

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 274**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2012** **E 15161584 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** **EP 2929890**

54 Título: **Péptidos para suprimir la inflamación**

30 Prioridad:

18.03.2011 US 201161454342 P

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

17.10.2018

73 Titular/es:

**DUKE UNIVERSITY (100.0%)
2812 Erwin Road, Suite 306
Durham, NC 27705, US**

72 Inventor/es:

**LASKOWITZ, DANIEL T.;
DAWSON, HANA y
KOLLS, BRAD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 686 274 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos para suprimir la inflamación

5 Campo

La descripción se refiere a péptidos, métodos y composiciones para reducir o suprimir la inflamación, reducir o suprimir la neuroinflamación y tratar afecciones neurológicas.

10 Listado de secuencias

El listado de secuencias se proporciona con la presentación de la solicitud en formato electrónico solamente. El archivo de listado de secuencias 9111-WO00_ASFILED_SequenceListing_Text.txt se generó el 15 de marzo de 2012 y tiene un tamaño de 10,938 bytes.

15 Antecedentes

La apolipoproteína E ("ApoE") es una glicoproteína de 299 aminoácidos (34 kDa), producida principalmente en el hígado y el cerebro que exhibe múltiples funciones biológicas. Reconocida primero por su papel en el transporte y metabolismo del colesterol, la ApoE está presente en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y los complejos de lipoproteínas de alta densidad (HDL), y la ApoE puede unirse al receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), la proteína relacionada con receptores LDL (LRP) y el receptor VLDL. Weisgraber, (1994) Adv. Protein Chem. 45:249-302. La ApoE también es conocida por tener propiedades inmunomoduladoras, Laskowitz, et al., (2001) Exp. Neurol. 167:74-85, y por desempeñar un papel en la respuesta a enfermedades neurológicas y lesiones cerebrales, Laskowitz and Vitek, (2007) Pharmacogenomics 8:959-69.

La estructura terciaria de la ApoE incluye una región amino-terminal con un motivo de cuatro α -hélices que incluye un dominio de unión al receptor y una región carboxi-terminal que es en gran parte responsable de la unión a lípidos. La región de unión al receptor de ApoE se ha mapeado a un dominio helicoidal en los residuos 130-150 de la proteína de longitud completa madura, y esta región de ApoE gobierna su capacidad para suprimir la activación glial y la inflamación del SNC.

El documento WO 2003/026479 (Cognosci Inc.) describe métodos para suprimir la activación de células microgliales en el Sistema Nervioso Central (SNC), métodos para mejorar o tratar los efectos neurológicos de la isquemia cerebral o la inflamación cerebral, y métodos para combatir enfermedades específicas que afectan el SNC mediante la administración de un compuesto que se une a receptores microgliales y previene o reduce la activación microglial. También se describen los péptidos de unión al receptor de ApoE que pueden usarse en los métodos del documento WO 2003/026479, así como los métodos para usar dichos péptidos para tratar afecciones inflamatorias periféricas tales como la sepsis. También se describen métodos para seleccionar compuestos por la capacidad de suprimir o reducir la activación microglial.

Wang et al. (An apolipoprotein E-based therapeutic improves outcome and reduces Alzheimer's disease pathology following closed head injury: Evidence of pharmacogenomic interaction, Neuroscience, Vol. 144, No. 4, 24 January 2007, 1324-1333, doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.11.017) han estudiado cómo la apolipoproteína E (apoE) modifica la activación glial y la respuesta inflamatoria del SNC de una manera específica de la isoforma. Se ha demostrado que los péptidos derivados de la región de unión a receptor de apoE mantienen la actividad funcional de la proteína intacta y mejoran los déficits histológicos y funcionales después de una lesión cerrada en la cabeza. En el estudio actual, se usaron ratones de reemplazo direccionado APOE2, APOE3 y APOE4 (TR) que expresan las isoformas de la proteína apoE humana (apoE2, apoE3 y apoE4) en un modelo clínicamente relevante de lesión de cabeza cerrada para evaluar la interacción entre el fondo apoE humanizado y el péptido mimético apoE terapéutico, apoE (133-149). El tratamiento con el péptido apoE-mimético redujo la activación microglial y los eventos inflamatorios tempranos en todos los animales de reemplazo direccionados y se asoció con una mejoría histológica y funcional en los animales APOE2TR y APOE3TR. De manera similar, los niveles de proteína beta amiloide cerebral (A β)(1-42) aumentaron en función de la lesión craneal en todos los ratones de reemplazo direccionados, mientras que el tratamiento con péptido apoE suprimió los niveles de A β (1-42) en los animales APOE2TR y APOE3TR. Estos resultados sugieren una interacción farmacogenómica entre los efectos terapéuticos del péptido mimético de apoE y las isoformas de la proteína apoE humana. Además, Wang et al. sugieren que la administración de péptidos miméticos de apoE puede servir como una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la enfermedad neurológica aguda y crónica.

60 Resumen

La divulgación proporciona un péptido aislado de 5 residuos de aminoácidos que comprende la Fórmula I:

65 X1-X2-X3-X4-X5 (SEQ ID NO:1)

o una sal del mismo, en donde dicho péptido se elige entre los péptidos VSRKR (SEQ ID NO:2), VSKRR (SEQ ID NO:3), VSRRR (SEQ ID NO:4), VARKL (SEQ ID NO:5), RHKKL (SEQ ID NO:6), RHKRR (SEQ ID NO:9) o VARRL (SEQ ID NO:10). Se describen realizaciones adicionales de la invención en las reivindicaciones adjuntas.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden el péptido aislado de Fórmula I, y un vehículo, diluyente, vehículo o adyuvante. Las realizaciones de este aspecto proporcionan una composición que comprende un péptido, o una sal del mismo, de VSRKR (SEQ ID NO:2), VSKRR (SEQ ID NO:3), VSRRR (SEQ ID NO:4), VARKL (SEQ ID NO:5), RHKKL (SEQ ID NO:6), RHKRR (SEQ ID NO:9) o VARRL (SEQ ID NO:10).

10 Los péptidos son útiles en un método para reducir la inflamación en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un péptido, o una sal del mismo, que comprende VSRKR (SEQ ID NO:2), VSKRR (SEQ ID NO:3), VSRRR (SEQ ID NO:4), VARKL (SEQ ID NO:5), RHKKL (SEQ ID NO:6), RHKRR (SEQ ID NO:9) o VARRL (SEQ ID NO:10).

15 Los péptidos son útiles en un método para tratar una afección neurológica en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un péptido, o una sal del mismo, que comprende VSRKR (SEQ ID NO:2), VSKRR (SEQ ID NO:3), VSRRR (SEQ ID NO:4), VARKL (SEQ ID NO:5), RHKKL (SEQ ID NO:6), RHKRR (SEQ ID NO:9), o VARRL (SEQ ID NO:10). En algunos ejemplos, el método comprende tratar una afección neurológica seleccionada de al menos una de lesión traumática del SNC, hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracraneal, accidente cerebrovascular, encefalomiелitis alérgica experimental, esclerosis múltiple, neuroinflamación, enfermedad neurológica crónica, ALS, demencia, neuropatía, epilepsia, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer.

La invención y sus realizaciones se definen en las reivindicaciones adjuntas, incorporadas aquí como referencia.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la inhibición de la secreción de TNF- α microglial por un péptido. Las células microgliales murinas cultivadas BV-2 se incubaron con las concentraciones indicadas de péptido (SEQ ID NO:3) o un péptido control negativo (SEQ ID NO:13) y se estimularon con lipopolisacárido (LPS) (100 ng/ml) durante seis horas. Después de seis horas, se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de TNF- α secretada mediante ELISA (** $p < 0.01$; ANOVA).

La Figura 2 representa la función vestibulomotora mejorada en ratones tratados con péptido después de una lesión cerebral traumática. La función vestibulomotora se evaluó en términos de latencia Rotorod. La latencia de Rotorod basal se evaluó antes (Día 0) y cada día después de una lesión cerebral traumática inducida por un impacto neumático controlado contra el cráneo intacto. Dos horas y seis horas después de la lesión cerebral traumática, los ratones recibieron ya sea péptido (SEQ ID NO:3, 0.05 mg/kg o 0.2 mg/kg) o vehículo salino mediante inyección intravenosa en la vena de la cola. Los animales tratados con péptido mostraron un rendimiento vestibulomotor mejorado en relación con el tratamiento con vehículo, como se refleja por el aumento de latencia de Rotorod, durante todo el período de prueba (* $p < 0.05$; ANOVA).

La Figura 3 representa la función vestibulomotora mejorada en ratones tratados con péptido después de una lesión cerebral traumática. La función vestibulomotora se evaluó en términos de latencia de Rotorod. La latencia de Rotorod basal se evaluó antes (Día 0) y cada día después de una lesión cerebral traumática inducida por un impacto neumático controlado contra el cráneo intacto. Dos horas y seis horas después de la lesión cerebral traumática, los ratones recibieron el péptido (SEQ ID NO:4, 0.05 mg/kg) o el vehículo salino mediante inyección intravenosa en la vena de la cola. Los animales tratados con péptido exhibieron un rendimiento vestibulomotor mejorado, como se refleja por el aumento de latencia de Rotorod, durante todo el período de prueba (* $p < 0.05$; ANOVA de medidas repetidas).

La Figura 4 representa resultados neurocognitivos mejorados en ratones tratados con péptido después de una lesión cerebral traumática inducida por un impacto neumático controlado contra el cráneo. Dos horas y seis horas después de la lesión cerebral traumática, los ratones recibieron péptido (SEQ ID NO:4, 0.05 mg/kg o 0.2 mg/kg) o vehículo salino mediante inyección intravenosa en la vena de la cola. El rendimiento neurocognitivo se evaluó en términos de latencia del laberinto acuático de Morris. La latencia del laberinto acuático se evaluó mediante pruebas de plataforma sumergida a partir del día 28 después de una lesión cerebral traumática, y el rendimiento se evaluó adicionalmente en días sucesivos 29, 30 y 31 después de la lesión. Los animales tratados con péptido exhibieron mejores resultados neurocognitivos, como se refleja por la latencia disminuida del laberinto de agua, durante todo el período de prueba (* $p < 0.05$; ANOVA).

La Figura 5 representa la función vestibulomotora mejorada en ratones tratados con péptido después de una hemorragia intracerebral. La función vestibulomotora se evaluó en términos de latencia de Rotorod. La latencia de Rotorod basal se evaluó antes (Día 0) y cada día después de una hemorragia intracerebral inducida por inyección estereotáxica de colagenasa. Dos horas y seis horas después de la inyección de colagenasa, los ratones recibieron péptido (SEQ ID NO:4, 0.05 mg/kg) o vehículo salino mediante inyección intravenosa en la vena de la cola. Los

animales tratados con péptido exhibieron un rendimiento vestibulomotor mejorado, como se refleja por el aumento de latencia de Rotorod, durante todo el período de prueba (* $p < 0.05$; ANOVA de medidas repetidas).

La Figura 6 representa el porcentaje de supresión de la liberación de LDH después de la exposición a NMDA en cultivos tratados con péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:4).

Las Figuras 7A-7B representan secciones del aparato de modelo de explosión de tubo de choque.

La Figura 8 representa la eficacia del péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:4) en el rendimiento neurocognitivo de ratones con lesión por explosión ($p = 0.7$ en las diferencias de tendencia de aprendizaje) en términos de latencia del laberinto acuático de Morris.

La Figura 9 representa las cantidades promedio e individuales del péptido VSRRR (SEQ ID NO:4) en plasma de ratones a lo largo del tiempo después de una dosis única de 0.8 mg/kg.

La Figura 10 representa la penetración en el SNC del péptido VSRRR (SEQ ID NO:4) en tejido cerebral de ratones a lo largo del tiempo.

Las Figuras 11A-11B representan la inhibición de la secreción de TNF- α microglial por VR-55 (SEQ ID NO:4), VL-5-1 (SEQ ID NO:5) y VL-5-3 (SEQ ID NO:10).

Las Figuras 12A-12B representan la función vestibulomotora de ratones tratados con péptido después de una oclusión modificada de la arteria cerebral media.

Descripción detallada

Se entenderá que los diversos aspectos y realizaciones descritos en el presente documento están destinados simplemente a proporcionar una ilustración y no sirven para limitar el alcance de las reivindicaciones.

Los artículos "un" y "una" se usan en este documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa al menos un elemento y puede incluir más de un elemento. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación.

En un sentido general, la descripción se refiere a péptidos, que incluyen péptidos aislados y/o sintéticos que pueden exhibir actividad ApoE (también denominada en el presente documento "actividad mimética de ApoE"). ApoE, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de las diversas isoformas (por ejemplo, alelos) de la proteína de la apolipoproteína E humana codificada por un gen APOE. Ejemplos no limitantes de ApoE incluyen ApoE3 (SEQ ID NO:14), ApoE2 (SEQ ID NO:15) y ApoE4 (SEQ ID NO:16). La actividad de ApoE incluye cualquier actividad biológica funcional, o combinación de actividades biológicas, que esté asociada con la proteína ApoE, ya sea in vitro o in vivo. La actividad de ApoE puede relacionarse, por ejemplo, con una cualquiera o combinación de metabolismo de colesterol, unión a proteínas de receptor ApoE fisiológicas; actividad neuroprotectora, actividad antioxidante, actividades antiexcitóticas, modulación de la actividad de células gliales, inflamación, modulación de neuroinflamación, y similares. Estudios recientes demuestran que los péptidos que tienen actividad mimética de apoE pueden tener un efecto beneficioso en una serie de modelos animales que incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (Laskowitz et al., (2010) J Neurotrauma 27:1983-1995); esclerosis múltiple (Li et al., JPET, 2006); hemorragia subaracnoide (Gao et al; 2006 Mesis et al., 2006); ictus (Tukhovskaya, J Neurosci Res, 2006), y neuropatía (Li et al., JPET, 2010). De este modo, los péptidos, composiciones y métodos descritos en el presente documento tienen amplias aplicaciones ya que pueden usarse para tratar un espectro de enfermedades, trastornos e indicaciones clínicas asociadas con ApoE.

