraciones electroencefalográficas graves incluyen la aparición de depresión de difusión cortical, ondas lentas, y actividad convulsiva cerebral. En conclusión, este modelo de PBI en rata reproduce diversas características sobresalientes de la patología clínica de PBI, genera medidas reproducibles y cuantificables del resultado, y es escalable según la gravedad de la lesión, convirtiéndolo en un medio atractivo para la investigación experimental del trauma cerebral. El modelo se describe adicionalmente por Williams et al., *J. Neurotrauma* 22, 313-331 (2005).

2. Tratamiento de la lesión penetrante

Se administró Tat-NR2B9c *i.v.* en la vena yugular por una infusión de 8 minutos 30 minutos después inducir la lesión cerebral. Las ratas se sacrificaron para el examen histológico después de 7 días. La dosis de Tat-NR2B9c era Estudio I: 0,5 y 5,0 mg/ml/kg y Estudio II: 0,05, 0,275, y 0,5 mg/ml/kg. Las ratas se sometieron a los siguientes tratamientos en los Estudios I y II (simulacro= rata no sometida a lesión balística), PBBI= lesión cerebral balística penetrante, veh= vehículo).

Estudio 1

- SHAM/veh (n=10)
- PBBI/veh (n=10)
- PBBI, Tat-NR2B9c 0,5 mg/kg (n=10)
- PBBI, Tat-NR2B9c 5,0 mg/kg (n=10)

Estudio 2

- SHAM/veh (n=10)
- PBBI/veh (n=10)
- Tat-NR2B9c 0,05 mg/kg (n=10)
- Tat-NR2B9c 0,275 mg/kg (n=10)
- Tat-NR2B9c 0,50 mg/kg (n=10)

El peso corporal se evaluó en el tiempo 0 (línea de base), 24, 72 h y 7 días después de la lesión. La temperatura corporal se evaluó en el tiempo 0, 30 min (antes del tratamiento), 2, 24, 72 h, y 7 días después de la lesión. Se evaluó el neuroscore a 0, 30 min (antes del tratamiento), 24, 72 h, 7 días después de la lesión. Se evaluó la barra de equilibrio a 0, 3, y 7 días después de la lesión. La prueba de rendimiento rotarod se evaluó a tiempo 0 y 7 días después de la lesión.

El Estudio evaluó dos concentraciones de Tat-NR2B9c (0,5 mg/kg y 5,0 mg/kg) (n=10 cada grupo) con un periodo de supervivencia de 1 semana. En base a los resultados del Estudio 1, el Estudio 2 evaluó dos concentraciones más bajas de Tat-NR2B9c (0,05 mg/kg y 0,275 mg/kg) y repitió la dosis de 0,5 mg/kg del Estudio 1. Los puntos finales de comportamiento y de histología para ambos experimentos incluyeron evaluaciones neurológicas en neuroscore, pruebas de barra de equilibrio, y de rendimiento rotarod, y reconstrucción de la lesión en las secciones teñidas con H&E. Todas las ratas PBBI mostraron deterioro neurológico significativo hasta 7 días después de la lesión.

Las Figs. 1A y B muestra el neuroscore en los Estudios 1 y 2. En el estudio 1, la dosis de Tat-NR2B9c produjo una disminución significativa de las deficiencias neurológicas inducidas por PBBI a las 72 horas posteriores a la PBBI. En el Estudio 2, la dosis de 0,5 mg/kg de Tat-NR2B9c demostró ser la más eficaz para disminuir las deficiencias neurológicas inducidas por la lesión a los 3 y 7 días posteriores de PBBI. Columnas=medias; barras de error=SEM; +p<,05 en comparación con PBBI; †p<,05 en comparación con 0,05 mg/kg de Tat-NR2B9c; #p<,05 mg/kg en comparación con 0,275 mg/kg de Tat-NR2B9c.

La Fig. 2A muestra la media total de faltas de pie en una barra de equilibrio (contra- e ipsilateral combinada) promediada a partir de 3 ensayos consecutivos. Se asignó una puntuación máxima de faltas de pie de 18 (12 contralaterales; 6 ipsilaterales) cuando los animales eran incapaces de cruzar la barra. La parte superior de la Fig. 2A incluye un total de 7 ratas (tres PBBI, dos dosis bajas de Tat-NR2B9c, y dos dosis altas de Tat-NR2B9c de 10 animales por grupo) incapaces de cruzar la barra a los 3 días después de PBBI que se asignaron puntuaciones máximas de faltas de pie. A los 7 días después de PBBI, con la excepción de un animal con una dosis alta de Tat-NR2B9c, todas las ratas fueron capaces de cruzar la barra. La parte inferior de la Fig. 2 incluye un total de 8 ratas (tres PBBI, tres dosis bajas de Tat-NR2B9c, una dosis media de Tat-NR2B9c, y una dosis alta de Tat-NR2B9c de 10-11 animales por grupo) incapaces de cruzar la barra a los 3 días después de PBBI que se asignaron puntuaciones máximas de faltas de pie. A los 7 días después de PBBI, con la excepción de un PBBI y una dosis baja de Tat-NR2B9c, todas las ratas fueron capaces de cruzar la barra. *p<,05 en comparación con PBBI; †p<,05 en comparación con 0,05 mg/kg de Tat-NR2B9c.

La Fig. 2B muestra la media de faltas de pie por ensayo (contralateral al sitio de la lesión, solamente) promediadas a partir de 3 ensayos consecutivos. Se asignó una puntuación total de faltas de pie máxima de 12 cuando los animales eran incapaces de cruzar la barra. La parte superior de la Fig. 2B del Estudio 1 incluye un total de 7 ratas (tres PBBI, dos dosis bajas de Tat-NR2B9c, y dos dosis altas de Tat-NR2B9c) incapaces de cruzar la barra a los 3 días posteriores de PBBI a los que se asignaron puntuaciones máximas de faltas de pie. A los 7 días después de PBBI,

con la excepción de un animal con dosis alta de Tat-NR2B9c, todas las ratas fueron capaces de cruzar la barra. La parte inferior de la figura del Estudio 2 incluye un total de 8 ratas (tres PBBI, tres dosis bajas de Tat-NR2B9c, una dosis media de Tat-NR2B9c, y una dosis alta de Tat-NR2B9c) incapaces de cruzar la barra a los 3 días posteriores de PBBI a los que se asignaron puntuaciones máximas de faltas de pie. A los 7 días después de PBBI, con la excepción de un PBBI y una dosis baja de Tat-NR2B9c, todas las ratas fueron capaces de cruzar la barra. *p<,05 en comparación con PBBI.

La Fig. 2C muestra la media de faltas de pie realizadas por segmento de barra contralateral al sitio de la lesión. Para ambos estudios dosis-respuesta, las ratas se entrenaron para criterios en barra estrecha de equilibrio antes de PBBI y se analizaron a los 3 y 7 días después de PBBI (3 ensayos de cada punto de tiempo). Después de PBBI, todos los grupos lesionados mostraron anormalidades motoras significativas en la tarea de la barra de equilibrio en ambos puntos de tiempo examinados, con faltas de pie aumentando en frecuencia a medida que la barra se estrechaba en anchura (S1-S3 = segmento de barra más ancho-más estrecho). La parte superior de la Fig. 2C basada en el Estudio 1 muestra 3 días después de PBBI, los animales tratados con la dosis de 0,5 y 5,0 mg/kg de Tat-NR2B9c realizan significativamente menos faltas de pie que las ratas PBBI, particularmente en el segmento más estrecho de la barra (S3). La parte inferior de la Fig. 2C del Estudio 2 muestra 3 días después de PBBI, los animales tratados con 0,275 y 0,50 mg/kg de Tat-NR2B9c realizan menos faltas de pie que los animales PBBI en el segmento más estrecho de la barra. Columnas = medias; barras de error = SEM; *p<,05 en comparación con PBBI.

Las Figs. 3A y B muestran los estudios de dosis-respuesta en una prueba de rendimiento de rotarod. Las ratas se entrenaron según los criterios de la versión de velocidad fija de la tarea de rotarod antes de PBBI y se probaron a los 7 días después de PBBI. La Fig. 3A muestra a partir del Estudio 1 que la dosis de 0,5 mg/kg de Tat-NR2B9c promovío una significativa recuperación (a niveles de SHAM) a las dos velocidades más bajas (10-15 rpm) pero no a velocidades más altas (20-25 rpm) en la tarea de rotarod. La Fig. 3B muestra a partir del Estudio 2 que la dosis de 0,5 mg/kg de Tat-NR2B9c era más eficaz que la dosis más baja en disminuir anormalidades motoras inducidas por PBBI en la tarea de rotarod. Columnas = medias; barras de error = SEM; *p<,05 en comparación con PBBI.

Las Figs. 4A, B, C muestran efectos dosis-respuesta de Tat-NR2B9c (0,5 y 5,0 mg/kg solamente) en la neuropatología PBBI. La administración posterior a la lesión de Tat-NR2B9c (cualquier dosis) no disminuyó significativamente el volumen global de la lesión (panel derecho A, B). Sin embargo, hubo una tendencia, particularmente en las secciones más caudales (panel izquierdo B, C) que proporcionan evidencia de que Tat-NR2B9c (ambas dosis) disminuyó la extensión (es decir, volumen) de la lesión. Columnas/puntos de datos = medias; barras de error = SEM; *p<,05 con 0,5 mg de Tat-NR2B9c (NA1) en comparación con PBBI; †p<,05 con 5,0 mg de Tat-NR2B9c (NA1) en comparación con PBBI.