ApoE es un ligando conocido para receptores que incluyen receptores secuestrantes tales como receptor LDL, receptor VLDL, receptor LRP/ α 2M, receptor ER-2, receptor LR8, receptor ApoE 2 (apoER2) y megalina/gp330 (colectivamente receptores ApoE). Una región de ApoE conocida por participar en las interacciones de unión a receptor es un dominio α -helicoidal que se encuentra entre los residuos 130-150 del polipéptido ApoE nativo (SEQ ID NO:14). Los fragmentos de ApoE activa que incluyen este dominio helicoidal han mostrado actividad mimética de ApoE (véanse las Patentes de Estados Unidos números 7,319,092 y 7,205,280). Estos péptidos retienen la secuencia de aminoácidos primaria de ApoE nativa en el dominio helicoidal de unión al receptor y conservan la estructura secundaria de α - helicoidal nativa (Laskowitz, et al. (2001) Exp. Neurol. 167:74-85). Se ha demostrado que la actividad de estos péptidos depende de la retención de la estructura secundaria α -helicoidal nativa (Laskowitz, et al. (2006) Acta Neurol. Scand. 114 (Supp. 185):15-20). Como se describe en más detalle a continuación, se ha encontrado sorprendentemente que los péptidos pequeños (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 residuos de aminoácidos de longitud) que no tienen una identidad de secuencia primaria con ApoE son efectivos para modular, inducir y/o imitar la actividad biológica de ApoE y pueden usarse en el tratamiento de diversas enfermedades, trastornos o afecciones que implican la función biológica de ApoE.

Un "péptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que comprende al menos un único residuo de aminoácido, o derivado del mismo, o un compuesto que comprende al menos un aminoácido mimético. Los aminoácidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, isoleucina, leucina, alanina, asparagina, glutamina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, metionina, cisteína, fenilalanina, treonina, triptófano, glicina, valina, prolina, serina, tirosina, arginina, histidina, norleucina, ornitina, taurina, selenocisteína, selenometionina, lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, deshidroalanina, hipusina, citrulina, ácido 3-aminopropanoico, ácido gamma-aminobutírico, nitroarginina, leucina N-metilada, homoarginina, dimetil arginina, acetil-lisina, azalisina, pirrolisina y similares. Una "cadena lateral de aminoácido" se refiere a los diversos grupos sustituyentes orgánicos que diferencian un aminoácido de otro. Un aminoácido que tiene una cadena lateral hidrófoba incluye los ejemplos no limitantes de alanina (A), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), triptófano (W), tirosina (Y), y valina (V). Un aminoácido que tiene una cadena lateral cargada positivamente, en condiciones fisiológicas típicas, incluye los ejemplos no limitantes de arginina (R), histidina (H) y lisina (K). Un aminoácido que tiene una cadena lateral cargada negativamente, en condiciones fisiológicas típicas, incluye los ejemplos no limitantes de ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E). Un aminoácido que tiene una cadena lateral polar no cargada incluye los ejemplos no limitantes de serina (S), treonina (T), asparagina (N) y glutamina (Q). Dados estos ejemplos no limitantes, un experto en la materia apreciará y podrá determinar las características de otras cadenas laterales de aminoácidos (por ejemplo, como hidrófobas, carga positiva/negativa, descarga polar, y similares) que no están ejemplificados explícitamente más arriba. Un "derivado" de una cadena lateral de aminoácido se refiere a una cadena lateral de aminoácido que se ha modificado estructuralmente (por ejemplo, a través de una reacción química para formar nuevas especies, un enlace covalente a otra molécula, y similares). Algunas realizaciones proporcionan un péptido que comprende modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, oxidación de la cadena lateral, acetilación, amidación o fosforilación, siempre que la modificación no destruya la actividad biológica de los péptidos como se describe aquí. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un péptido puede modificarse mediante acetilación N-terminal y/o amidación C-terminal.

Un "aminoácido mimético" como se usa en este documento pretende abarcar peptidomiméticos, peptoides (glicinas poli-N-sustituidas) y péptidos β (es decir, péptidos que comprenden uno o más residuos de aminoácidos que tienen el grupo amino unido al carbono β en lugar del carbono α). Adecuadamente, el aminoácido mimético comprende una estructura química alterada que está diseñada para ajustar propiedades moleculares favorablemente (por ejemplo, estabilidad, actividad, respuesta inmunogénica reducida, solubilidad, etc.). Típicamente, se cree que la estructura química alterada no se produce en la naturaleza (por ejemplo, que incorpora esqueletos modificados, aminoácidos no naturales, etc.). Así, ejemplos no limitativos de miméticos de aminoácidos incluyen péptidos D, retropéptidos, péptidos retroinversos, péptidos β , peptoides y compuestos que incluyen uno o más D-aminoácidos, glicina poli-N-sustituida, o β -aminoácido, o cualquier combinación de los mismos.

Típicamente, un péptido comprende una secuencia de al menos 3 aminoácidos (residuos de aminoácidos) o miméticos de aminoácidos. Las realizaciones de la divulgación se refieren a péptidos que tienen una longitud de 5 aminoácidos. Los péptidos descritos en el presente documento se pueden proporcionar en una forma cargada, típicamente con una carga neta positiva, y se pueden generar y usar como sales (por ejemplo, sales de metales alcalinos, sales de adición básicas o ácidas). La selección y formación de tales sales están dentro de la capacidad de un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer Company, Philadelphia, Pa (2005).

Las realizaciones de la divulgación proporcionan péptidos sintéticos con actividad mimética de ApoE. Aunque pueden exhibir actividad mimética de ApoE, los péptidos descritos no comparten identidad de secuencia de proteína primaria con el polipéptido ApoE (SEQ ID NO:13). En otras palabras, las secuencias peptídicas divulgadas no aparecen en la secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido ApoE, ni exhiben una estructura secundaria α -helicoidal análoga al dominio de unión al receptor ApoE nativo. En una realización, los péptidos sintéticos se aíslan y/o purifican opcionalmente hasta una sola especie activa.

En un aspecto de la divulgación, el péptido comprende la Fórmula I:

X1-X2-X3-X4-X5 (SEQ ID NO:1)

o una sal del mismo, en donde el péptido puede comprender VSRKR (SEQ ID NO:2), VSKRR (SEQ ID NO:3), VSRRR (SEQ ID NO:4), VARKL (SEQ ID NO:5), RHKKL (SEQ ID NO:6), RHKRR (SEQ ID NO:9) o VARRL (SEQ ID NO:10). En algunas realizaciones, el péptido de acuerdo con la Fórmula I es VSRKR (SEQ ID NO:2), VSKRR (SEQ ID NO:3), VSRRR (SEQ ID NO:4), VARKL (SEQ ID NO:5), RHKKL (SEQ ID NO:6), RHKRR (SEQ ID NO:9), o VARRL (SEQ ID NO:10).

En algunas realizaciones de todos los aspectos descritos en el presente documento, los péptidos consisten esencialmente en las secuencias de aminoácidos y fórmulas descritas en este documento. En algunas realizaciones de todos los aspectos descritos en el presente documento, los péptidos consisten en las secuencias de aminoácidos y fórmulas descritas en este documento.

Tabla 1.

Péptido	Secuencia				
SEQ ID NO:1	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
SEQ ID NO:2	V	S	R	K	R
SEQ ID NO:3	V	S	K	R	R
SEQ ID NO:4	V	S	R	R	R
SEQ ID NO:5	V	A	R	K	L
SEQ ID NO:6	R	H	K	K	L
SEQ ID NO:7	R	A	R	R	L
SEQ ID NO:8	R	S	K	K	L
SEQ ID NO:9	R	H	K	R	R
SEQ ID NO:10	V	A	R	R	L
SEQ ID NO:11	V	A	R	R	K
SEQ ID NO:12	R	S	K	R	R

En algunas realizaciones, los péptidos pueden exhibir al menos una actividad mimética de ApoE. En algunas realizaciones, por ejemplo, los péptidos divulgados pueden unir uno o más receptores de ApoE fisiológicos tales como, por ejemplo, receptores de superficie celular expresados por células gliales, así como receptores que funcionan para suprimir la muerte celular neuronal y la afluencia de calcio (excitotoxicidad) asociado con la exposición al N-metil-D-aspartato (NMDA); proteger contra la producción de TNF- α e IL-6 inducida por LPS (por ejemplo, en un modelo de sepsis in vivo); prevenir, tratar o ralentizar trastornos inflamatorios tales como aterosclerosis, artritis o enfermedad inflamatoria del intestino; suprimir la activación glial o microglial; suprimir la activación de macrófagos; suprimir la activación de linfocitos; suprimir la inflamación; suprimir la inflamación del SNC; tratar la neuropatía; y/o mejorar la lesión neuronal en la enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, deterioro cognitivo leve, demencia, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer) y/o trauma agudo del SNC (por ejemplo, lesión cerebral traumática).

En algunas realizaciones, los péptidos se unirán a un receptor particular con afinidad similar a ApoE. En algunas realizaciones, los péptidos se unirán a un receptor particular con afinidad similar al péptido mimético de ApoE de 20 aminoácidos más largo previamente descrito que se une a los macrófagos con una constante de disociación (K_d) de aproximadamente 50 nM (Misra et al., (2001) J. Leukocyte Biol. 70: 677 - 683). Por ejemplo, el péptido puede unirse a un receptor con una K_d igual o inferior a aproximadamente 100 μ M, aproximadamente 90 μ M, aproximadamente 80 μ M, aproximadamente 70 μ M, aproximadamente 60 μ M, aproximadamente 50 μ M, aproximadamente 40 μ M, aproximadamente 30 μ M, aproximadamente 20 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 90 nM, aproximadamente 80 nM, aproximadamente 70 nM, aproximadamente 60 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM, o aproximadamente 1 pM. El péptido puede unirse a un receptor con una K_d mayor o igual a aproximadamente 1 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 60 nM, aproximadamente 70 nM, aproximadamente 80 nM, aproximadamente 90 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 20 μ M, aproximadamente 30 μ M, aproximadamente 40 μ M, aproximadamente 50 μ M, aproximadamente 60 μ M, aproximadamente 70 μ M, aproximadamente 80 μ M, aproximadamente 90 μ M, o aproximadamente 100 μ M. El péptido puede unirse a un receptor con una K_d en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM a aproximadamente 15 pM, aproximadamente 10 pM a aproximadamente 20 pM, aproximadamente 20 pM a aproximadamente 30 pM, aproximadamente 30 pM a aproximadamente 40 pM, aproximadamente 40 pM a aproximadamente 50 pM, aproximadamente 50 pM a aproximadamente 60 pM, aproximadamente 60 pM a aproximadamente 70 pM, aproximadamente 70 pM a aproximadamente 80 pM, aproximadamente 80 pM a aproximadamente 90 pM, aproximadamente 90 pM a aproximadamente 100 pM, aproximadamente 100 pM a

aproximadamente 1 nM, aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM a aproximadamente 15 nM, aproximadamente 10 nM a aproximadamente 20 nM, aproximadamente 20 nM a aproximadamente 30 nM, aproximadamente 30 nM a aproximadamente 40 nM, aproximadamente 40 nM a aproximadamente 50 nM, aproximadamente 50 nM a aproximadamente 60 nM, aproximadamente 60 nM a aproximadamente 70 nM, aproximadamente 70 nM a aproximadamente 80 nM, aproximadamente 80 nM a aproximadamente 90 nM, aproximadamente 90 nM a aproximadamente 100 nM, aproximadamente 100 nM a aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 15 μ M, aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 20 μ M, aproximadamente 20 μ M a aproximadamente 30 μ M, aproximadamente 30 μ M a aproximadamente 40 μ M, aproximadamente 40 μ M a aproximadamente 50 μ M, aproximadamente 50 μ M a aproximadamente 60 μ M, aproximadamente 60 μ M a aproximadamente 70 μ M, aproximadamente 70 μ M a aproximadamente 80 μ M, de aproximadamente 80 μ M a aproximadamente 90 μ M, de aproximadamente 90 μ M a aproximadamente 100 μ M, de aproximadamente 100 μ M a aproximadamente 1 μ M. Por ejemplo, el péptido puede unirse a un macrófago con una K_d menor que o igual a aproximadamente 100 μ M, aproximadamente 90 μ M, aproximadamente 80 μ M, aproximadamente 70 μ M, aproximadamente 60 μ M, aproximadamente 50 μ M, aproximadamente 40 μ M, aproximadamente 30 μ M, aproximadamente 20 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 90 nM, aproximadamente 80 nM, aproximadamente 70 nM, aproximadamente 60 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM, o aproximadamente 1 pM.

El grado de unión a un receptor ApoE puede evaluarse usando cualquier técnica conocida en el arte, tal como, por ejemplo, ensayos de unión típicos (por ejemplo, ensayos de unión competitiva), ELISA, ensayos funcionales (por ejemplo, como se ilustra en los Ejemplos), y similares. En algunas realizaciones, el tamaño de los péptidos puede conferir una farmacocinética mejorada, facilitar el cruce de la barrera hematoencefálica, permitir la administración intranasal, reducir los costes de producción, aumentar la potencia (por ejemplo, por gramo), y/o reducir la inmunogenicidad del péptido.

Los péptidos se pueden producir usando cualquier medio para fabricar polipéptidos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, métodos sintéticos y recombinantes. Por ejemplo, en algunas realizaciones los péptidos pueden sintetizarse usando técnicas de química sintética tales como síntesis en fase sólida, síntesis en fase sólida de tipo Merrifield, síntesis en fase sólida de t-Boc, síntesis en fase sólida de Fmoc, síntesis en fase sólida de BOP, y síntesis en fase de solución. Véase, por ejemplo, Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., (1984) Pierce Chem. Co., Rockford Ill.; *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross and Meienhofer, Eds., vols. 1-2 (1980) Academic Press, New York; Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, (1984) Springer-Verlag, Berlín. En otras realizaciones, los péptidos pueden producirse, por ejemplo, expresando el péptido de un ácido nucleico que codifica el péptido en una célula o en un sistema libre de células de acuerdo con técnicas recombinantes familiares para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, (2002) John Wiley & Sons, Somerset, NJ. Los péptidos pueden incorporar cualquiera de las diversas modificaciones y grupos protectores descritos en este documento o conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, los descritos en McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, (1973) Plenum Press, New York.

En algunas realizaciones, los péptidos se pueden diseñar para imitar las características físicas, químicas y/o estructurales del dominio de unión al receptor α -helicoidal que se encuentra entre los residuos 130-150 del polipéptido ApoE nativo (SEQ ID NO:14). Por ejemplo, en algunas realizaciones, los péptidos pueden diseñarse para imitar las características físicas, químicas y/o características estructurales de la cara polar que se extiende a lo largo de una superficie externa de la estructura tridimensional de la hélice de unión al receptor ApoE nativa usando una metodología de diseño de péptido de "avance lineal", en el que el aminoácido en cada posición sucesiva en el péptido se selecciona intentando emular una o más propiedades (por ejemplo, tamaño relativo/impedimento estérico, polar, no polar, cargado, sin carga, índice de hidropatía), hidrofobicidad, hidrofiliicidad), capacidad ácida básica para formar enlaces (por ejemplo, enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals), etc.) de cada residuo sucesivo expuesto en la cara polar de la hélice de unión al receptor ApoE nativa mediante cada giro descendente periódico de la hélice. En algunas realizaciones, el péptido se puede diseñar basándose en las características físicas, químicas y/o estructurales del dominio de unión a ApoE de uno o más receptores de ApoE. Por ejemplo, para un receptor ApoE que tiene un bolsillo o superficie de unión que interactúa con ApoE en una interacción intermolecular de unión receptor-ligando, el péptido puede diseñarse para maximizar la afinidad de unión predicha entre el péptido y el bolsillo/superficie de unión del receptor por seleccionando residuos de aminoácidos peptídicos que se espera que exhiban interacciones de unión a lo largo del bolsillo/superficie de unión de ApoE del receptor.

En un aspecto, la descripción proporciona un método para tratar una afección neurológica en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un péptido de Fórmula I o Fórmula

II, o una composición o formulación que comprende una cantidad efectiva de un péptido de Fórmula I o Fórmula II, o una combinación de los mismos.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para reducir la inflamación en un sujeto que así lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un péptido de Fórmula I o Fórmula II, o una composición o formulación que comprende una cantidad efectiva de un péptido de Fórmula I o Fórmula II, o una combinación de los mismos.

10 En realizaciones relacionadas con los aspectos descritos anteriormente, los péptidos y/o composiciones pueden usarse para tratar, mejorar o prevenir ciertos signos, síntomas y/o efectos neurológicos perjudiciales de la lesión aguda y/o crónica del SNC. Tal como se usa en el presente documento, la lesión aguda del SNC incluye pero no se limita a un accidente cerebrovascular (causado por trombosis, embolia o vasoconstricción), lesión cerebral cerrada, lesión cerebral traumática, isquemia cerebral global (por Ejemplo, Isquemia por hipotensión sistémica de cualquier causa, incluido infarto de miocardio). , arritmia cardíaca, shock hemorrágico y lesión cerebral posterior al injerto de derivación coronaria), accidente cerebrovascular isquémico, anoxia global, isquemia focal, hemorragia subaracnoidea y hemorragia intracraneal. El daño isquémico al sistema nervioso central puede ser el resultado de condiciones de isquemia global o focal. La isquemia global ocurre cuando el flujo de sangre a todo el cerebro cesa por un período de tiempo, como durante el paro cardíaco. La isquemia focal ocurre cuando una porción del cerebro se ve privada de flujo sanguíneo normal, como durante la oclusión tromboembólica de un vaso cerebral, lesión traumática de la cabeza, edema y tumores cerebrales. Gran parte del daño en el sistema nervioso central debido a la isquemia cerebral ocurre durante las horas o incluso los días posteriores a la afección isquémica, y es secundario a la liberación de productos citotóxicos por el tejido dañado. La lesión crónica del SNC incluye, pero no se limita a, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson, la epilepsia y la encefalopatía asociada al VIH. El descubrimiento de que los péptidos ApoE pueden suprimir la activación glial proporciona un papel para los métodos, péptidos y composiciones divulgados que tratan cualquier enfermedad neurológica que implique activación microglial. Por ejemplo, la microglia expresa marcadores de activación en la EA, lo que sugiere que los eventos inflamatorios cruciales en la EA incluyen microglia. Tal grupo de microglia activado cerca de placas amiloides. La microglia también se activan en la epilepsia.

30 En algunas realizaciones, los péptidos y/o composiciones pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar los signos y síntomas neurológicos clínicos asociados con afecciones inflamatorias que afectan al sistema nervioso (por ejemplo, el SNC). Ejemplos no limitantes incluyen esclerosis múltiple, vasculitis, encefalomiелitis diseminada aguda y síndrome de Guillain-Barre. A este respecto, los péptidos miméticos de ApoE descritos pueden usarse solos o en combinación con otros fármacos antiinflamatorios o citoquinas conocidos para formular composiciones farmacéuticas para el tratamiento de afecciones inflamatorias del SNC.

40 En algunas realizaciones, los péptidos y/o las composiciones pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar las afecciones asociadas con la excitotoxicidad de NMDA. La excitotoxicidad de NMDA se ha asociado con neurodegeneración, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esquizofrenia, demencia por VIH y encefalopatía, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, trastorno bipolar, esclerosis múltiple en humanos y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en animales, dolor, depresión, accidente cerebrovascular, epilepsia, aciduria hereditaria d-2-hidroxi-glutarica, DA y lesión cerebral traumática. En algunas realizaciones, los péptidos y/o composiciones pueden bloquear la excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA y proporcionar neuroprotección. Los antagonistas de NMDA también se usan en anestesia clínica y se ha demostrado que inhiben el dolor crónico, la tolerancia a los medicamentos y la dependencia del alcohol. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos, péptidos y composiciones descritos pueden usarse como ingredientes en formulaciones de anestesia y en composiciones terapéuticas combinadas que contienen otros compuestos conocidos útiles para tratar las afecciones descritas.

50 En algunas realizaciones, los péptidos y/o composiciones pueden usarse para proteger contra la producción de citoquinas inducida por LPS en la sepsis. La ApoE intacta ha demostrado proteger a los ratones de la letalidad inducida por LPS bacteriana. Otras coterapias posibles para la sepsis incluyen la administración de citoquinas antiinflamatorias, incluyendo IL-10, factor de crecimiento transformante-beta, factor estimulante de colonias de granulocitos, IFN-phi, factor inhibidor de la migración de macrófagos y proteína de grupo 1 de alta movilidad, y anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos anti-endotoxina, anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral y anticuerpos anti-CD 14. Por lo tanto, las realizaciones proporcionan el uso de péptidos solos o en combinación con otras citoquinas y anticuerpos antiinflamatorios conocidos en composiciones y métodos para tratar la sepsis.

60 El efecto de los métodos, péptidos y composiciones divulgados se puede evaluar a nivel celular o tisular (por ejemplo, histológicamente o morfométricamente) o evaluando el estado neurológico de un sujeto. La supresión o reducción de la activación glial puede evaluarse mediante diversos métodos, como sería evidente para los expertos en la técnica; uno de estos métodos es medir la producción o presencia de compuestos que se sabe que son producidos por la neuroglia activada, y comparar tales mediciones con los niveles de los mismos compuestos en situaciones de control. Alternativamente, los efectos de los presentes métodos y compuestos en la supresión, reducción o prevención de la activación microglial pueden evaluarse comparando los signos y/o síntomas de la enfermedad del SNC en sujetos tratados y control, donde tales signos y/o síntomas están asociados con o secundarios a la activación de microglia.

Típicamente, los términos "tratar" y "tratamiento" cuando se usan con referencia a una enfermedad o un sujeto que necesita tratamiento incluyen, pero no se limitan a, detener o ralentizar la progresión de la enfermedad, la remisión de la enfermedad, la profilaxis o la disminución de los síntomas y/o indicaciones clínicas, reducción de la enfermedad y/o severidad de los síntomas, o reducción en la duración de la enfermedad en comparación con un sujeto no tratado, y/o en ausencia de tratamiento. Los métodos de tratamiento no están cubiertos por las reivindicaciones. Los métodos de tratamiento pueden atenuar o mejorar una o más indicaciones clínicas de la enfermedad particular que se trata. Ciertos ejemplos de métodos para tratar una enfermedad o afección asociada con una actividad ApoE comprenden la administración de cantidades terapéuticamente efectivas de un péptido de Fórmula I, o de Fórmula II, o uno o más péptidos seleccionados de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, o SEQ ID NO:10, así como sus composiciones farmacéuticas. El método de tratamiento puede relacionarse con cualquier método que evite una mayor progresión de la enfermedad y/o síntomas, ralentiza o reduce la progresión adicional de la enfermedad y/o síntomas, o revierte la enfermedad y/o los síntomas clínicos asociados con la actividad ApoE.

Los sujetos que se van a tratar mediante los métodos descritos en el presente documento pero no cubiertos por las reivindicaciones abarcan sujetos mamíferos, que incluyen sujetos humanos y no humanos (animales) tales como perros, gatos, conejos, cabras, caballos, cerdos, ganado, etc. (incluyendo sujetos masculinos y femeninos y sujetos de todas las edades, incluyendo niños, jóvenes, adolescentes y adultos). Los sujetos pueden tratarse para cualquier propósito, por ejemplo para reducir la inflamación, suprimir la activación microglial, mejorar la enfermedad crónica, etc. El término "administrado concurrentemente" como se usa en el presente documento significa que dos compuestos se administran suficientemente cercanos para lograr un efecto inmunológico combinado. La administración concurrente se puede llevar a cabo de este modo mediante administración secuencial o administración simultánea (por ejemplo, administración simultánea en un vehículo común, o el mismo).

En algunos ejemplos, los péptidos y composiciones divulgados se pueden administrar mediante cualquier vía de administración adecuada, que incluye, entre otros, inyección (subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intratecal, intramuscular, intracerebroventricular e inyección espinal), intranasal, oral, absorción transdérmica, parenteral, por inhalación, nasofaríngea o transmucosa. La administración abarca proporcionar al menos un péptido como se describe en este documento (por ejemplo, de Fórmula I, Fórmula II, y/o SEQ ID NO:1-12) formulado como una composición farmacéutica. La administración de un agente activo (por ejemplo, compuesto, péptido, etc.) directamente al cerebro es conocida en la técnica. La inyección intratecal administra los agentes directamente a los ventrículos del cerebro y al líquido espinal. Las bombas de infusión implantables quirúrgicamente están disponibles para proporcionar una administración sostenida de agentes directamente en el fluido espinal. La inyección espinal implica la punción lumbar con la inyección de un compuesto farmacéutico en el líquido cefalorraquídeo. La administración también incluye la administración dirigida en la que el péptido según la divulgación es activo solo en una región diana del cuerpo (por ejemplo, en tejido cerebral), así como formulaciones de liberación sostenida en las que el péptido se libera durante un período de tiempo controlado manera. Las formulaciones y métodos de liberación sostenida para administración dirigida son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el uso de liposomas, microesferas biodegradables cargadas con fármaco, conjugados de fármaco-polímero, conjugados de agente de unión específico de fármaco y similares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen nanopartículas de quitosano u otras formulaciones de polímeros entéricos relacionadas. La determinación de formulaciones farmacéuticas particulares y cantidades terapéuticamente efectivas y régimen de dosificación para un tratamiento dado está dentro de la capacidad de un experto en la técnica teniendo en cuenta, por ejemplo, edad, peso, sexo, etnia, órgano del paciente (por ejemplo, hígado y riñón) función, la extensión del tratamiento deseado, el estadio y la gravedad de la enfermedad y los síntomas asociados, y la tolerancia del paciente para el tratamiento.

Algunos ejemplos de los métodos descritos aquí proporcionan la administración intranasal de uno o más péptidos descritos aquí, o una composición que comprende un péptido, para un sujeto que tiene una enfermedad crónica tal como, por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, enfermedad de Parkinson, artritis, enfermedad inflamatoria del intestino, leucemia o aterosclerosis. Las formulaciones y métodos apropiados para administración intranasal e inhalada son conocidos en la técnica.

En ejemplos relacionados con aplicaciones terapéuticas, la administración puede realizarse en un sujeto que ya padece el trastorno de interés. Aquellos en la fase de incubación o la fase aguda de la enfermedad se pueden tratar mediante los métodos descritos en el presente documento, solos o junto con otros tratamientos, según se basen adecuadamente en la enfermedad/afección particular, el paciente y la combinación. Un experto en la técnica podrá determinar cuándo un tratamiento de combinación es o no es adecuado.

En los métodos y usos terapéuticos, no cubiertos por las reivindicaciones, los péptidos y la composición descritos en este documento pueden administrarse a un sujeto en una cantidad suficiente para tratar, o al menos detener parcialmente, síntomas y/o complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto a menudo se denomina "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán en parte del péptido, la composición, la forma de administración, la etapa y la gravedad de la afección que se trata, la edad, el peso y la salud general del paciente, y el criterio del médico que prescribe.