Las Figs. 5A-5D muestran los efectos de tratar animales PBBI con una dosis más alta de Tat-NR2B9c (20 mg/kg). Al igual que los experimentos anteriores, se administró Tat-NR2B9c como un bolo lento (8 minutos) 30 minutos después de PBBI. La Fig. 5A muestra que los animales tratados con Tat-NR2B9c mostraron una mejora consistente en neuroscore, incluso después de 7 días. La Fig. B muestra que los animales tratados con Tat-NR2B9c mostraron significativamente un mejor rendimiento en las tareas de rotarod, especialmente a velocidades bajas. La media de las latencias de rotarod a través de las velocidades fueron >2 veces mayores en el grupo Tat-NR2B9c (NA1) (20 mg/kg) en relación con las ratas PBBI tratadas con vehículo (medias: PBBI/veh = 13±3 s: * Tat-NR2B9c (NA1) 20 mg/kg = 29±3 s; *p<,05). Tanto las ratas PBBI Tat-NR2B9c como las tratadas con vehículo mostraron curvas de aprendizaje similares durante la fase de adquisición de la tarea de Morris Water Maze (MWM). Sin embargo, Tat-NR2B9c (20 mg/kg) dio como resultado una mejora de dos veces en la retención de memoria en el ensayo de la sonda, medido por el % de tiempo empleado explorando la zona de plataforma que falta (Figs. 5C y 5D; medias: PBBI/veh = 15±2%; Tat-NR2B9c 20 mg/kg = 29±4%; *p<,05). El tratamiento con Tat-NR2B9 (20 mg/kg) también dio como resultado uns disminución significativa (33%) en el volumen total de la lesión por tinción con TTC (medias: PBBI/veh = 56±7 mm^3; *Tat-NR2B9c (NA1 (20 mg/kg) = 37±4 mm^3; *p<,05).

Las Figs. 6A-D muestran los efectos de regímenes de dosificación múltiple en el neuroscore, rotarod y ejecución de MWM. Los animales recibieron cuatro inyecciones de Tat-NR2B9c después de PBBI a los 30 minutos, 24 horas, 48 horas y 72 horas. Los regímenes de dosificación múltiple dieron mejoras motoras y neurocognitivas similares al régimen de dosificación única a 20 mg/kg, y posiblemente una mejora en la ejecución de MWM a los 5 o más días. Por lo tanto, estos experimentos demuestran que Tat-NR2B9c es capaz de proporcionar neuroprotección y mejorar los beneficios motores, cognitivos y de memoria después de lesiones cerebrales traumáticas.

En los grupos de tratamiento Tat-NR2B9c, se observó un pequeño efecto hipotérmico (aproximadamente 2 grados C, medidos en el recto) aproximadamente 90 minutos después de PBBI (60 minutos después de la dosificación). Esto es un beneficio potencial para los pacientes, porque la hipertermia (es decir, una reducción de la temperatura corporal sensible al tratamiento) después de accidente cerebrovascular o lesiones cerebrales se correlaciona negativamente con el resultado. Por lo tanto, un fármaco que puede disminuir la temperatura después de la lesión cerebral es probable que mejore los resultados.

En general, los resultados indican que Tat-NR2B9c protege frente a anormalidades motoras inducidas por lesión en el modelo PBBI siendo la dosis de 0,5 mg/kg siendo la más eficaz. La dosis de 0,5 mg/kg de Tat-NR2B9c dio como resultado una mejora significativa del neuroscore (Fig. 1A) y ejecución de rotarod (Fig. 3A). Tat-NR2B9c también

disminuyó las faltas de pie contralaterales en la barra de equilibrio (analizado por segmento de barra) a los 3 días después de la lesión (véase Fig. 2C). El análisis histológico de las secciones teñidas con H&E, que comparan dosis de Tat-NR2B9c con PBBI en el Estudio 1 no alcanzaron un efecto neuroprotector sinificativo en el volumen total de la lesión (Figs. 4A, B, C). Sin embargo, hubo una tendencia, particularmente en las secciones más caudales, que proporciona evidencia de que Tat-NR2B9c (ambas dosis) fue eficaz en disminuir la extensión de la lesión (véase Fig. 4; gráfico de progresión de la lesión). Esta tendencia mejoraba con animales adicionales probados para demostrar una disminución del 33% en el volumen de infarto en animales tratados con 20 mg/kg de Tat-NR2B9c. Las Figs. 5 y 6 también demuestran que los tratamientos con dosificación única o múltiple con Tat-NR2B9c protegen contra las deficiencias de aprendizaje y cognitivas observadas después de las lesiones cerebrales. Los resultados constituyen evidencia de que Tat-NR2B9c puede proporcionar un beneficio terapéutico para la lesión penetrante del SNC.

En caso de cualquier variación en las secuencias asociadas con los números de acceso a Genbank y UnitProtKB/Swiss-Prot y similares, la solicitud se refiere a las secuencias asociadas con los números de acceso citados del 12 de agosto de 2010, la fecha a partir de la cual la presente solicitud deriva prioridad.

Lista de secuencias

<110> NONO, INC.
ARBOR VITA CORPORATION

<120> TRATAMIENTO DE UNA LESIÓN PENETRANTE EN EL CEREBRO

<130> 057774-397847

<140>
<141>

<150> 61/373,204
<151> 12-08-2010

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 1

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

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 2

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

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 3

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

<210> 4
<211> 22
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 4

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

Lys Arg Gly Tyr Ile Asn
20

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val
1 5

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

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 6

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

Glu Ser Asp Val
20

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> Descripción de desconocido: dominio PDZ secuencia peptídica de repeticiones "GLGF"

<400> 7

Gly Leu Gly Phe
1

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Glu, Gln, Ala o un análogo de los mismos

<220>

<221> MOD_RES
<222> (2) .. (2)
<223> Thr or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Ala, Gln, Asp, Asn, N-Me-Ala, N-Me-Gln, N-Me-Asp, N-Me-Asn o un análogo de los mismos

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 8

Xaa Xaa Xaa Val
1

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Glu Ser Asp Val
1 5

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 10

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

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<400> 12

Glu Ser Asp Val
1

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

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 26

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> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Ser Thr Val Val
1

<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

His Arg Glu Ser
1

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Ser Glu Val
1

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Thr Cys Glu Ser
1

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Thr Ser Ile
1

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Thr Gly Leu
1

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Val Lys Ile
1

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Ser Asp Leu Pro
1

<210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Thr Val Ala
1

<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Glu Thr Met Ala
1

<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 37

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

Glu Ser Asp Val
20

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

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido de consenso sintético

<220>
<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
<223> Glu, Asp, Asn o Gln

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2) .. (2)
<223> Ser or Thr

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

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

<400> 38

Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Glu Thr Asp Val
1

<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Thr Glu Val
1

<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Asp Thr Asp Val
1

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Asp Thr Glu Val
1

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val
1 5

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

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 44

Gly Ser Ser Ser Ser
1 5

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

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 45

Thr Gly Glu Lys Pro

1 5

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

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: 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> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 47

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

<210> 48
<211> 13
<212> PRT
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 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> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cuanqluier aminoácido excepto Tyr o ausente

<400> 49

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

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 50

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

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 51

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

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 52

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

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 53

```
Xaa Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1               5                   10
```

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 54

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

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 55

Xaa Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 56

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

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 57

Xaa Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 58

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

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 59

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 60

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

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 61

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg
1 5 10

<210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 62

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

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 63

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

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 64

```
Xaa Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg
1               5                   10
```

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 65

```
Xaa Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg
1               5                   10
```

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 66

```
Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg
1               5
```

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido o ausente

<220>
<223> ver la memoria tal como se ha presentado para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 67

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg
1 5

<210> 68
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 68

Phe Gly Tyr Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Thr Asp Val
20

<210> 69
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 69

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

Glu Thr Asp Val
20

REIVINDICACIONES

1. Un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD-95 a un NMDAR para su uso en el tratamiento o efectuar profilaxis de un efecto perjudicial de lesión penetrante en el SNC.

2. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene una herida de bala en la cabeza o materia sólida liberada por explosión; o el sujeto es una persona militar o policial en riesgo de recibir un disparo.

3. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto está libre de y/o sin riesgo aumentado de otra enfermedad susceptible de tratamiento con el agente farmacológico.

4. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 1, en donde el agente farmacológico comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende T/SXV/L unido a un péptido de internalización.

5. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 1, en donde el agente farmacológico comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende:

(i) [E/D/N/Q]- [S/T]- [D/E/Q/N]- [V/L] (SEQ ID Nº: 38) unido a un péptido de internalización, y/o

(ii) 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), o DTEV (SEQ ID Nº: 42) unido a un péptido de internalización.

6. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 1, en donde el agente farmacológico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en KLSSIESDV (SEQ ID Nº: 5) o KLSSIETDV (SEQ ID Nº: 43) unida a un péptido de internalización.

7. El agente farmacológico para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde el péptido de internalización es un péptido tat.

8. El agente farmacológico para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde el péptido de internalización tiene una secuencia de aminoácidos que comprende XGRKKRRQRRR (SEQ ID Nº: 49), en donde X es:

(i) un aminoácido distinto de Y o ninguno, y/o

(ii) F (SEQ ID Nº: 3).

9. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 1, en donde el agente farmacológico tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID Nº: 26) o YGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID Nº: 69).