Las cantidades efectivas de las composiciones y péptidos descritos en este documento pueden incluir menos de aproximadamente 100 mg/kg, menos de aproximadamente 50 mg/kg, menos de aproximadamente 25 mg/kg, menos de aproximadamente 10 mg/kg, menos de aproximadamente 1 mg/kg, menos de aproximadamente 0.1 mg/kg, menos de aproximadamente 0.05 mg/kg, menos de aproximadamente 0.01 mg/kg, menos de aproximadamente 0.005 mg/kg, y menos de aproximadamente 0.001 mg/kg de péptido. En algunos ejemplos, las cantidades efectivas de las composiciones y péptidos descritos en la presente pueden incluir al menos aproximadamente 0.0001 mg/kg, al menos aproximadamente 0.001 mg/kg, al menos aproximadamente 0.005 mg/kg, al menos aproximadamente 0.01 mg/kg, al menos aproximadamente 0.05 mg/kg, al menos aproximadamente 0.1 mg/kg, al menos aproximadamente 0.5 mg/kg, al menos aproximadamente 1 mg/kg, al menos aproximadamente 5 mg/kg y al menos aproximadamente 10 mg/kg de péptido. Esto incluye, por ejemplo, cantidades de péptidos que varían de aproximadamente 0.0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0.005 mg/kg a aproximadamente 0.5 mg/kg, y de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 0.05 mg/kg. En algunos ejemplos, los métodos, péptidos y composiciones descritos en este documento pueden emplearse en estados de enfermedad graves, es decir, situaciones que ponen en peligro la vida o son potencialmente mortales. En tales casos, es posible y puede ser deseable por el médico tratante administrar excesos sustanciales de estas composiciones. Adicionalmente, un experto en la técnica también sabría cómo ajustar o modificar variables tales como la dosificación, los programas de dosificación y las vías de administración, según corresponda, para un sujeto dado.

Los péptidos y composiciones divulgados pueden administrarse de manera aguda (es decir, durante el inicio o poco después de los eventos que conducen a la afección que requiere tratamiento), profilácticamente (por ejemplo, antes de una cirugía programada o antes de la aparición de signos o síntomas neurológicos) o durante el curso de una enfermedad degenerativa para reducir o mejorar la progresión de los síntomas que de otro modo ocurrirían. El momento y el intervalo de administración varían de acuerdo con los síntomas del sujeto, y pueden administrarse a intervalos que abarcan minutos, horas o días, a lo largo de un período de horas, días, semanas o más, como determinaría un experto en la técnica.

Algunas realizaciones que se refieren a composiciones farmacéuticas para el tratamiento terapéutico o profiláctico proporcionan formulaciones específicas para cualquiera de administración mucosa (oral, nasal, inhalación, rectal, vaginal, traqueal, etc.), parenteral, tópica o local. Para los fines de el presente documento, la administración por vía mucosa es diferente de la administración tópica, ya que la administración por vía mucosa se refiere a la aplicación de la vacuna a una superficie de la mucosa tal como una superficie del tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, tracto reproductor, etc. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son administradas adecuadamente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular. La administración tópica (es decir, no mucosa) puede realizarse en una superficie no mucosa de un sujeto, como el ojo, la oreja, las uñas, el cabello o la piel, en cualquier forma apropiada, tal como un líquido acuoso o no acuoso (por ejemplo, gotita), emulsión, pasta, pomada, crema, etc. Por lo tanto, la divulgación proporciona composiciones para administración tópica (mucosa o no mucosa) o parenteral que comprende uno o más péptidos miméticos de ApoE pequeños, disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, tal como un vehículo acuoso. En realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía nasal. Se puede usar cualquier variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua regulada, solución salina al 0.9%, glicina al 0.3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización bien conocidas, convencionales, o se pueden esterilizar por filtración. Las soluciones resultantes pueden envasarse para usar como tales, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar condiciones fisiológicas, tales como agentes reguladores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas descritas aquí también pueden estar en formulaciones de polvo seco. En realizaciones relacionadas con formulaciones de vacunas en polvo seco, típicamente la vacuna líquida se congela rápidamente y se seca al vacío (por ejemplo, liofilizada) en presencia de al menos un agente de carga (tal como trehalosa u otros azúcares) para proporcionar una formulación de vacuna que tiene una estabilidad a temperatura superior. Dichas formulaciones de vacuna en polvo seco pueden administrarse al huésped como un polvo seco, eliminando así la necesidad de reconstitución líquida.

En aspectos descritos en este documento que se refieren a composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas y formulaciones, algunas realizaciones proporcionan una composición que comprende al menos un péptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 (por ejemplo, SEQ ID NOs:2-6 y 9-10), en combinación con un vehículo, diluyente o adyuvante aceptable. En realizaciones adicionales, la composición comprende un péptido seleccionado de cualquiera de las SEQ ID NOs:2-6 y 9-10, o cualquier combinación de dos o más péptidos de la misma, en combinación con un portador, vehículo, diluyente o adyuvante.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona una composición que consiste esencialmente en un péptido seleccionado de cualquiera de las SEQ ID NOs:2-6 y 9-10, o cualquier combinación de dos o más péptidos de la misma, y un portador, vehículo, diluyente o adyuvante.

En un aspecto, la divulgación proporciona un medicamento para tratar una afección neurológica en un sujeto que lo necesita, en el que el medicamento comprende una cantidad eficaz de un péptido de Fórmula I y/o Fórmula II.

En un aspecto, la divulgación proporciona un medicamento para tratar la inflamación en un sujeto que lo necesita, en el que el medicamento comprende una cantidad eficaz de un péptido de Fórmula I y/o Fórmula II.

Si bien los siguientes ejemplos proporcionan una descripción detallada adicional de ciertos aspectos y realizaciones de la divulgación, deben considerarse meramente ilustrativos y de ninguna manera limitantes del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y Métodos para la evaluación basada en cultivo celular de la activación glial.

Los métodos in vitro se han desarrollado usando células cultivadas para evaluar la capacidad de un compuesto, tal como un péptido, para suprimir la activación glial. Laskowitz y otros, (2001) Exp. Neurol., 167:74-85. Los cultivos de células gliales se cultivaron y mantuvieron en condiciones estándar. Las células gliales cultivadas pueden incluir cultivos de células gliales mixtas primarias murinas, células microgliales BV-2 murinas y células microgliales C3 humanas. Las células gliales adherentes se lavaron con medio OptiMEM® (disponible de Invitrogen Corp.) para eliminar el suero y se cubrieron con medio fresco OptiMEM® que contenía el péptido.

Se aplicaron péptidos de 5 aminoácidos de longitud a una o más muestras de células en paralelo a concentraciones que varían de aproximadamente 0 a aproximadamente 50 μM , tal como 0.3, 3 y 30 μM . Los péptidos AL-10-1 (SEQ ID NO:18) y VL-17-9 (SEQ ID NO:19), que son péptidos más largos (12 aminoácidos cada uno) se usaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Se rastreó una serie de péptidos en cultivo cortical neuronal primario de rata expuesto a NMDA usando el método descrito en Aono et al., Neuroscience (2003) 116:437 y Aono et al., Neurobiology of Disease (2002) 11:214 (ver Tabla 2). La neuroprotección a la muerte celular mediada por NMDA en el cultivo neuronal primario se expresó como una disminución porcentual en la LDH, 24 horas después de la exposición a NMDA en comparación con los cultivos tratados con vehículo (Tabla 2). La liberación de LDH es indicativa de muerte neuronal después de la exposición a NMDA. El péptido VR-55 (SEQ ID NO:4) redujo la muerte celular excitotóxica mediada por NMDA en aproximadamente el 19% a una concentración de 1 μM . Los efectos fueron específicos, y no todos los péptidos demostraron neuroprotección. El péptido de control positivo VL-17-9 redujo la liberación de LDH en un 31%. En comparación, el VL-5-2 más corto redujo la liberación de LDH en un 31%, lo que indica que los péptidos más cortos también reducen la muerte celular excitotóxica mediada por NMDA.

Tabla 2.

		0.1 μM	0.3 μM	1 μM	3 μM
VR-55	Ac-VSRRR-NH2 (SEQ ID NO: 4)	-2.85%	1.50%	19.14%	15.91%
VR-54	Ac-VSKKR-NH2 (SEQ ID NO: 13)			-15.91%	
VR-53	Ac-VSKRR-NH2 (SEQ ID NO: 3)			7.03%	
VR-52	Ac-VSRKR-NH2 (SEQ ID NO: 2)			12.63%	
RL-5-3	Ac-RSKKL-NH2 (SEQ ID NO: 8)			-20.80%	
RL-5-2	Ac-RARRL-NH2 (SEQ ID NO: 7)			-5.23%	
RL-5-1	Ac-RHKKL-NH2 (SEQ ID NO: 6)			-2.85%	
RR-5-2	Ac-RSKRR-NH2 (SEQ ID NO: 12)			0.08%	
RR-5-1	Ac-RHKRR-NH2 (SEQ ID NO:9)			7.50%	
VL-5-3	Ac-VARRL-NH2 (SEQ ID NO:10)	-19.04%	-16.70%	11.50%	
VL-5-2	Ac-VARKL-NH2 (SEQ ID NO: 5)			34.26%	
VL-5-1	Ac-VARKL-NH2 (SEQ ID NO: 5)	18.57%	0.29%	24.48%	
AL-10-1	Ac-ASHLRKLRL-NH2 (SEQ ID NO: 18)			-6.21%	
VL-17-9	Ac-LRVRLASLLRKL-NH2 (SEQ ID NO: 19)	16.19%		30.95%	

La respuesta a la dosis de la neuroprotección ante la excitotoxicidad de NMDA en el cultivo neuronal primario se determinó para el péptido mimético de ApoE VR-55 (SEQ ID NO:4). La FIGURA 6 muestra que el porcentaje de supresión de la liberación de LDH como una función de la exposición a VR-55 (SEQ ID NO:4) depende de la dosis.

- 5 La Tabla 3 muestra los datos acumulados de todos los péptidos en la familia relacionada que fueron cribados en el mismo bioensayo para su capacidad de supresión, todos a una concentración de 1 μ M. "0" indica menos del 5% de supresión; "+" indica 5-10% de supresión; "++" indica una supresión del 11-20%; y "+++" indica una supresión superior al 20%. Además de VL-17-9, muchos otros candidatos tenían una supresión superior al 20%, incluidos VR-55, VL-5-1, VL-5-2 y VR-52.

10

Tabla 3: Lista de péptidos miméticos de ApoE

Péptido	1 μ M
VR-52 (SEQ ID NO: 2)	+++
VR-53 (SEQ ID NO: 3)	+
VR-54 (SEQ ID NO: 13)	++
VR-55 (SEQ ID NO: 4)	+++
RL-5-1 (SEQ ID NO: 6)	++
RL-5-2 (SEQ ID NO: 7)	0
RL-5-3 (SEQ ID NO: 8)	0
RR-5-1 (SEQ ID NO: 9)	+
RR-5-2 (SEQ ID NO: 12)	0
VL-5-1 (SEQ ID NO: 5)	+++
VL-5-2 (SEQ ID NO: 5)	+++
VL-5-3 (SEQ ID NO: 10)	++
AL-10-1 (SEQ ID NO: 18)	0
VL-17-9 (SEQ ID NO: 19)	+++

- 15 Los péptidos o proteínas más grandes pueden necesitar ser probados en concentraciones más altas para observar la supresión medible de la activación glial. Si se usan células murinas primarias y células BV-2, las células se estimulan con 100 ng/ml de E. coli LPS (disponible en Sigma-Aldrich Co.), y el sobrenadante se recoge seis horas después de la estimulación con LPS y se analiza para determinar nitrito (utilizando un sistema colorimétrico de reactivos Greiss, disponible de Promega Corp.) y/o TNF- α (usando un kit de ELISA en fase sólida, disponible en Invitrogen Corp.). Si se usan células C3 humanas, las células se estimulan con 200 μ g/ml de ácido polinosínico 5'(disponible en Sigma-Aldrich Co.), y el sobrenadante se recoge 5 días después de la estimulación y se analiza para TNF- α usando un kit ELISA en fase sólida (disponible de Invitrogen Corp.).

20

Ejemplo 2: Supresión de la activación microglial por péptido mimético de ApoE.

- 25 Se prepararon cultivos de BV-2 murinos y se usaron para evaluar la supresión de la activación microglial como se describe en el Ejemplo 1. Se incubaron muestras replicadas de células BV-2 sin péptido, con un péptido mimético de ApoE (VSKRR; SEQ ID NO:3) en 0.3 μ M, 3 μ M o 30 μ M, o con un péptido de control negativo (VSKKR, SEQ ID NO: 13) a 0.3 μ M, 3 μ M o 30 μ M. Cada muestra se estimuló con LPS y se evaluó la producción de TNF- α como se describe en el Ejemplo 1. Como se representa en la FIGURA 1, el tratamiento con péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:3) en cada dosificación probada dio como resultado una producción de TNF- α disminuida con respecto a células no tratadas o células tratadas con péptido de control negativo (SEQ ID NO:13). Los datos indican que los péptidos descritos en este documento fueron útiles para reducir la liberación de mediadores proinflamatorios.

30

- 35 Se determinó la actividad protectora contra la lesión inflamatoria del SNC por daño cerebral para los péptidos miméticos de ApoE, VR-55 (SEQ ID NO:4), VL-5-1 (SEQ ID NO:5) y VL-5-3 (SEQ ID NO:10). Las FIGURAS 11A y 11B muestran que VR-55, VL-5-1 y VL-5-3 suprimen la liberación de citoquinas inflamatorias TNF- α en cultivos primarios mixtos gliales después de la exposición a LPS.

Ejemplo 3: Materiales y Métodos para probar los déficits neurológicos in vivo.

Se desarrolló un modelo murino experimental para lesión cerebral traumática. Laskowitz, et al. (2010) J. Neurotrauma, 27: 1983-95. Se anestesiaron ratones machos (de 12 a 14 semanas) con isoflurano al 4.3% en oxígeno en una caja de inducción de anestesia durante 90 segundos. La tráquea se intubó y los pulmones se ventilaron mecánicamente con isoflurano al 1.4% en una mezcla 50/50 de oxígeno y nitrógeno. La temperatura corporal se mantuvo a 37°C usando calentamiento/enfriamiento superficial. La parte superior del cráneo fue expuesta por una incisión en la línea media para identificar puntos de referencia anatómicos, y un disco metálico cóncavo de 3 mm se aseguró a la superficie del cráneo con un adhesivo, directamente en la línea media y justo caudal al bregma. El disco difundió la energía del impacto y redujo la incidencia de la fractura del cráneo deprimida a menos del 10%. Después de la anestesia general, los ratones se colocaron en un dispositivo estereotáctico y se expuso el cráneo. Se utilizó un impactador neumático (diámetro: 2.0 mm, disponible en Air-Power, Inc.) que se descargó a 6.8 ± 0.2 m/s con un desplazamiento de la cabeza de 3 mm para proporcionar un solo impacto en la línea media de la superficie del disco.

También se proporcionó un modelo murino experimental para la hemorragia intracerebral. James, et al. (2009) Stroke, 40:632-39. Se anestesiaron ratones machos (de 16 a 20 semanas) con isoflurano al 4.6% en oxígeno en una caja de inducción de anestesia durante 90 segundos. La tráquea se intubó y los pulmones se ventilaron mecánicamente con 1.6% de isoflurano en una mezcla 70/30 de nitrógeno/oxígeno. La temperatura corporal se mantuvo a 37°C usando un sistema de calentamiento debajo de la carrocería. La cabeza del animal se aseguró en un marco estereotáctico, se inyectó anestesia local y se incidió el cuero cabelludo. Después de la exposición del cráneo, se creó un orificio de rebaba de 2 mm a la izquierda del bregma, y se avanzó una aguja de jeringa de 0.5 µL (disponible de Hamilton Co.) a una profundidad de 3 mm de la corteza. Se inyectó colagenasa clostridial tipo IV-S (disponible en Sigma-Aldrich Co.) durante un período de 5 minutos (0.1 U en 0.4 µL de solución salina normal). La incisión se cerró y se permitió que los animales recuperaran la ventilación espontánea con extubación posterior.

Se desarrolló un procedimiento experimental para medir los déficits neurológicos. Se utilizó un Rotorod automatizado (disponible en Ugo Basile North America, Inc.) para evaluar la función vestibulomotora. El día anterior a la inducción experimental de una afección o lesión neurológica (tal como, por ejemplo, lesión cerebral traumática o hemorragia intracerebral como se describió anteriormente), los ratones fueron sometidos a dos ensayos de acondicionamiento consecutivos a una velocidad de rotación establecida (16 revoluciones por minuto) durante 60 segundos seguidos por tres ensayos adicionales con una velocidad de rotación acelerada. El tiempo promedio para caer desde el cilindro giratorio en los últimos tres ensayos se registró como latencia inicial. Después de la lesión, los ratones fueron sometidos a pruebas diarias consecutivas con tres ensayos de aceleración de la velocidad de rotación (intervalo intertribal de 15 minutos). Se registró la latencia promedio para caer desde la barra, y los ratones que no pudieron agarrar la barra se marcaron con una latencia de 0 segundos.

Otro procedimiento experimental para medir los déficits neurológicos se desarrolló utilizando un laberinto de agua de Morris. El procedimiento usó un grupo de aluminio negro que contenía una plataforma móvil (7.5 cm de diámetro) y se llenó con agua a 25-27°C opacificada con leche en polvo. Cada sesión de entrenamiento o prueba consistió en cuatro pruebas por día con un intervalo de 20-30 minutos entre los ensayos. Un día antes de las pruebas, los ratones fueron entrenados usando una plataforma visible (plataforma marcada y ubicada en un cuadrante diferente en cada prueba para minimizar la habituación al cuadrante, sin señales visuales extralaberinto) para habitar a los ratones a la manipulación y la natación y enseñarles a los ratones el objetivo de la prueba, escapando del agua subiendo a la plataforma. Después del día de entrenamiento, los ratones se probaron con una plataforma oculta sumergida 1 cm debajo de la superficie del agua (cuatro días consecutivos, plataforma sumergida en el cuadrante oeste para todos los ensayos con varias señales visuales extralaberinto). Para cada prueba, los ratones se colocaron en la piscina frente al perímetro y se les permitió buscar la plataforma durante un máximo de 90 segundos. Los ratones se iniciaron en uno de cuatro cuadrantes diferentes para cada prueba, con el orden de cuadrante inicial definido al azar cada día. La latencia para encontrar la plataforma y la velocidad de nado se registraron utilizando un sistema de seguimiento por vídeo controlado por ordenador (Ethovision 2.2.14, disponible en Noldus Information Technology, Leesburg VA).

Ejemplo 4: Efecto del péptido mimético de ApoE sobre los resultados neurológicos después de una lesión cerebral traumática.

Grupos de ratones recibieron un péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:3; 0.05 mg/kg o 0.2 mg/kg) o vehículo (solución salina) mediante inyección venosa intravenosa a las 2 horas y nuevamente a las 6 horas después de una lesión cerebral traumática inducida como descrito en el Ejemplo 3. Se ensayó la función vestibulomotor de cada ratón mediante latencia de Rotorod medida antes y después de la lesión, como se describe en el Ejemplo 3. Los animales tratados con 0.05 mg/kg o 0.2 mg/kg de péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:3) mostraron mejora significativa en el rendimiento vestibulomotor en comparación con el tratamiento con vehículo, como se refleja en el aumento de latencia de Rotorod. Véase la FIGURA 2. El efecto fue duradero durante el período de prueba de cinco días. Los datos indican que los péptidos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de la lesión cerebral traumática.

Ejemplo 5: Efecto del péptido mimético de ApoE sobre los resultados neurológicos después de una lesión cerebral traumática.

Los grupos de ratones recibieron un péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:4; 0.05 mg/kg) o vehículo (solución salina) mediante inyección intravenosa en la vena de la cola a las 2 horas y nuevamente a las 6 horas después de lesión cerebral traumática inducida como se describe en el Ejemplo 3. Cada ratón se ensayó para la función vestibulomotora por latencia de Rotorod medida antes y después de la lesión, como se describe en el Ejemplo 3. Los animales tratados con 0.05 mg/kg de péptido mimético ApoE (SEQ ID NO:4) tuvieron un rendimiento vestibulomotor mejorado reflejado por la latencia de Rotorod aumentada. Véase la FIGURA 3. El efecto fue duradero durante el período de prueba de cinco días. Otros grupos de ratones recibieron un péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:4; 0.05 mg/kg o 0.2 mg/kg) o vehículo (solución salina) mediante inyección venosa intravenosa a las 2 horas y nuevamente a las 6 horas después de inducida la lesión cerebral traumática, tal como se describe en el Ejemplo 3. Cada ratón se ensayó para determinar el rendimiento neurocognitivo en los días 28, 29, 30 y 31 después de la lesión usando un laberinto de agua de Morris como se describe en el Ejemplo 3. Animales tratados con péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:4) a 0.05 mg/kg o 0.2 mg/kg mostraron mejores resultados neurocognitivos como se refleja en la latencia del laberinto de agua. Véase la FIGURA 4. Los datos indican que los péptidos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de la lesión cerebral traumática.

Ejemplo 6: Efecto del péptido mimético de ApoE sobre los resultados neurológicos después de la hemorragia intracerebral.

Grupos de ratones recibieron un péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:4; 0.05 mg/kg) o vehículo (solución salina) mediante inyección intravenosa en la vena de la cola a las 2 horas y nuevamente a las 6 horas después de la hemorragia intracerebral inducida como se describe en el Ejemplo 3. Se ensayó la función vestibulomotora de cada ratón mediante latencia de Rotorod medida antes y después de la hemorragia intracerebral inducida como se describe en el Ejemplo 3. Los animales tratados con 0.05 mg/kg de péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:4) tuvieron un rendimiento vestibulomotor mejorado reflejado por la latencia de Rotorod aumentada. Véase la FIGURA 5. El efecto fue duradero durante el período de prueba de cinco días. Los datos indican que los péptidos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de la hemorragia intracerebral.

Ejemplo 7: Efecto del péptido mimético de ApoE sobre los resultados neurológicos después de los datos de lesión por explosión

Se realizó un estudio de ratón con lesión por explosión utilizando un modelo de explosión de tubo de choque. Se construyó un conjunto de tres tubos de choque (FIGURA 7A) para proporcionar un rango de condiciones de explosión con sobrepresión pico realista, duración escalada e impulso. Para la prueba de péptidos, se usó el tubo de choque de 1240 mm de longitud y 78 mm de diámetro. La sección del impulsor era constante para todas las pruebas, y consistía en una brida separadora de 25 mm de espesor atornillada junto con una brida ciega correspondiente y una brida deslizante unida a la tubería impulsada. Este perfil de sección del impulsor se puede variar para cambiar las características de sobrepresión del tubo. Se instalaron juntas de cara completa (material de grafito/Buna-N) entre cada brida para evitar fugas. El diafragma estaba compuesto por varias láminas de película de tereftalato de polietileno (PET) instaladas entre la brida separadora del impulsor y la brida unida a la sección impulsada. La sección del impulsor se llenó con helio de alta presión a través de un accesorio en la parte posterior de la brida ciega hasta que el diafragma se rompió, enviando la onda de choque hacia la sección de la tubería impulsada.

El tubo de choque se montó verticalmente en un marco de aluminio extrudido utilizando tres pernos en U que amortiguan la vibración. Tres transductores de presión piezorresistivos montados al ras (PT) (Endevco 8530B, Endevco Corp., San Juan Capistrano, CA) se espaciaron 120° alrededor del diámetro, desplazados 6 mm desde el extremo abierto del tubo de choque. Como el grosor de la pared del tubo era inferior a la longitud del PT, un collar de 6 mm de grosor (19 mm de largo) se ajustaba al extremo del tubo y se soldaba en su lugar para proporcionar un soporte de montaje adicional para los PT. Se instaló un PT adicional en la sección del controlador para medir la presión de estallido cuando el diafragma se rompió. Se utilizó un accesorio de aluminio para proporcionar protección torácica para los ratones (FIGURA 7B). En pruebas previas, la sobrepresión pico y el impulso disminuyeron más de un factor de 10. La sobrepresión pico incidente, la duración de fase positiva y el impulso incidente pico se registraron en los tres PTs de tubo final para cada prueba (datos no mostrados). El nivel de presión de estallido del impulsor se controló utilizando un rango de espesores de diafragma (0.58 a 0.84 mm) y la presión del tanque de combustible del impulsor se reguló a 7.0 MPa. Las condiciones atmosféricas (temperatura, presión barométrica, humedad) se registraron antes de cada prueba. Todos los sensores se muestrearon a 1 MHz con un filtro antisolapamiento de 500 kHz. Los datos se procesaron posteriormente utilizando un filtro Butterworth de paso bajo de octavo orden con una frecuencia de corte de 40 kHz.

Se expusieron ratones de tipo salvaje (Jackson Labs) a explosión en dos grupos de 15, uno con inyección de péptido (SEQ ID NO:4) y uno con controles solo para vehículo. Los déficits neurológicos se midieron en ratones lesionados usando el laberinto de agua de Morris como se describió anteriormente. La eficacia del péptido mimético de ApoE sobre el rendimiento neurocognitivo se examinó en ratones con lesión por explosión según se determinó

usando el laberinto de agua de Morris (FIGURA 8). La FIGURA 8 muestra que el péptido mimético de ApoE reduce el déficit neurocognitivo después de la lesión por explosión. La administración del péptido dio como resultado una tendencia hacia un mejor rendimiento cognitivo demostrado por el aumento del tiempo en el cuadrante con la plataforma oculta previamente aprendida (es decir, una prueba de sonda para evaluar las capacidades de retención como se describe en Laskowitz et al., J. Neurotrauma, 24:1093-1107 (2007)) (datos no mostrados). Los animales tratados con vehículo pasaron 17.8 ± 1.9 segundos en el cuadrante correcto en comparación con los animales tratados con el péptido mimético de ApoE (SEQ ID NO:4) que pasaron 21.8 ± 2.7 segundos en el cuadrante correcto, $p=0.24$. La tendencia fue hacia un aprendizaje mejorado en el laberinto acuático de Morris ($p=0.07$). La tendencia fue hacia un mejor rendimiento en la prueba de la sonda ($p=0.25$).

Los datos de apnea del ratón se adaptan a otras especies y pueden ser un buen modelo de sistema. El modelo de lesión por explosión fue único del modelo de lesión roma en la recuperación de la función motora y en los déficits cognitivos persistentes y tempranos. Con los resultados del Rotorod, los ratones sometidos a explosión parecieron recuperar la función motora rápidamente. No hubo un déficit significativo entre el simulacro y la lesión después de la explosión. Con los resultados del laberinto de agua de Morris, los ratones sometidos a explosión mostraron importantes déficits cognitivos en los ensayos de laberinto de agua.

Ejemplo 8: Farmacocinética en sangre y SNC para administración intravenosa.

La cantidad del péptido mimético de ApoE VSRRR (SEQ ID NO:4) en plasma sanguíneo y SNC se determinó de la siguiente manera:

Cuantificación de VSRRR en Plasma de Ratón usando LC/Monitorización de Iones Seleccionados (SIM)/MS

Se midieron alícuotas de 48 μ L de plasma de ratón en los pocillos de una placa de 96 pocillos de 2 mL. Se añadieron 6 μ L de una forma etiquetada con isótopo estable (SIL) del péptido VSRRR ("VSRRR [10]", SEQ ID NO:4) (5 picomoles/ μ L en bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8, regulador). Se añadieron 6 μ L de una forma sintética del péptido VSRRR ("VSRRR", SEQ ID NO:4) en bicarbonato de amonio 50 mM para patrones y controles de calidad (QCs) y se añadió un volumen equivalente de bicarbonato de amonio 50 mM a todos los pocillos que contenían muestras de PK de ratón. Se añadieron 1140 μ L de formiato de amonio 50 mM, pH 10, para un volumen final de 1200 μ L. Las sales y proteínas se eliminaron usando el protocolo OASIS® HLB Solid Phase Extraction (SPE) de la siguiente manera:

1. 500 μ L de metanol (MeOH) a través de cada pozo x 1.