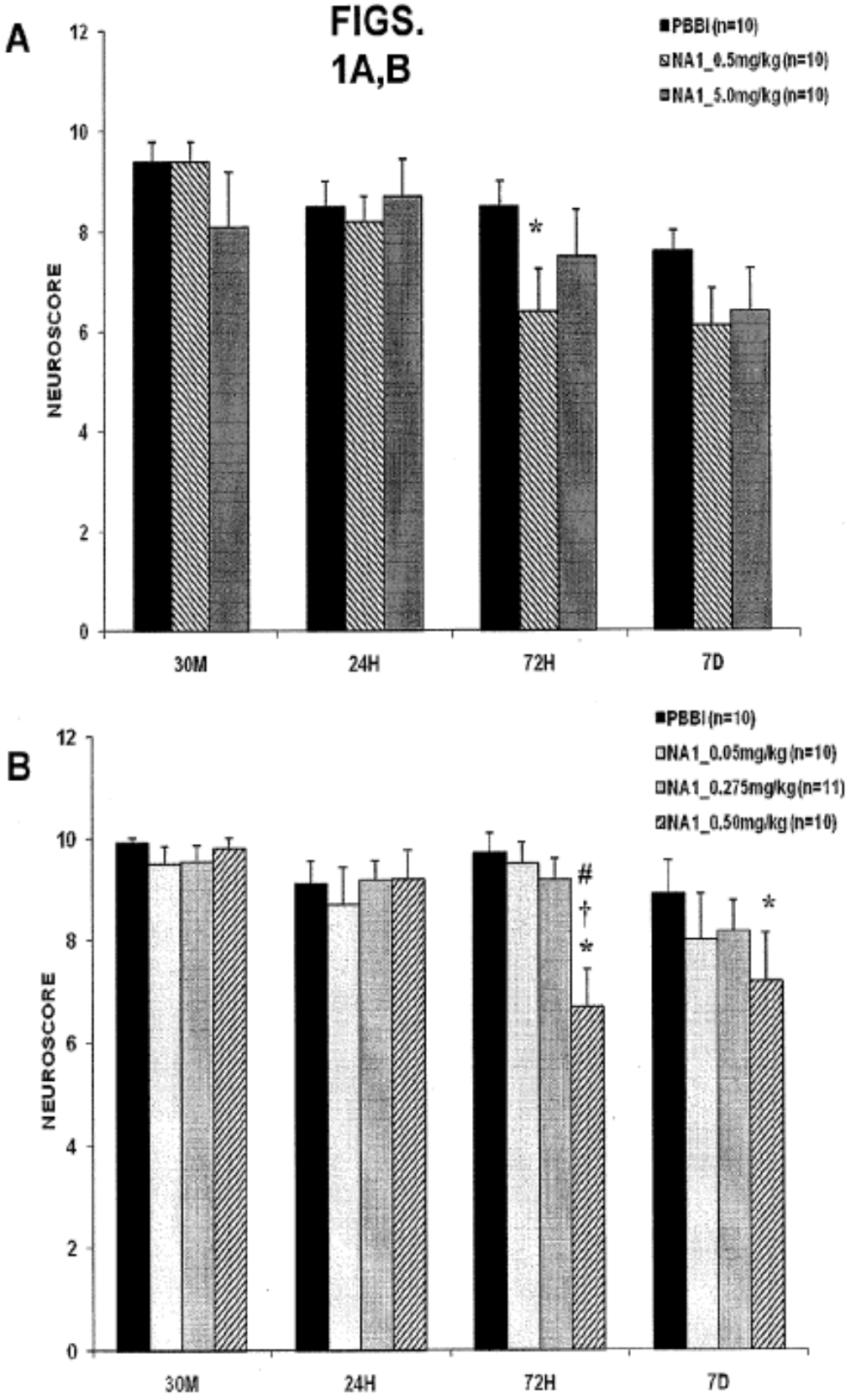
10. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 1, en donde la dosis es 0,1-10 mg/kg.

11. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 10, en donde se administra un única dosis por episodio de lesión penetrante o riesgo de la misma y/o el agente farmacológico se administra por infusión intravenosa.

12. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 1, en donde el uso comprende además monitorizar al sujeto por deficiencias neurológicas de la lesión penetrante.

13. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 12, en donde la monitorización determina el funcionamiento cognitivo y/o la patología.

14. El agente farmacológico para uso de la reivindicación 1, en donde la temperatura del sujeto se reduce en respuesta al agente farmacológico que se administra.


FIGS.
1A,B
A
PBBI (n=10)
NA1_0.5mg/kg (n=10)
NA1_5.0mg/kg (n=10)
NEUROSCORE
0
2
4
6
8
10
12
*
30M
24H
72H
7D
B
PBBI (n=10)
NA1_0.05mg/kg (n=10)
NA1_0.275mg/kg (n=11)
NA1_0.50mg/kg (n=10)
NEUROSCORE
0
2
4
6
8
10
12
#
†
*
*
30M
24H
72H
7D

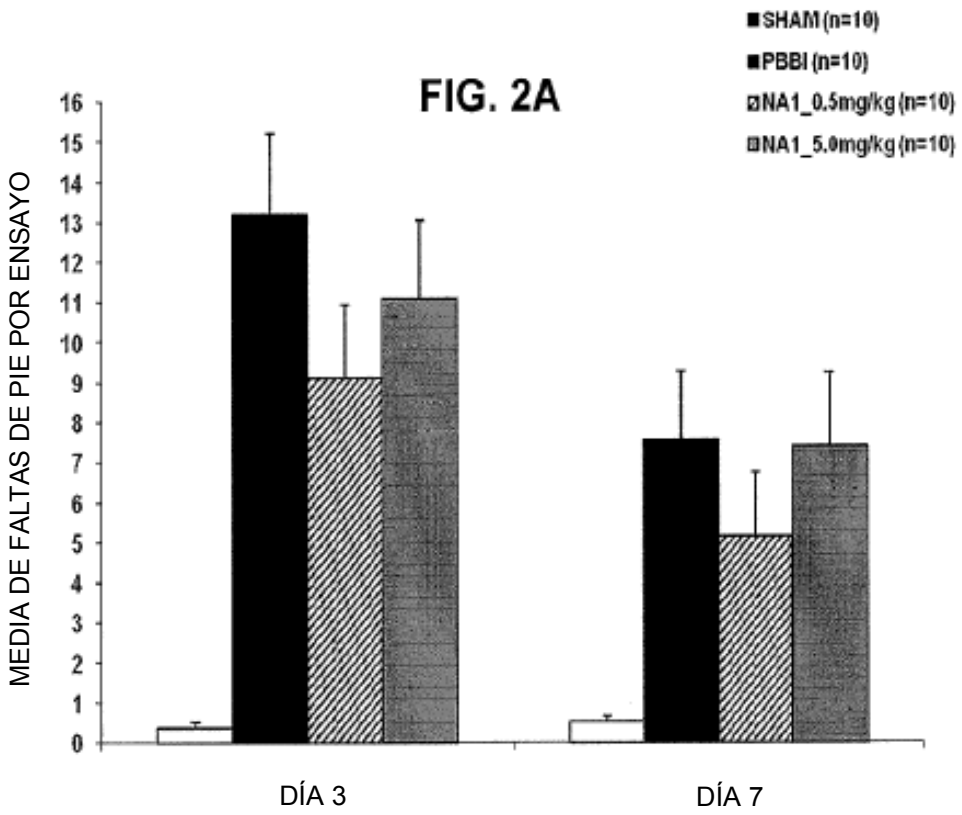
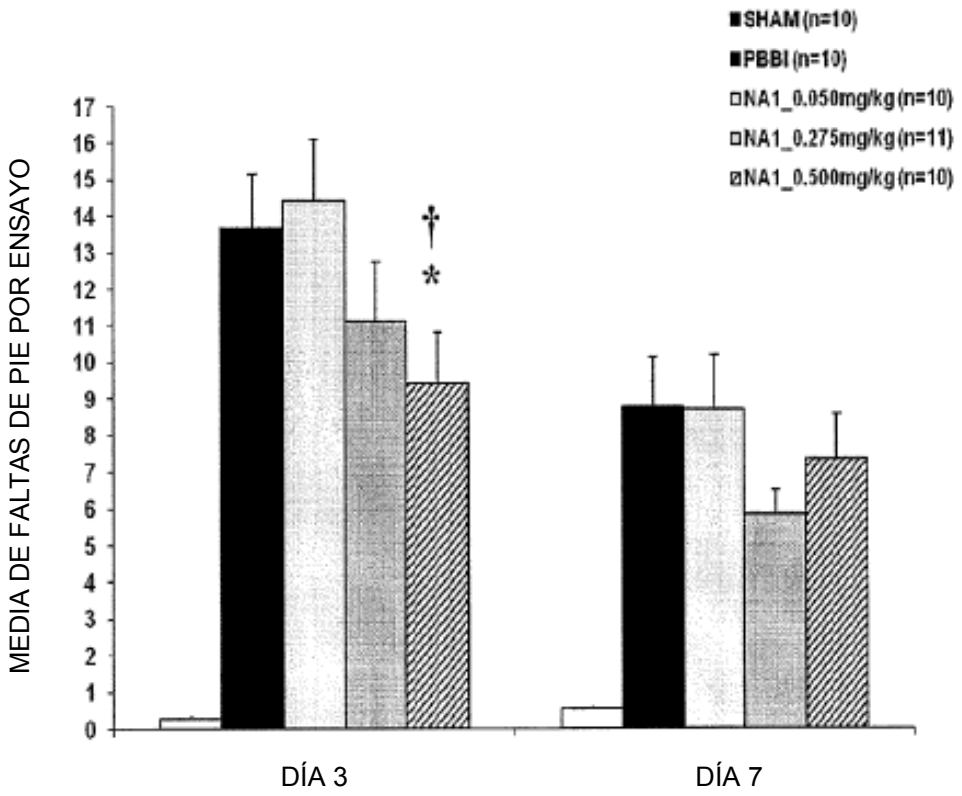


FIG. 2A
SHAM (n=10)
PBBI (n=10)
NA1_0.5mg/kg (n=10)
NA1_5.0mg/kg (n=10)
MEDIA DE FALTAS DE PIE POR ENSAYO
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
DÍA 3
DÍA 7


SHAM (n=10)
PBBI (n=10)
NA1_0.050mg/kg (n=10)
NA1_0.275mg/kg (n=11)
NA1_0.500mg/kg (n=10)
MEDIA DE FALTAS DE PIE POR ENSAYO
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
†
*
DÍA 3
DÍA 7