2. 500 μ L de acetonitrilo al 25% (ACN)/ácido trifluoroacético al 1% (TFA) x 1 (como preelución).

3. 500 μ L de MeOH x 1

4. 500 μ L de formiato de amonio 50 mM x 2

5. 1 mL de cada mezcla de muestra se pipeteó directamente en una placa OASIS® HLB (sorbente de fase inversa hidrofílico-lipófilo-balanceada, Waters Corp.) en un pozo correspondiente y se aspiró lentamente a través de

6. 500 μ L de formiato de amonio 50 mM x 1

7. 500 μ L 10% de ACN/formiato de amonio 50 mM x 2

8. 500 μ L 25% de ACN/formiato de amonio 50 mM x 1

9. Se retiraron las placas de recolección de lavados/flujo pasantes, y se colocaron en la placa de recolección

10. Se eluyó con 100 μ L 25% ACN/1% TFA x 3, eluyendo al vacío lentamente. El eluato final debe ser de aproximadamente 300 μ L.

El eluato de SPE se secó usando una centrifuga de vacío. La muestra se reconstituyó en 50 μ L de regulador que contiene 1% de acetonitrilo (ACN), 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) y 0.02% de ácido heptafluorobutírico (HFBA). Se analizaron dos microlitros de muestra reconstituida mediante LC capilar a nanoescala acoplada a un espectrómetro de masas en tándem de masas de alta resolución y precisión. Específicamente, la fuente de ionización por electroaspersión con NanoLockSpray™ (Waters Corp.) y el sistema nanoAcquity UPLC® (Waters Corp.) se usaron con una columna LC a nanoescala (1.7 μ m BEH130 C18 150 μ m ID x 100 mm de longitud, Waters Corp.), 10-min gradiente de 3% a 19% de ACN con 0.1% de ácido fórmico (fase móvil A = 0.1% de ácido fórmico/0.001% HFBA) con un tiempo total de LC de 16.5 minutos, tasa de flujo = 1.8 μ L/min y 35°C de temperatura de la columna. Se usó un espectrómetro de masas de alta resolución SYNAPT™ G1 HDMS™ (Waters Corp.). Se obtuvieron datos de MS de escaneo completo en la región de masa de 50-4000 Da utilizando una función de escaneo de Ciclo de trabajo mejorado a 360 Da.

Las cantidades VSRRR y VSRRR [10] se cuantificaron midiendo el área bajo la curva (AUC) de los cromatogramas de iones seleccionados de los iones doblemente cargados a alta resolución (m/z 357.7 y 362.7). La cantidad de cuantificación de VSRRR final se determinó usando la relación de los AUC (VSRRR/VSRRR [10]). Las proporciones de 5 animales se promediaron por punto de tiempo y se usaron estándares de calibración para generar una curva estándar. Se analizaron alícuotas duplicadas de muestras de CC por LC/MS por triplicado para determinar la reproducibilidad analítica.

La FIGURA 9 muestra la cantidad de péptido en la muestra de plasma a lo largo del tiempo después de una sola dosificación de 0.8 mg/kg del péptido. El nivel más bajo de cuantificación (LLOQ) está indicado. La Tabla 4 muestra los resultados de la administración intravenosa (IV).

Tabla 4.

IV				
Punto de tiempo (min)	Relación Ligero/pesado a través de 5 animales	Desviación estándar a través de 5 animales	% CV en 5 animales	fmol/uL
1	0.079	0.030	37.8	32.2
3	0.134	0.045	33.4	51.8
5	0.077	0.054	69.4	31.7
10	0.058	0.024	41.1	24.9
15	0.044	0.012	26.9	19.6
30	0.016	0.004	25.7	9.9
60	0.012	0.008	64.7	8.5

PK en cerebro de ratón con Péptido Terapéutico, VSRRR - Procedimiento de Preparación de Muestras

Se pesaron cerebros de los ratones en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Todo el cerebro se transfirió a un tubo de cultivo de 14 mL. Se añadió 1 mL de urea 8 M en formiato de amonio 50 mM (pH 10) con péptido SIL de 2.5 pmol/mL por 100 mg de peso de tejido húmedo. Para controles estándar y QCs, se añadieron 10 μ L de estándar de péptido por cada 100 mg de tejido cerebral (1%) con 990 μ L del regulador antes mencionado para llevar a un volumen total de 1 mL por cada 100 mg de tejido. Se usó un desgarrador de tejido en cada muestra durante aproximadamente 20 segundos. Se transfirió 1.5 mL de la muestra a un tubo Eppendorf de 2 mL. Cada muestra se sometió a sonicación con sonda durante 3 ráfagas de 5 segundos por ráfaga. La muestra se calentó a 37°C durante 30 min. La muestra se centrifugó durante 30 min a 15,000 rpm. Se observó muy poco precipitado en el fondo de cada tubo y se evitó al pipetear 1 mL de la muestra (de un volumen total de 1.5 mL) y colocar directamente en una placa OASIS®. Las sales y proteínas se eliminaron utilizando el protocolo OASIS® HLB de extracción en fase sólida (SPE) descrito anteriormente para la muestra de plasma. Después de la extracción, las muestras se secaron en una Speed Vac y se reconstituyeron en 25 μ L de 1% de ACN/0.1% de TFA/0.02% de HFBA. Se inyectaron 3 μ L de la muestra en un SYNAPT™ G2 HDMS™ (Waters Corp.) utilizando el método Full Scan MS, con un tiempo de ejecución de 16.5 min en total. Los péptidos de interés se controlaron entre 3-8 min.

La Tabla 5 y la FIGURA 10 muestran la cantidad promedio de péptido en la muestra del SNC de 5 animales a lo largo del tiempo después de una dosificación única de 0.8 mg/kg del péptido. La FIGURA 10 muestra el nivel más bajo de cuantificación a 1.4 pg/mg.

Tabla 5.

PK de Cerebro con Dosis Única			
Punto de tiempo (min)	fmol de analito/mg de tejido	pg/mg de tejido	Desviación estándar (pg/mg)
1	10.91	7.79	1.57
3	12.30	8.79	0.67
5	11.26	8.04	1.51
10	11.83	8.44	1.07

PK de Cerebro con Dosis Única			
Punto de tiempo (min)	fmol de analito/mg de tejido	pg/mg de tejido	Desviación estándar (pg/mg)
15	10.56	7.54	1.49
30	8.87	6.33	0.88
60	7.64	5.46	0.97

La Tabla 6 muestra la concentración de analito en cerebros de 2x3-min y cerebros de 2x10-min. Las concentraciones de analito se calcularon a partir de una cuantificación estándar interna de un solo punto. Los datos preliminares sugieren la penetración en el SNC. Las concentraciones de analito se calcularon a partir de una ecuación de curva de calibración de curva estándar de 7-puntos generada con muestras entre 1.4 pg de analito/mg de tejido y 89.2 pg/mg (2x diluciones en serie). La reproducibilidad entre animales para el análisis cerebral es alta (más de 21% CV). La molécula de fármaco en la C_{max} del cerebro de dosis única es de aproximadamente 9 pg de analito/mg de tejido.

Tabla 6.

Piloto de cerebro					
Identificación de muestra	Identificación de Ratón	Punto de tiempo (min)	Relación a Pesado	fmol/mg (tejido)	pg/mg (tejido)
ID07386	11F63	3	0.245	15	11
ID07387	11F64	3	0.371	23	17
ID07388	11F67	10	0.157	10	7
ID07389	11F68	10	0.435	27	19

Ejemplo 9 - Efecto del péptido mimético de ApoE en estudios de ictus murino

Modelo de isquemia-reperfusión focal

Se usó un modelo modificado de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) (Huang et al., (1994) Science, 265:1883-1885; Laskowitz et al., (1997) J. Cereb. Blood Flow Metab., 17:753-758) para determinar el efecto de los péptidos miméticos sobre la función neurológica después de accidente cerebrovascular y para evaluar la eficacia del péptido como agente terapéutico para el accidente cerebrovascular. Los ratones fueron intubados endotraquealmente después de la inducción de la anestesia con 4.6% de isoflurano, y los pulmones se ventilaron mecánicamente con 1.6% de isoflurano en 30% de O_2 /70% de N_2 . A través de una incisión cutánea cervical en la línea media, se identificó la arteria carótida común derecha. La arteria carótida externa se ligó y se seccionó transversalmente. La arteria carótida interna se seccionó distalmente hasta que se visualizó el origen de la arteria pterigopalatina. Se insertó un monofilamento de nylon 6-0 con punta roma ligeramente recubierta de silicona en el muñón de la arteria carótida externa proximal y se avanzó 11 mm en la arteria carótida interna para ocluir la arteria cerebral media. Después de 90 minutos, se retiró el filamento para restaurar la perfusión sanguínea, y la incisión de la piel se cerró con sutura. El isoflurano se suspendió y los ratones se extubaron después de la recuperación de la respiración espontánea. Los ratones postlesión se colocaron en un entorno enriquecido con oxígeno ($FIO_2 = 50\%$) durante 1 hora y luego se devolvieron a sus jaulas. La temperatura rectal fue monitoreada continuamente y servorregulada con calentamiento/enfriamiento de la superficie a 37°C durante todo el procedimiento.

Prueba de déficits motores

Dos grupos de ratones C57B1/6J machos de 10-12 semanas de edad, un grupo control (n=12) y un grupo tratado con VR-55 (n=9), recibieron MCAO. Los ratones del grupo control recibieron 100 μ L de vehículo salino normal estéril mediante inyección intravenosa en la vena de la cola a los 30 min y 6 horas después de la lesión por perfusión, mientras que los ratones del grupo tratado con VR-55 recibieron 100 μ L de vehículo salino normal estéril y VR-55 (SEQ ID NO:4; 0.05 mg/kg) mediante inyección intravenosa en la vena de la cola a los 30 min y 6 horas después de la lesión por perfusión.

Se usó un Rotorod automático (Ugo Basile, Comerio, Italia) para evaluar la función vestibulomotora, como se describió anteriormente. El día antes de MCAO, los ratones se sometieron a 2 pruebas de acondicionamiento

consecutivas a una velocidad de rotación establecida (16 rpm) durante 60 segundos, seguidas de 3 pruebas adicionales con una velocidad de rotación acelerada. El tiempo promedio para caer desde el cilindro giratorio en los 3 últimos ensayos se registró como latencia de Rotorod funcional inicial. A partir del primer día después de MCAO, los ratones se sometieron a pruebas diarias consecutivas con 3 ensayos de velocidad de rotación acelerada (intervalo interensayo de 15 minutos) durante 3 días. Se registró la latencia promedio para caer desde la barra. A los ratones que no podían agarrar la barra giratoria se les asignó una latencia de 0 segundos.

Como se muestra en las FIGURAS 12A y 12B, los ratones control y tratados con VR-55 tenían latencias de Rotorod funcionales basales similares. Los ratones de control tenían una latencia funcional de Rotorod basal de 217 +/- 20 segundos ("Salina"), mientras que los ratones tratados con VR-55 tenían una latencia Rotorod funcional inicial de 214 +/- 22 segundos ("VR-55"). En el Día 1 después de la lesión, el control y los ratones tratados con VR-55 también tenían una latencia de Rotorod funcional similar. Sin embargo, en el Día 3 posterior a la lesión, los ratones tratados con VR-55 mostraron una mejora en la latencia de Rotorod funcional en comparación con los ratones de control. Los ratones tratados con VR-55 tenían una latencia de Rotorod funcional de 216 +/- 26 segundos, mientras que los ratones de control tenían una latencia de Rotorod funcional de 161 +/- 32 segundos. Estos resultados son consistentes con una reducción en la lesión neuronal retrasada secundaria a la respuesta inflamatoria.