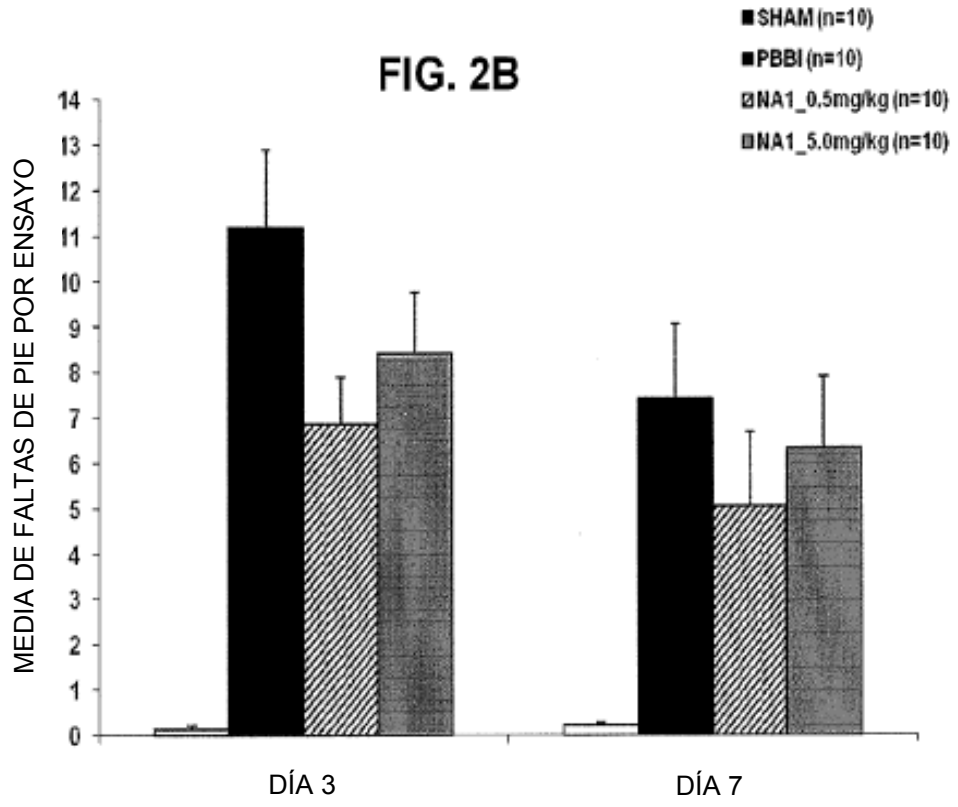
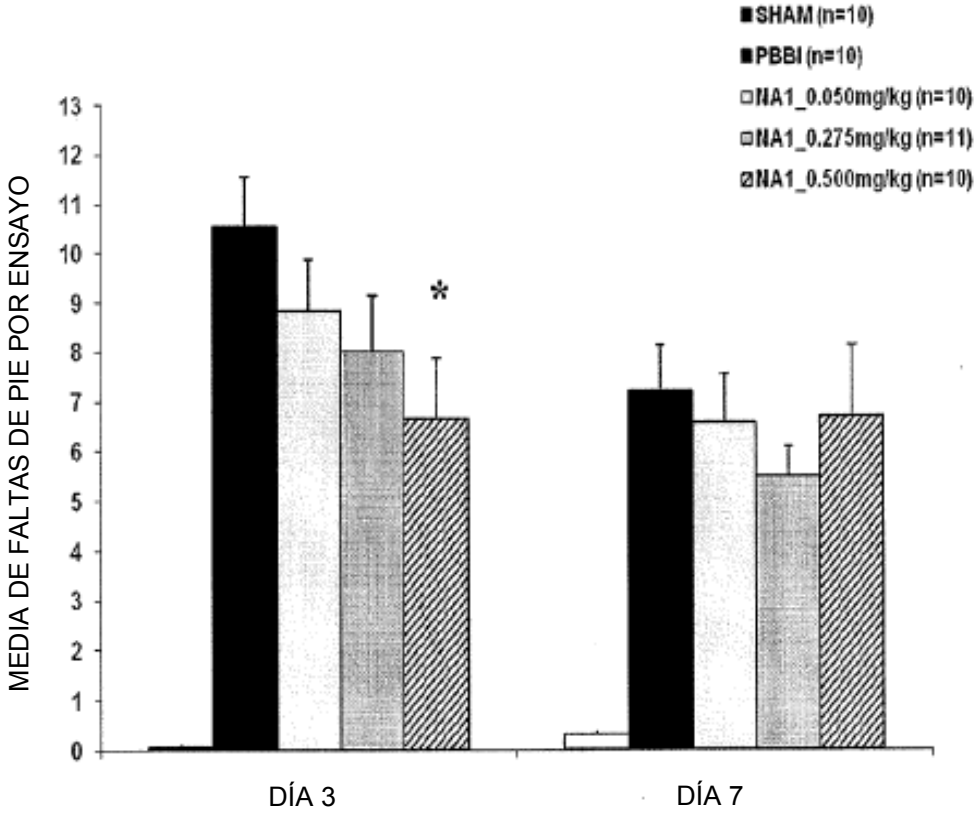


FIG. 2B
SHAM (n=10)
PBBI (n=10)
NA1_0.5mg/kg (n=10)
NA1_5.0mg/kg (n=10)
MEDIA DE FALTAS DE PIE POR ENSAYO
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
DÍA 3
DÍA 7


SHAM (n=10)
PBBI (n=10)
NA1_0.050mg/kg (n=10)
NA1_0.275mg/kg (n=11)
NA1_0.500mg/kg (n=10)
MEDIA DE FALTAS DE PIE POR ENSAYO
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
*
DÍA 3
DÍA 7