Se espera que los ratones tratados muestren puntos finales histológicos mejorados. Los otros péptidos miméticos descritos en el presente documento se administrarán en diversas dosificaciones y también se espera que muestren puntos finales funcionales e histológicos mejorados en un modelo MCAO de accidente cerebrovascular de ratón.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de Fórmula I:
- 5 X1-X2-X3-X4-X5 (SEQ ID NO: 1)
- o una sal del mismo, en donde el péptido aislado tiene una longitud de 5 aminoácidos y se elige entre los péptidos de la SEQ ID NO. 2-6 y 9-10.
- 10 2. El péptido aislado de la reivindicación 1, en el que el péptido se modifica mediante acetilación N-terminal y/o amidación C-terminal.
 3. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en el que la Fórmula I es VSRRR (SEQ ID NO:4) o VSKRR (SEQ ID NO:3).
 - 15 4. El péptido de la reivindicación 3, en el que la Fórmula I es modificada por VSRRR mediante acetilación N-terminal y amidación C-terminal.
 5. El péptido de la reivindicación 3, en el que la Fórmula I es modificada por VSKRR mediante acetilación N-terminal y amidación C-terminal.
 - 20 6. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido no tiene identidad de secuencia polipeptídica primaria con ninguna región de 5 aminoácidos consecutivos de la proteína ApoE humana (SEQ ID NO:14).
 7. El péptido de la reivindicación 6, en el que el péptido no tiene identidad de secuencia polipeptídica primaria con ninguno de los 5 aminoácidos consecutivos del residuo 130 al residuo 150 de la proteína ApoE humana (SEC ID NO:14).
 - 25 8. Una composición que comprende el péptido de la reivindicación 1 y un portador, diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
 - 30 9. Un péptido para uso en un método para reducir la inflamación en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad efectiva del péptido, elegido entre los péptidos de la SEQ ID NO. 2-6 y 9-10.
 - 35 10. Un péptido para uso en un método para tratar una afección neurológica en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad efectiva del péptido, elegido entre los péptidos de la SEQ ID NO. 2-6, y 9-10, en donde la condición neurológica se selecciona de al menos uno de hemorragia intracraneal, hemorragia subaracnoidea, lesión traumática del SNC, accidente cerebrovascular, encefalomiелitis alérgica experimental, esclerosis múltiple, neuroinflamación, enfermedad neurológica crónica, ELA, demencia, neuropatía, epilepsia, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer.
 - 40 11. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el método comprende administrar el péptido mediante una inyección intravenosa.
 - 45 12. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el método comprende administrar el péptido por vía oral.
 13. El péptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que el péptido se modifica mediante acetilación N-terminal y/o amidación C-terminal.
 - 50 14. El péptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que el péptido es VSRRR (SEQ ID NO:4) modificado por acetilación N-terminal y amidación C-terminal.
 15. El péptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que el péptido es VSKRR (SEQ ID NO:3) modificado por acetilación N-terminal y amidación C-terminal.
 - 55