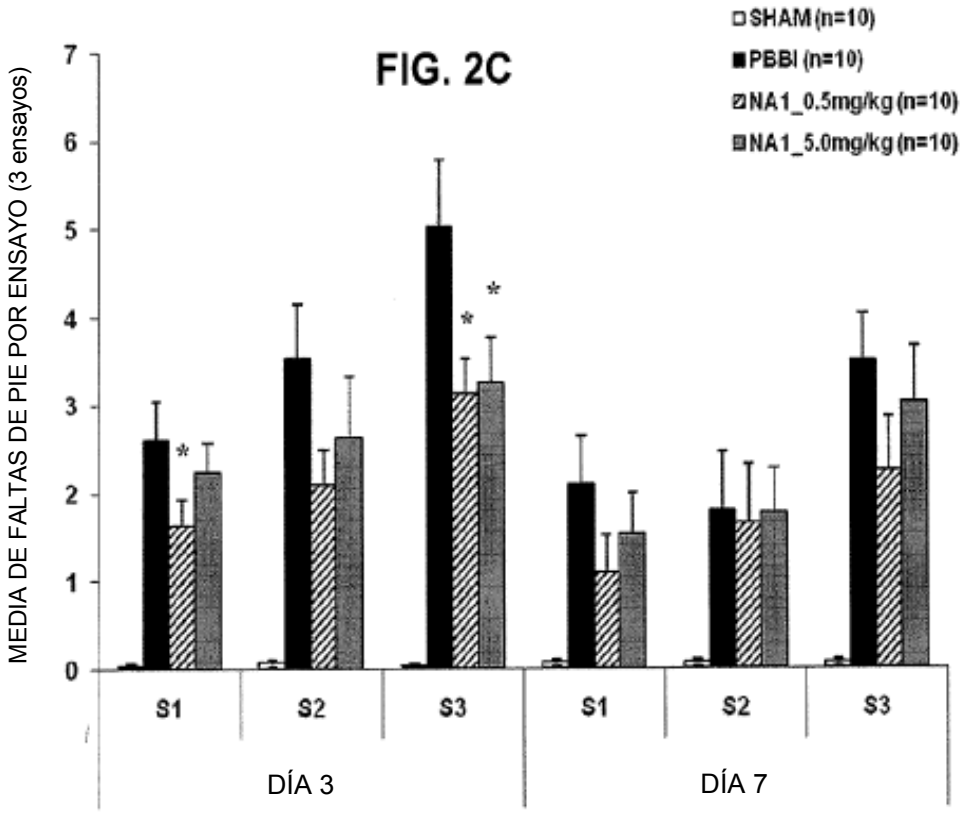
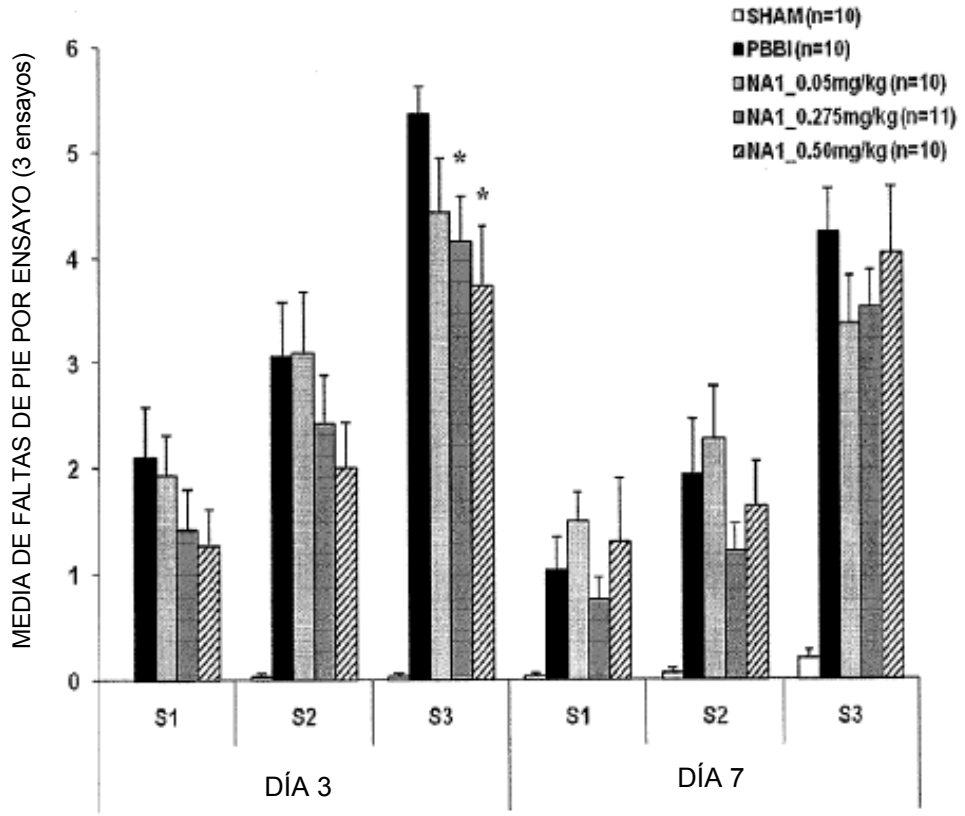
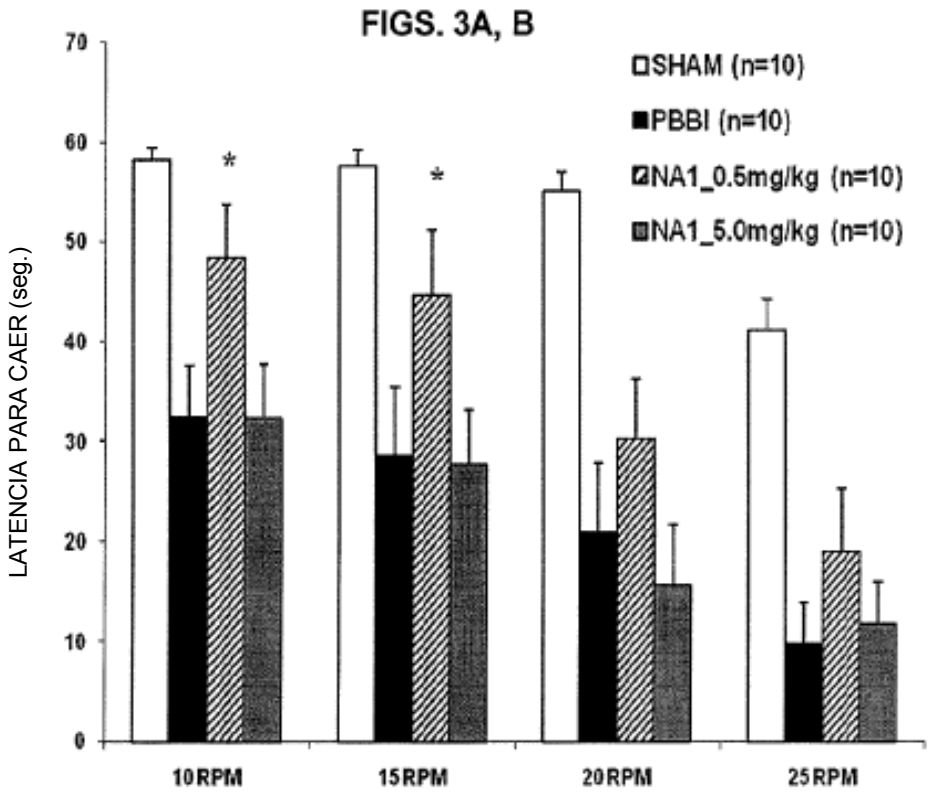
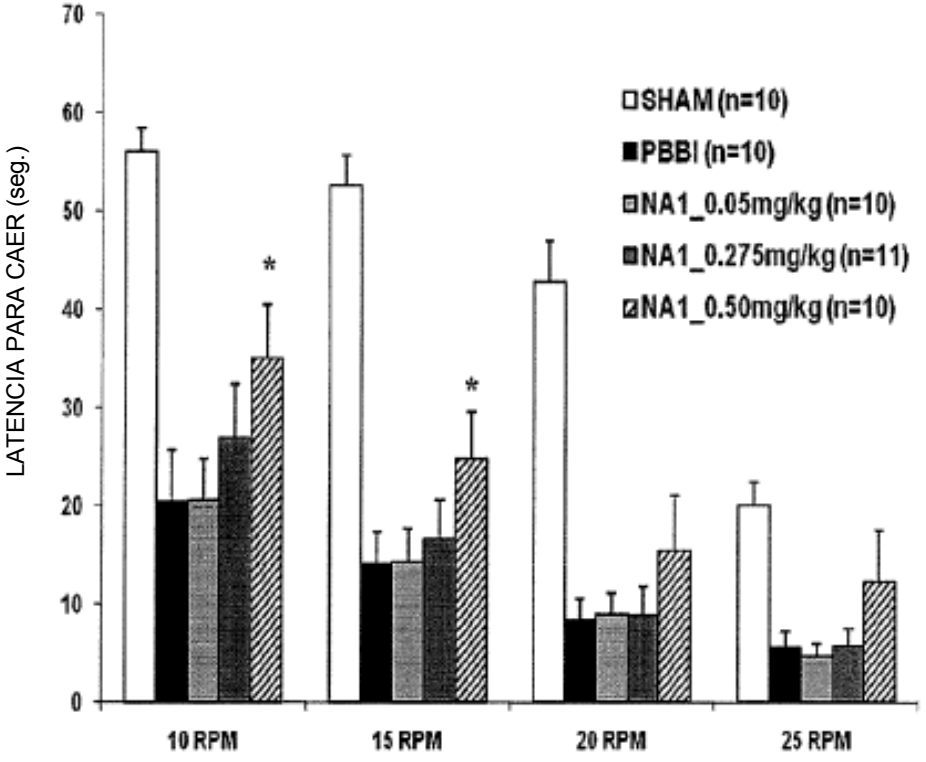


FIG. 2C
SHAM (n=10)
PBBI (n=10)
NA1_0.5mg/kg (n=10)
NA1_5.0mg/kg (n=10)
MEDIA DE FALTAS DE PIE POR ENSAYO (3 ensayos)
0
1
2
3
4
5
6
7
S1
S2
S3
S1
S2
S3
DÍA 3
DÍA 7

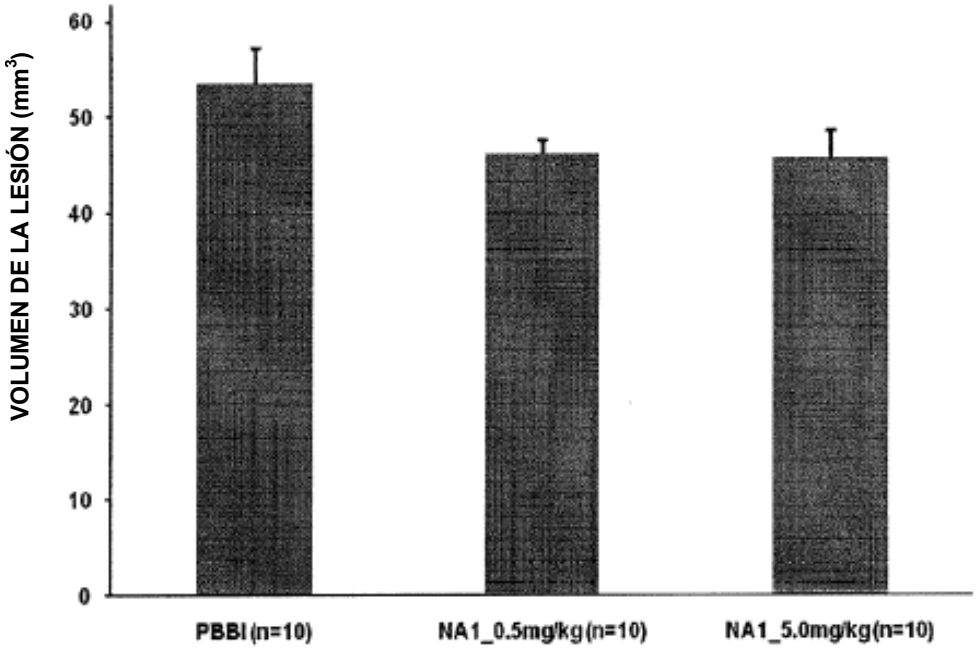

SHAM (n=10)
PBBI (n=10)
NA1_0.05mg/kg (n=10)
NA1_0.275mg/kg (n=11)
NA1_0.50mg/kg (n=10)
MEDIA DE FALTAS DE PIE POR ENSAYO (3 ensayos)
0
1
2
3
4
5
6
S1
S2
S3
S1
S2
S3
DÍA 3
DÍA 7


FIGS. 3A, B
SHAM (n=10)
PBBI (n=10)
NA1_0.5mg/kg (n=10)
NA1_5.0mg/kg (n=10)
LATENCIA PARA CAER (seg.)
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
10RPM
15RPM
20RPM
25RPM


SHAM (n=10)
PBBI (n=10)
NA1_0.05mg/kg (n=10)
NA1_0.275mg/kg (n=11)
NA1_0.50mg/kg (n=10)
LATENCIA PARA CAER (seg.)
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
10 RPM
15 RPM
20 RPM
25 RPM

FIGS. 4A, B (IZQUIERDA)

A. VOLUMEN DE LA LESIÓN



B. PROGRESIÓN DE LA LESIÓN

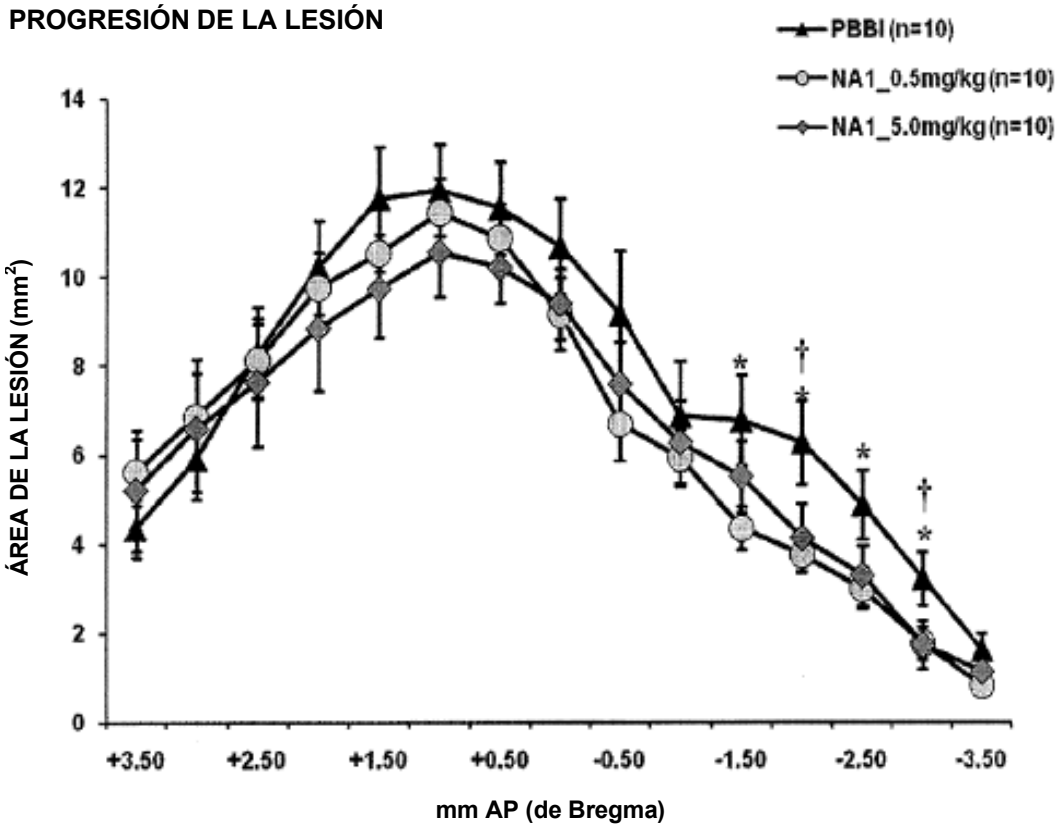


FIG. 4B (derecha)

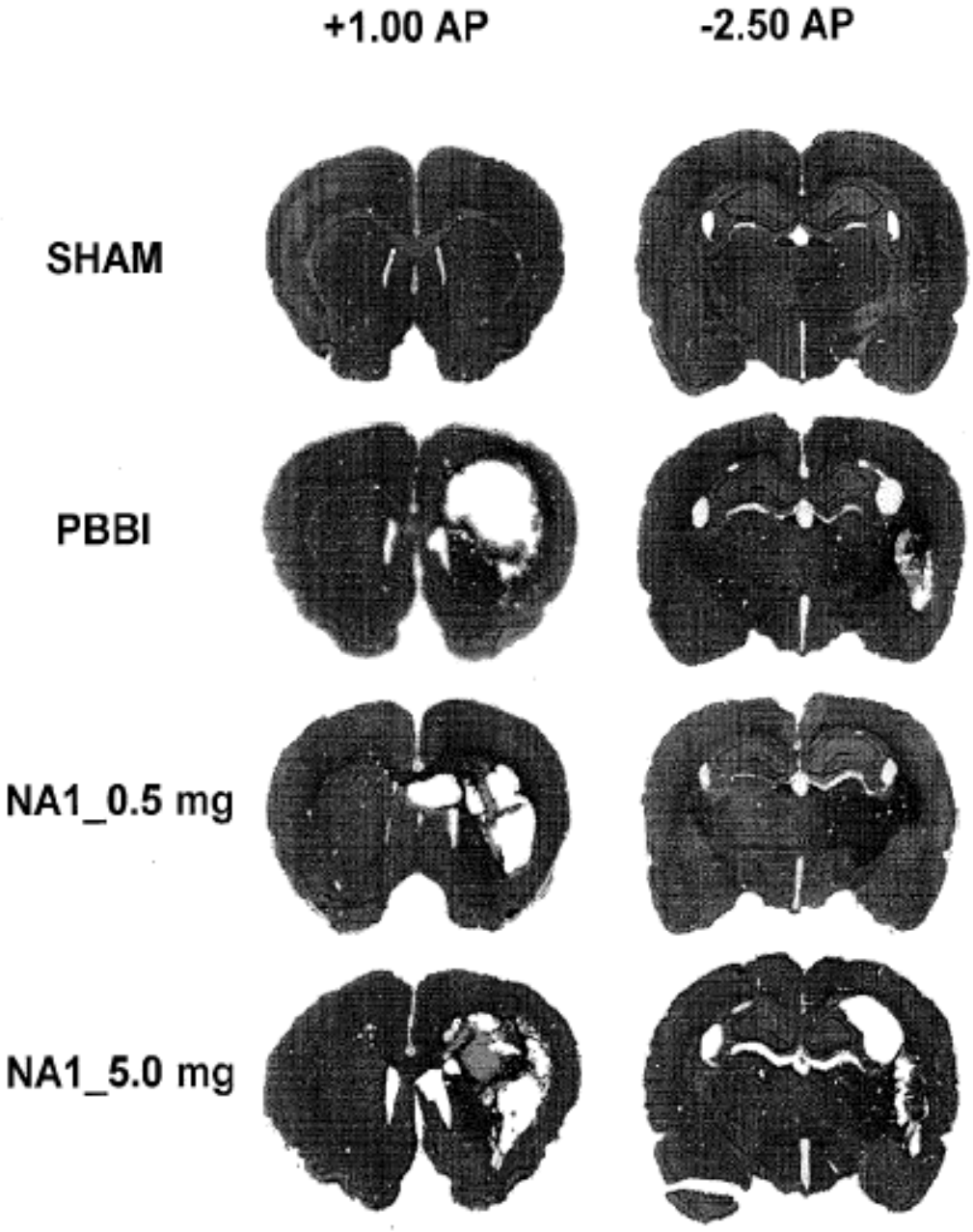
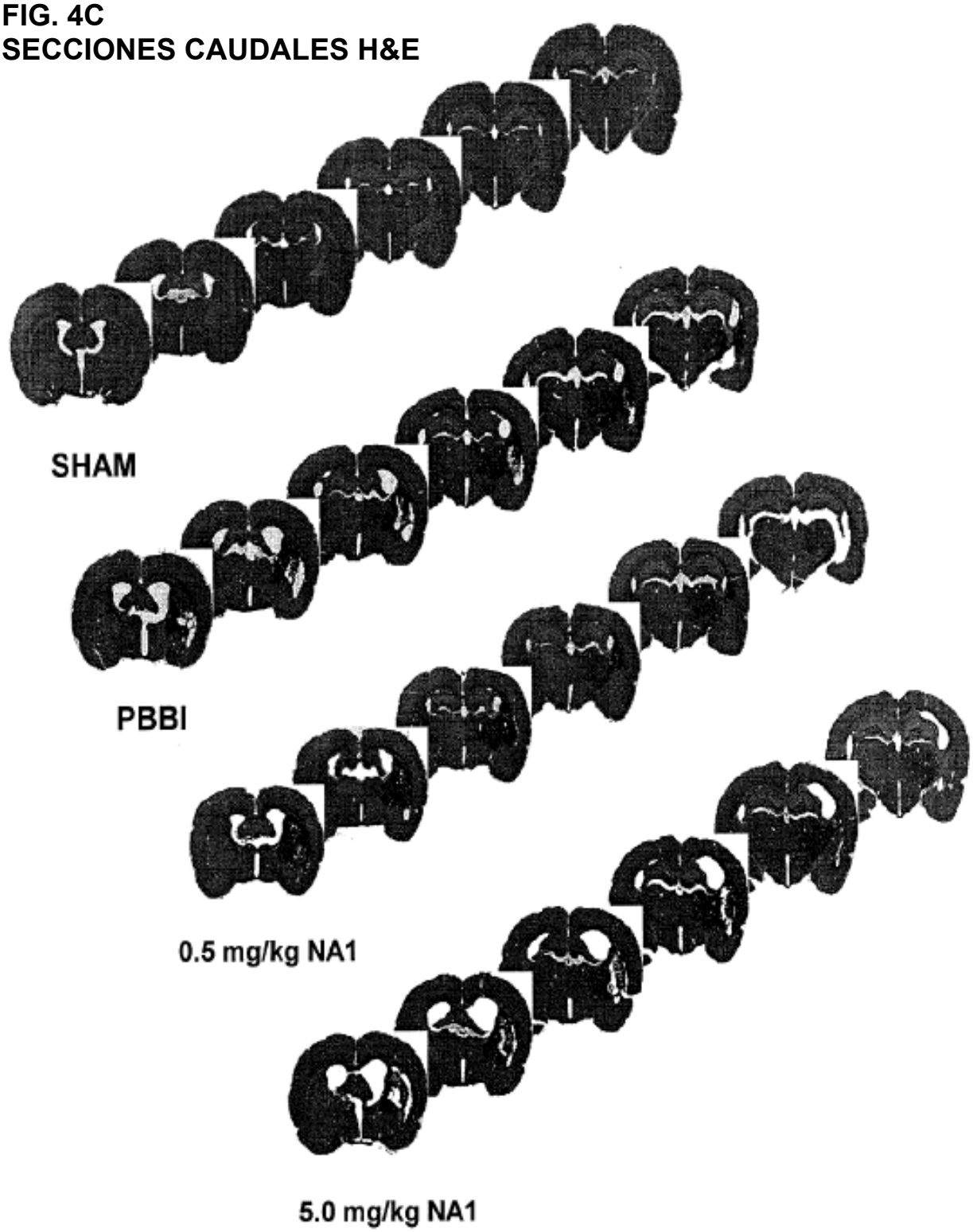
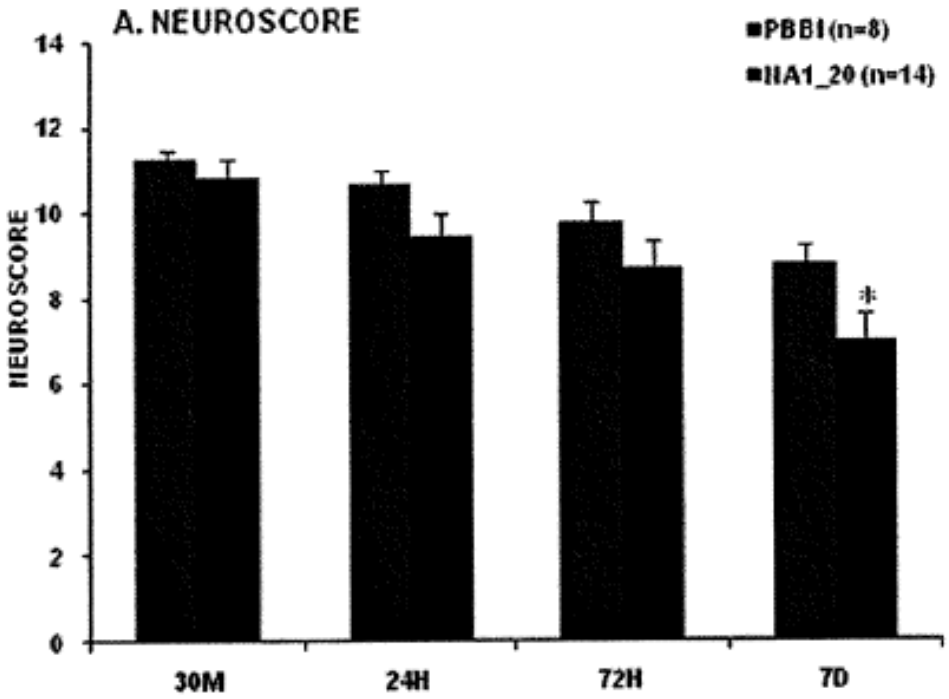
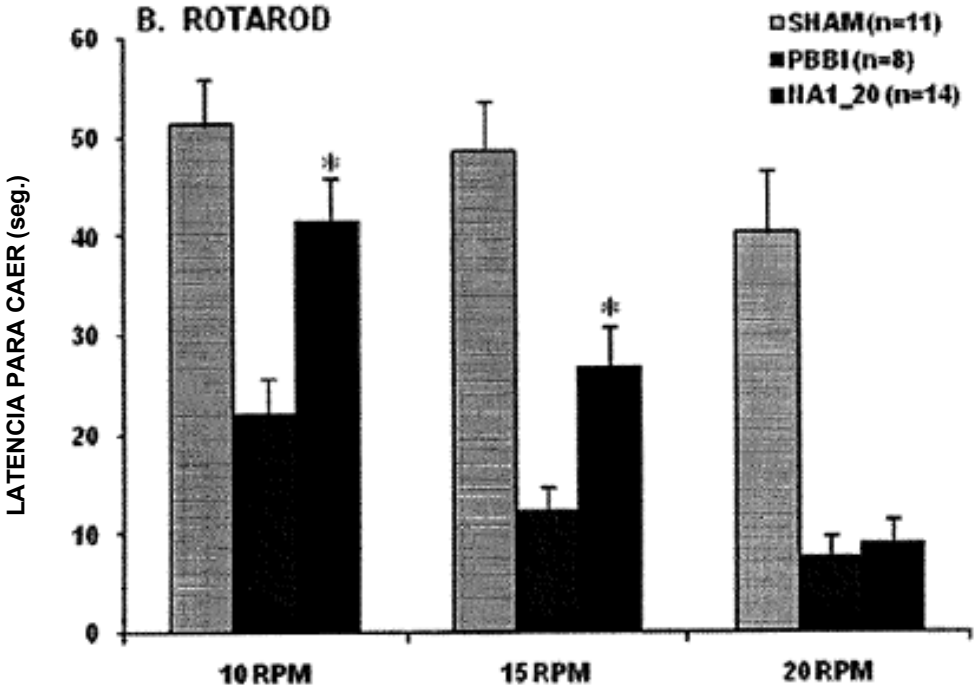