Figura 1

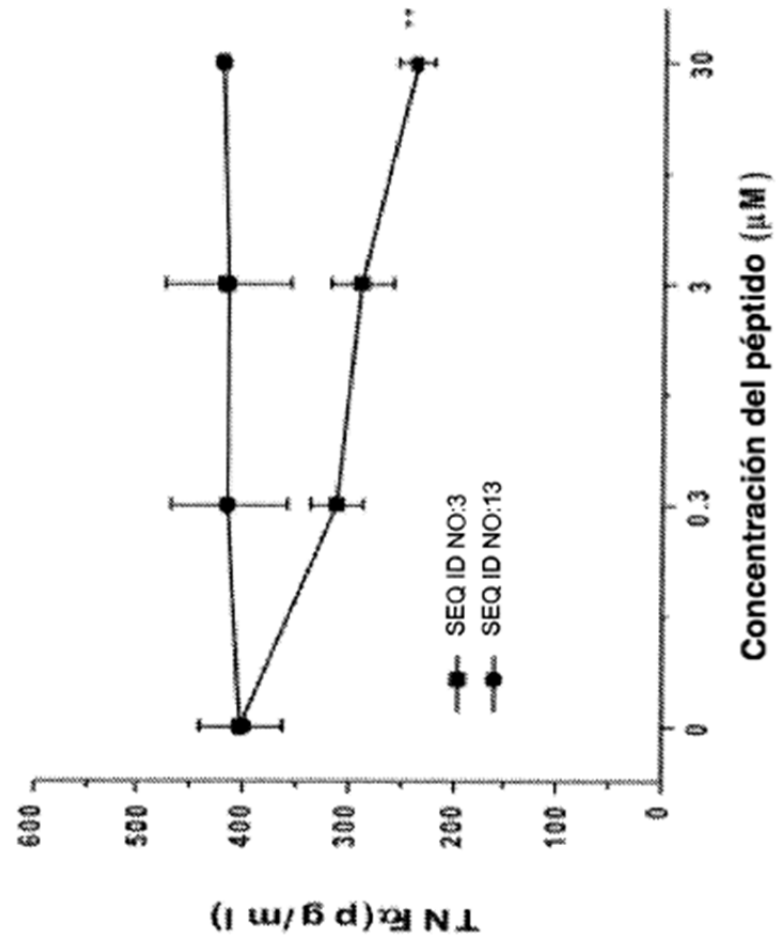


Figura 2

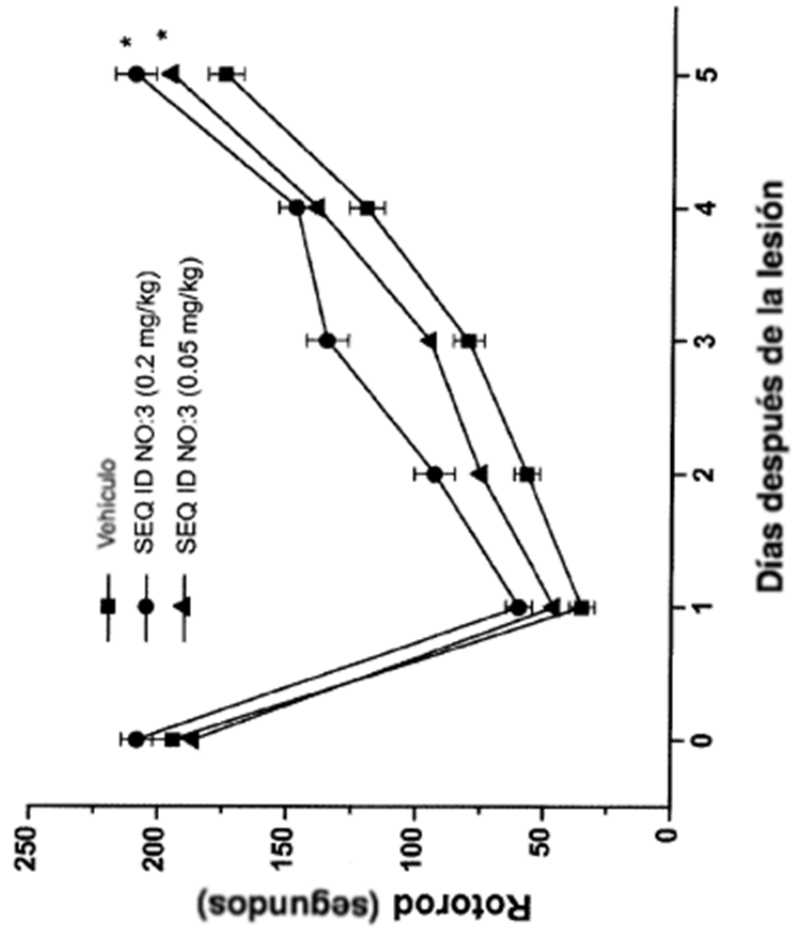


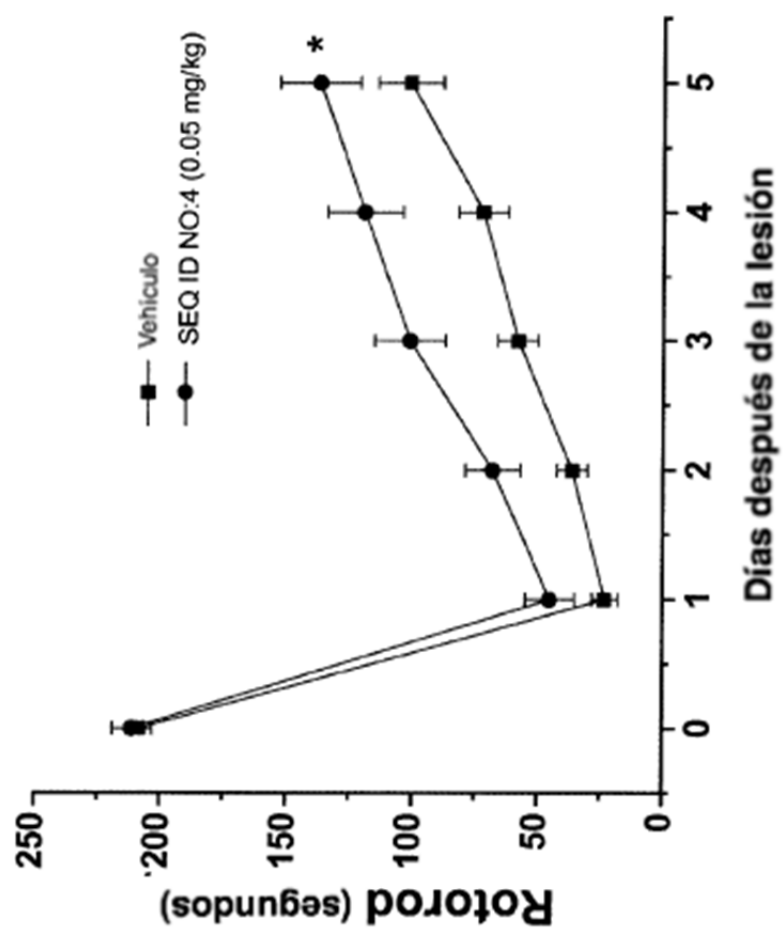
Figura 3

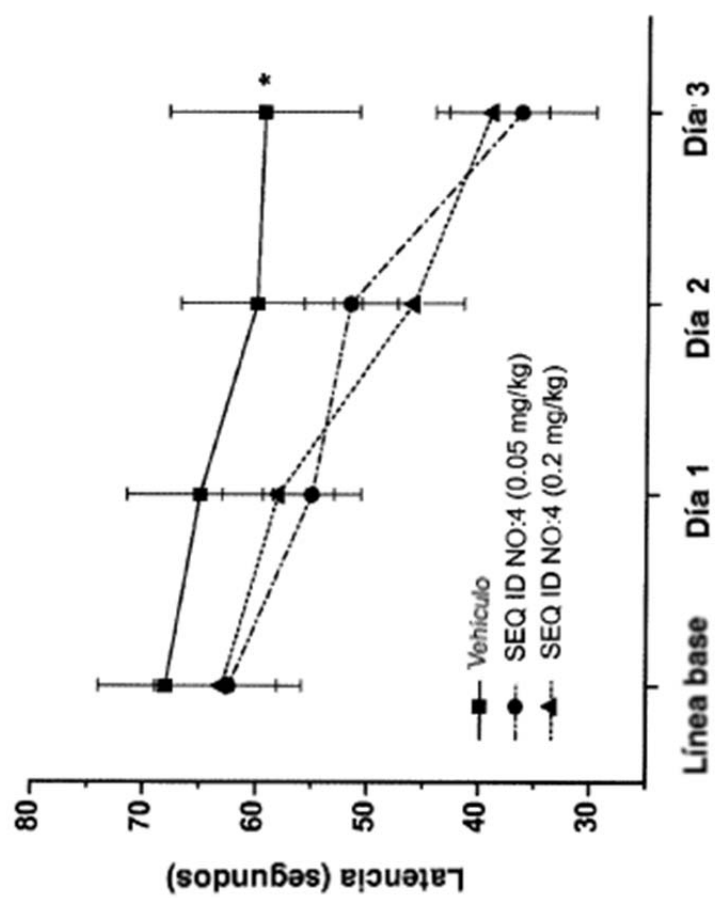
Figura 4

Figura 5

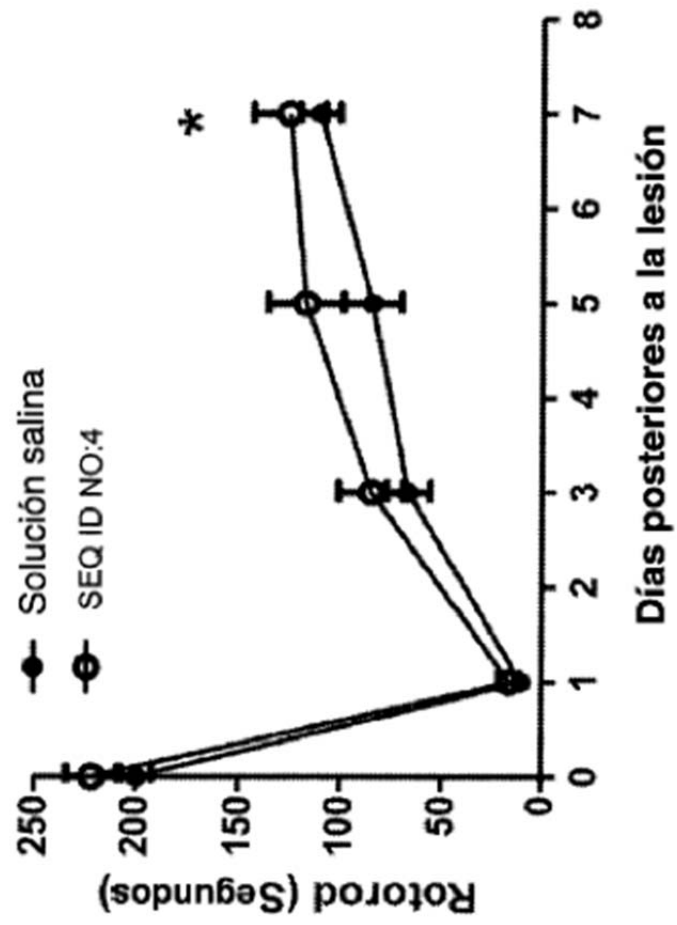


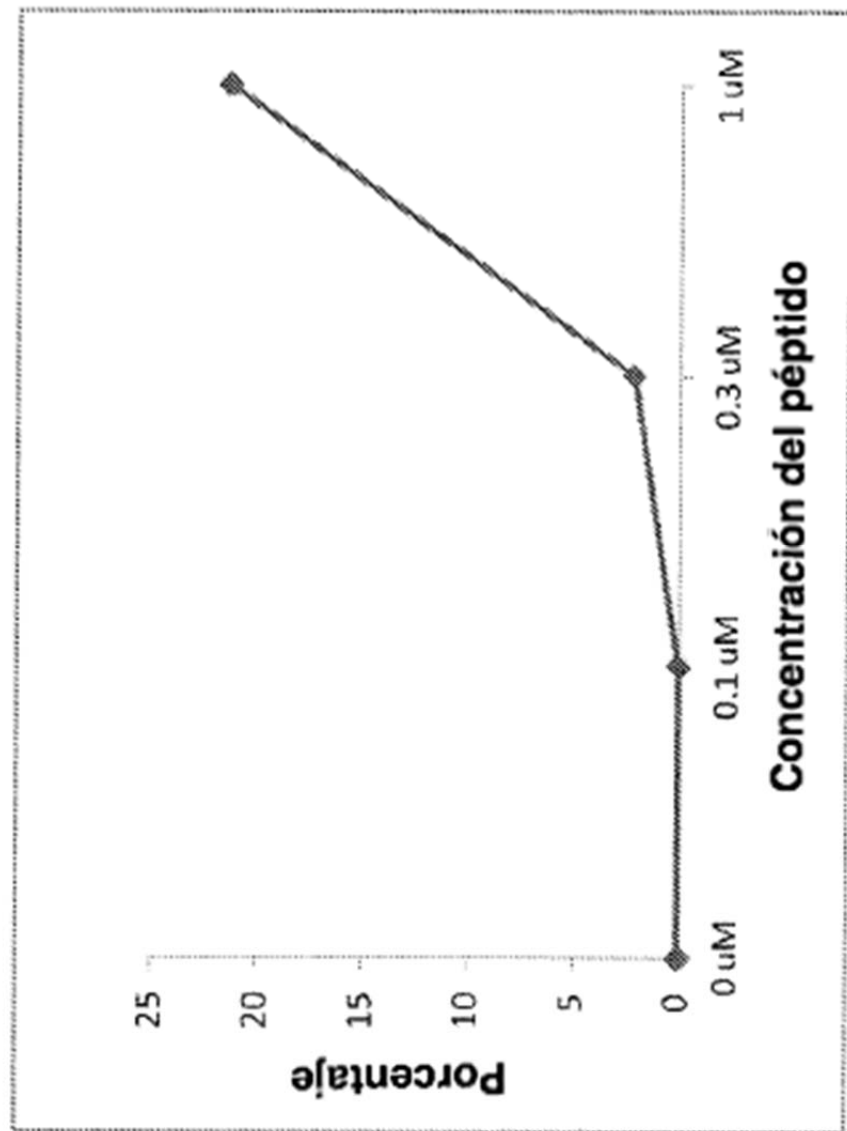
Figura 6

Figura 7

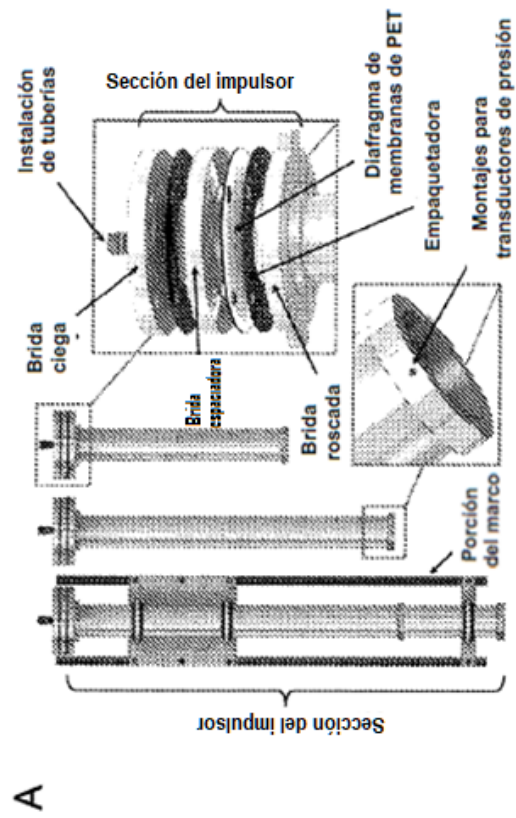


Figura 8

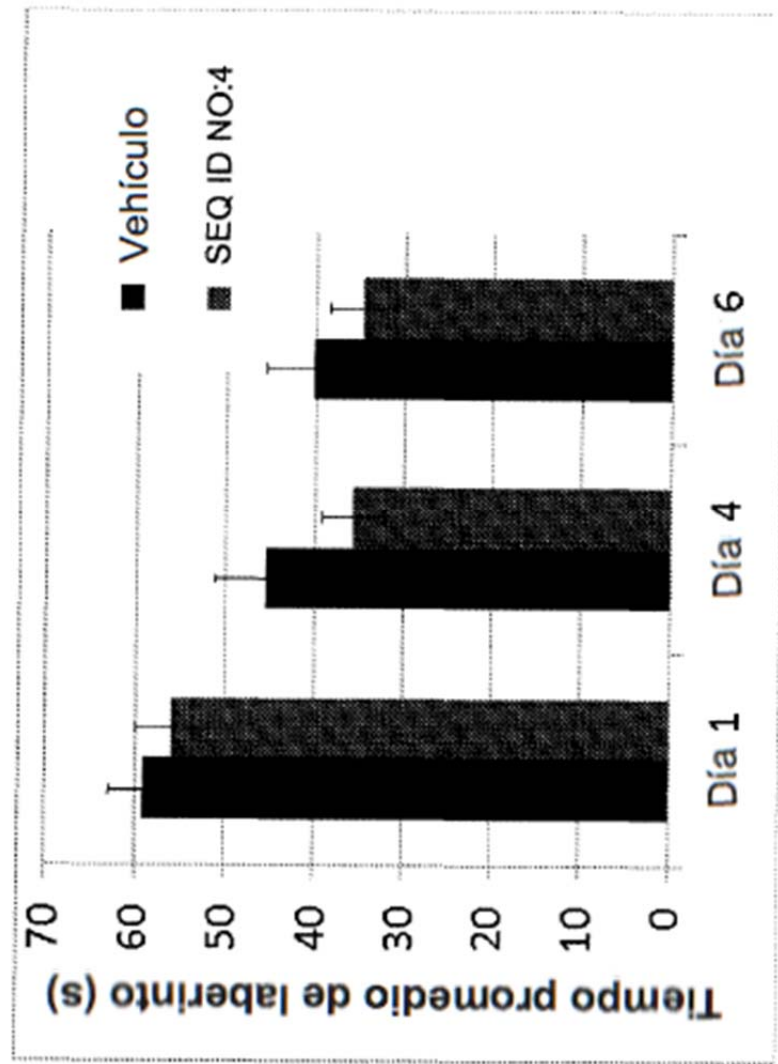


Figura 9

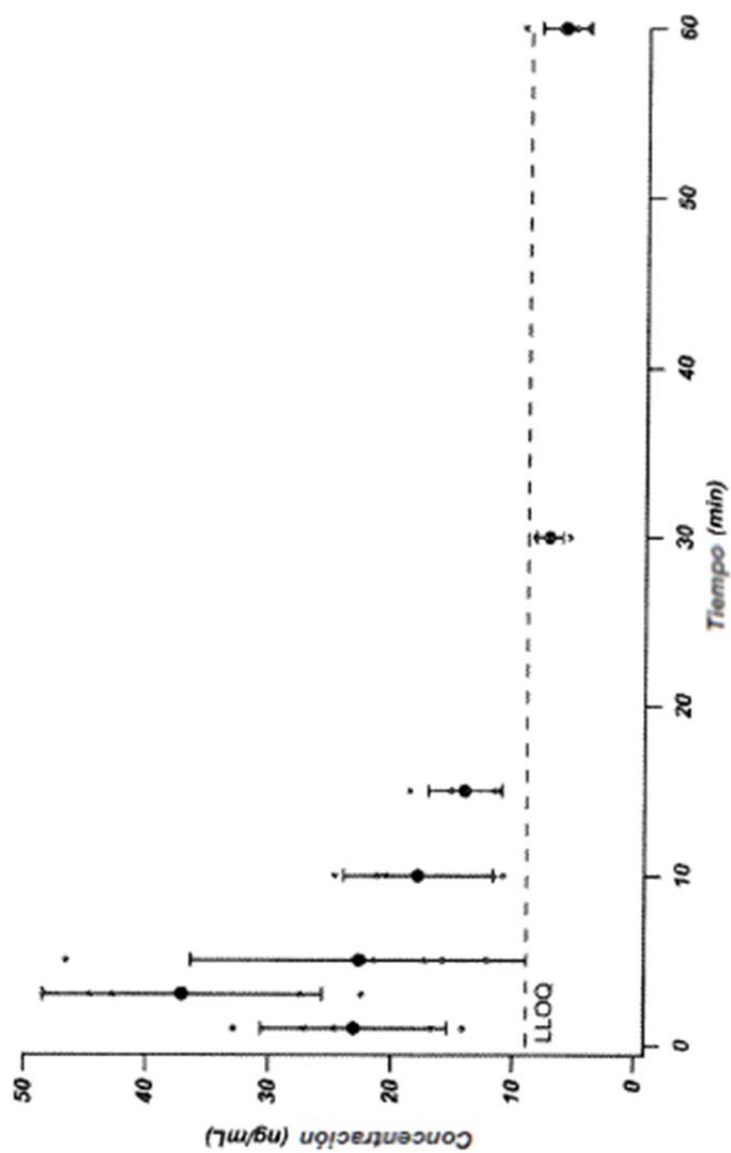


Figura 10

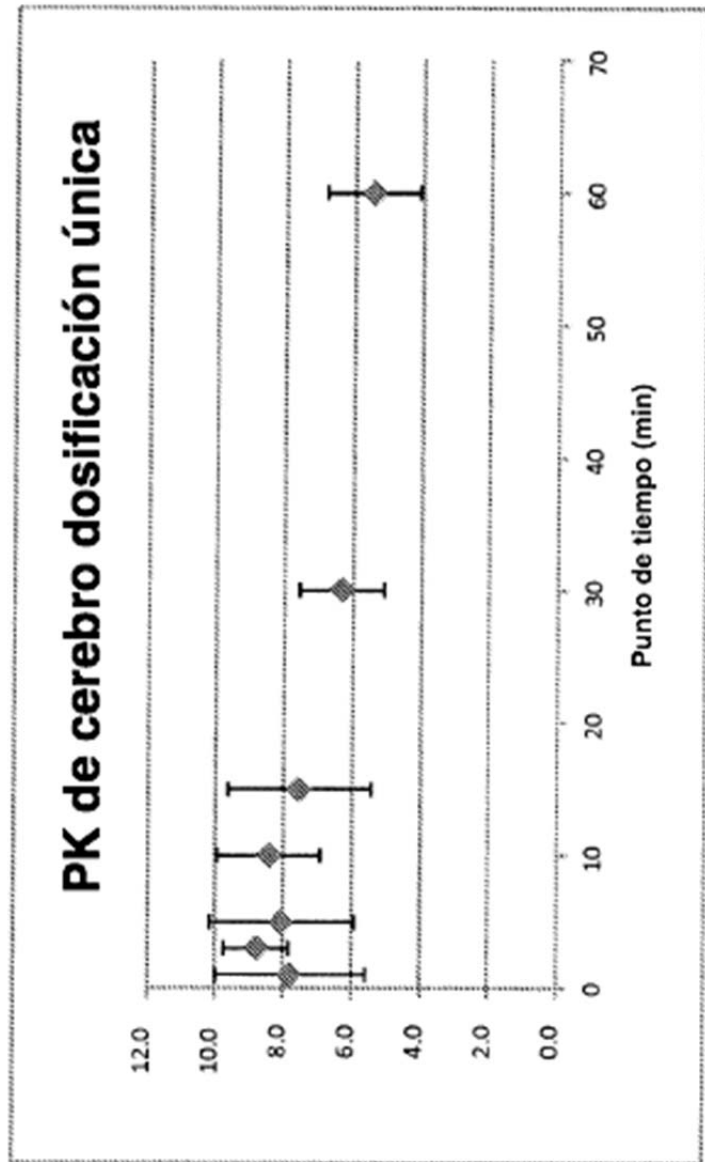


Figura 11

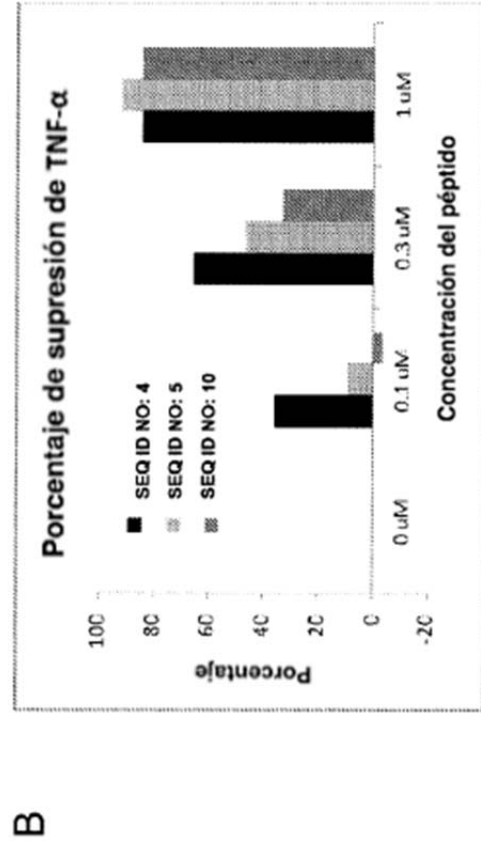
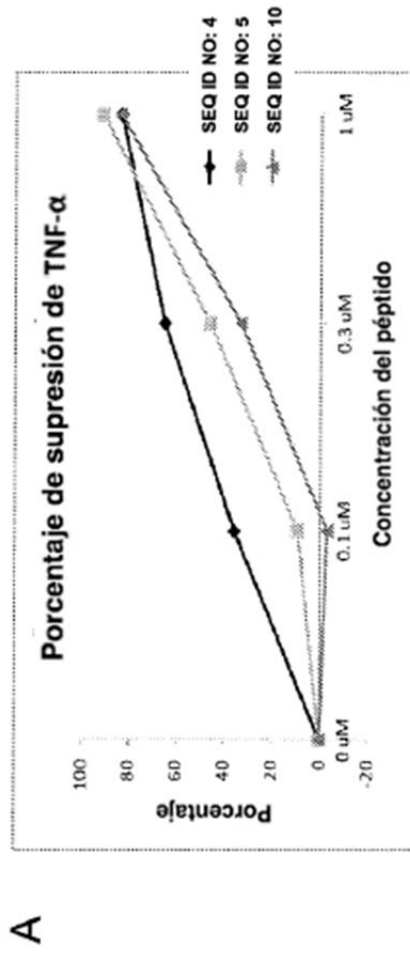


Figura 12