FIG. 4C
SECCIONES CAUDALES H&E



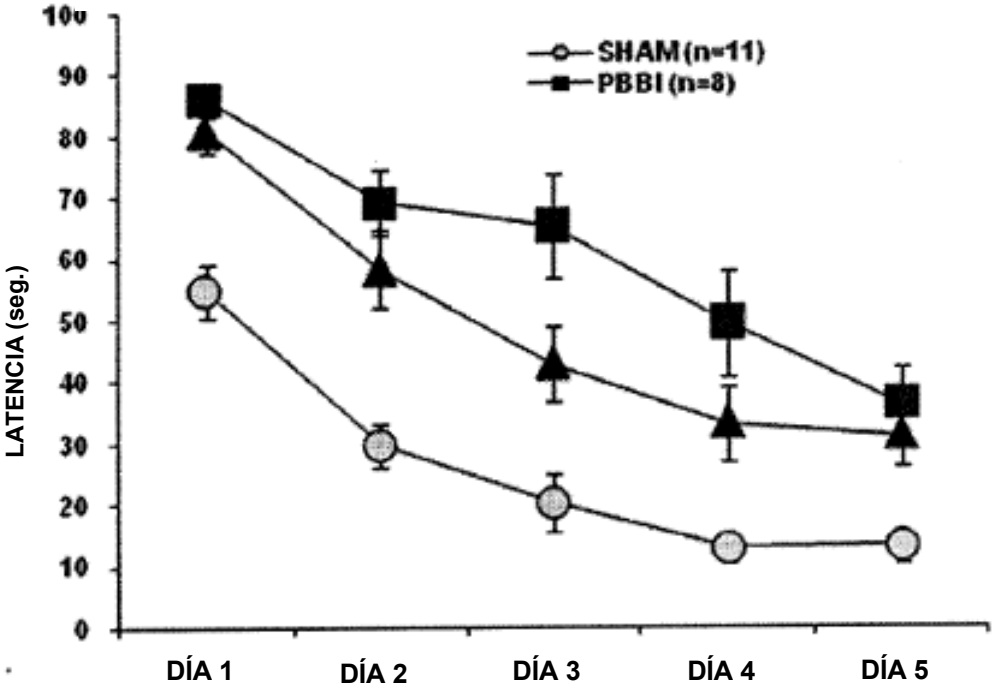
FIGS. 5A, B


A. NEUROSCORE
PBBI (n=8)
IIA1_20 (n=14)
NEUROSCORE
14
12
10
8
6
4
2
0
30M
24H
72H
7D
*

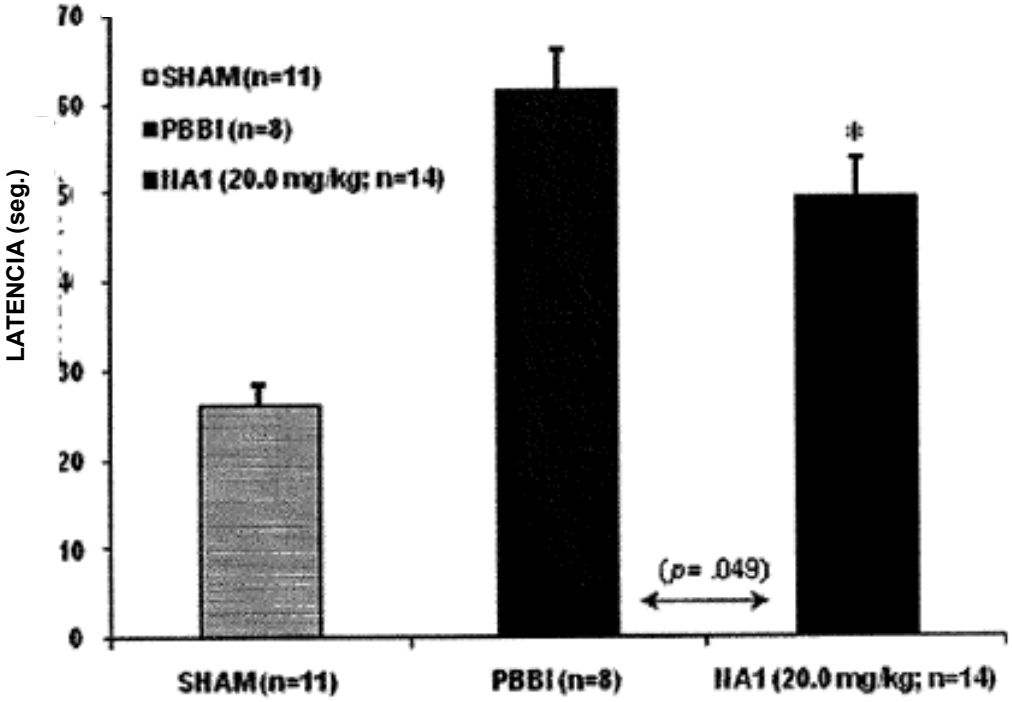

B. ROTAROD
SHAM (n=11)
PBBI (n=8)
IIA1_20 (n=14)
LATENCIA PARA CAER (seg.)
60
50
40
30
20
10
0
10 RPM
15 RPM
20 RPM
*
*

FIGS. 5C, D

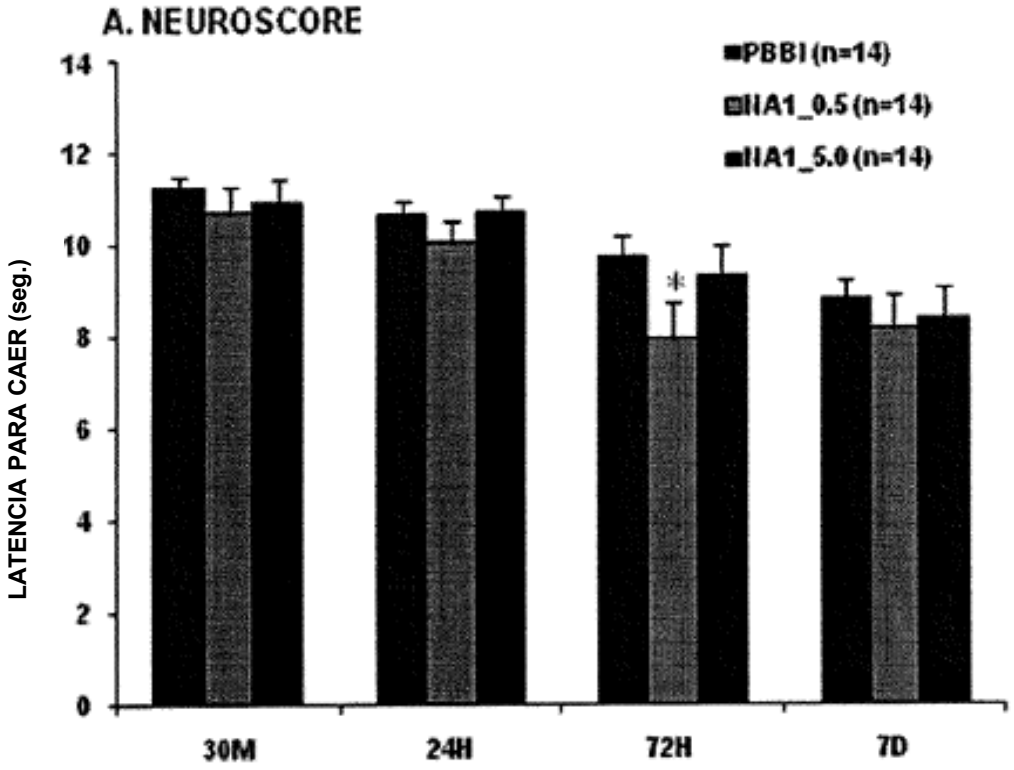
C. MWM – LATENCIA MEDIA DIARIA

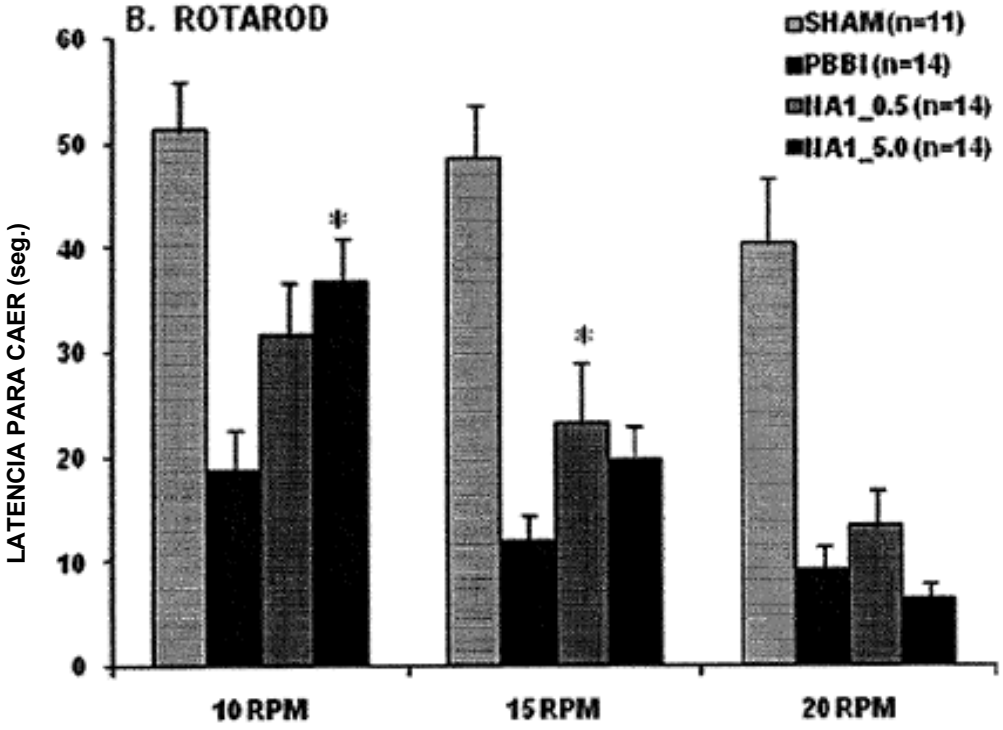


D. MWM – LATENCIA MEDIA TOTAL



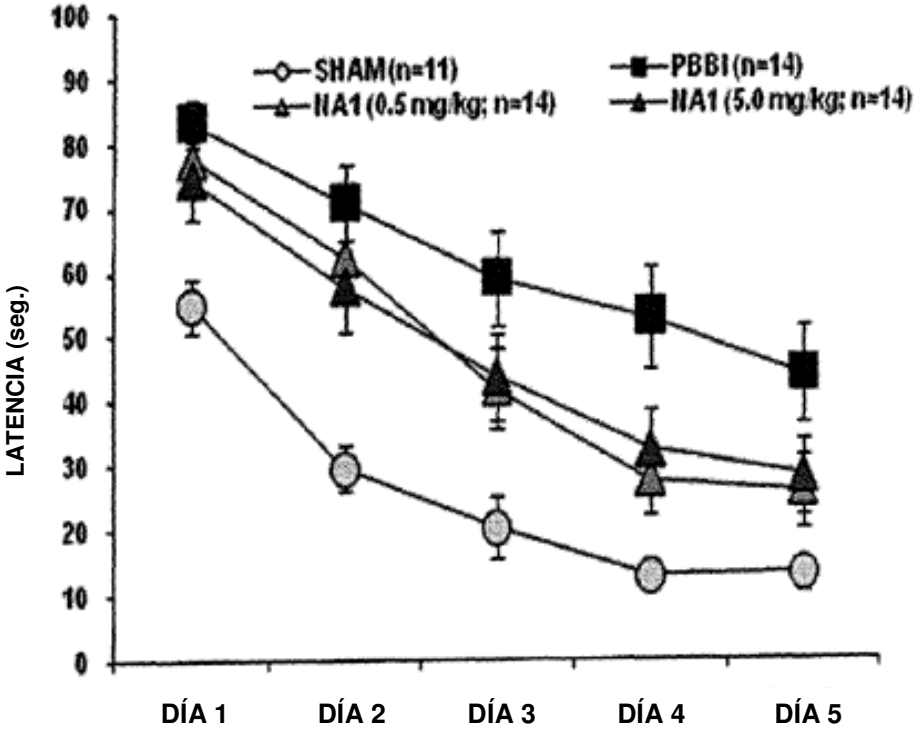
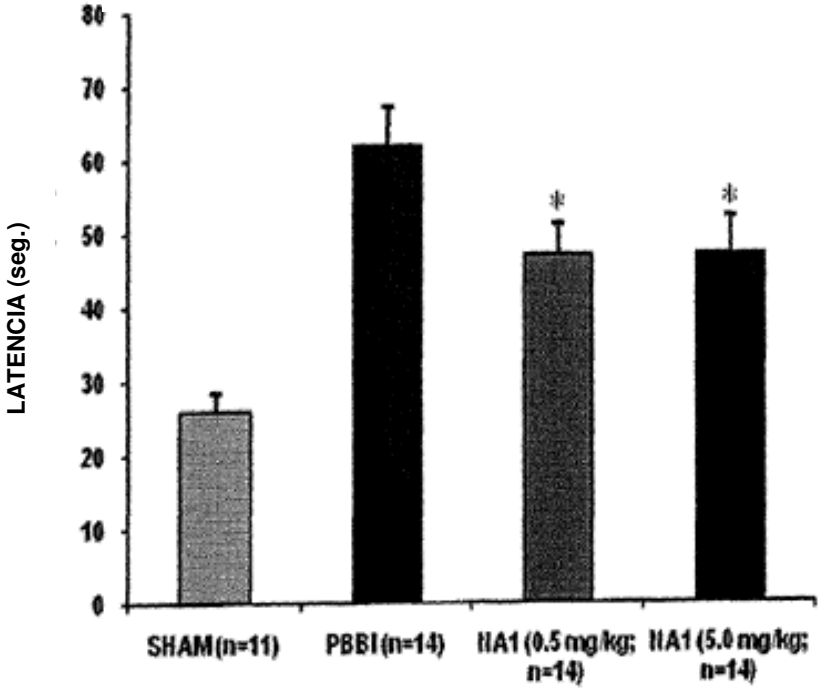
FIGS. 6A, B


A. NEUROSCORE
PBBI (n=14)
IIA1_0.5 (n=14)
IIA1_5.0 (n=14)
LATENCIA PARA CAER (seg.)
14
12
10
8
6
4
2
0
*
30M
24H
72H
7D


B. ROTAROD
SHAM (n=11)
PBBI (n=14)
IIA1_0.5 (n=14)
IIA1_5.0 (n=14)
LATENCIA PARA CAER (seg.)
60
50
40
30
20
10
0
*
*
10 RPM
15 RPM
20 RPM

FIGS. 6C, D

C. MWM – LATENCIA MEDIA DIARIA



D. MWM – LATENCIA MEDIA TOTAL