

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 781**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 31/08 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 31/4178 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2013 PCT/US2013/062969**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14055591**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2013 E 13844187 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2903605**

54 Título: **Angiotensina en el tratamiento de afecciones cerebrales**

30 Prioridad:

02.10.2012 US 201261708793 P
30.10.2012 US 201261720299 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2018

73 Titular/es:

TARIX PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
12 Bow Street
Cambridge, MA 02138, US

72 Inventor/es:

FRANKLIN, RICHARD

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 689 781 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

Angiotensina en el tratamiento de afecciones cerebrales

5 ANTECEDENTES

El funcionamiento apropiado del sistema nervioso central es esencial en cualquier animal. El daño al cerebro en particular, tal como a través de un ictus isquémico o hemorrágico, puede tener efectos dramáticos y potencialmente mortales. Un obstáculo para el tratamiento o prevención de eventos perjudiciales para el cerebro es la barrera hematoencefálica, la cual es una recopilación de uniones estrechas entre células endoteliales capilares adyacentes del cerebro. Estas uniones impiden que la mayoría de sustancias crucen a menos que sean sumamente lipófilas o sean transportadas específicamente a través de la barrera hematoencefálica. Como resultado, es extremadamente difícil administrar agentes terapéuticos a través de las rutas tradicionalmente preferidas, tal como a través de una administración intravenosa o subcutánea, y observar un efecto terapéutico en el cerebro.

15

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un péptido de angiotensina (1-7), que es un péptido de siete aminoácidos de origen natural de la secuencia Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ (SEQ ID NO: 1), para su uso en un método para tratar ictus que comprende administrar, a un sujeto que padece o es susceptible a ictus, dicho péptido de angiotensina (1-7) a través de una vía de administración intravenosa o subcutánea. Como se describe en la sección de Ejemplos más adelante, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento sorprendente de que la administración sistémica, tal como la administración subcutánea, de un péptido de angiotensina (1-7) (por ejemplo, PanCyte), da como resultado una mejora de la función neurológica y motora en un modelo de rata de ictus isquémico. Antes de la presente invención, se creía que la angiotensina (1-7) no cruzaría la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, tendría que ser administrada por la ruta intracerebrovascular (ICV) o usando métodos complejos tal como la infección de células madre hematopoyéticas, que son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, con un lentivirus que causa la sobreexpresión de Ang (1-7). Mecca et al., Cerebroprotection by Angiotensin-(1-7) in Endothelin-1-Induced Ischaemic Stroke, (2011) Exp Physiol. 2011 96(10):1084-1096. Nadie ha mostrado que la administración de un péptido de angiotensina (1-7) o un agonista de angiotensina no peptídica (1-7) a través de una ruta sistémica (por ejemplo, ya sea una ruta subcutánea o intravenosa) pudiera dar como resultado niveles terapéuticos que alcancen el cerebro y, en particular, un tejido cerebral dañado.

En algunos aspectos, la descripción proporciona métodos para tratar una afección cerebral que incluyen administrar a un sujeto que padece, o es susceptible a una afección cerebral, un péptido de angiotensina (1-7) a través de administración sistémica. En algunas realizaciones, la administración sistémica adecuada para la presente invención es la administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración sistémica adecuada para la presente invención es la administración subcutánea. En algunas realizaciones, la administración sistémica adecuada para la presente invención no incluye la administración intracerebroventricular. En algunas realizaciones, la afección cerebral es ictus. En algunas realizaciones, el ictus es ictus isquémico. En algunas realizaciones, el ictus es ictus hemorrágico.

En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a través de infusión continua. En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra en un intervalo de administración. Por ejemplo, el péptido de angiotensina (1-7) se puede administrar tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, dos veces a la semana, una vez a la semana, tres veces al mes, dos veces al mes, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, en un intervalo irregular.

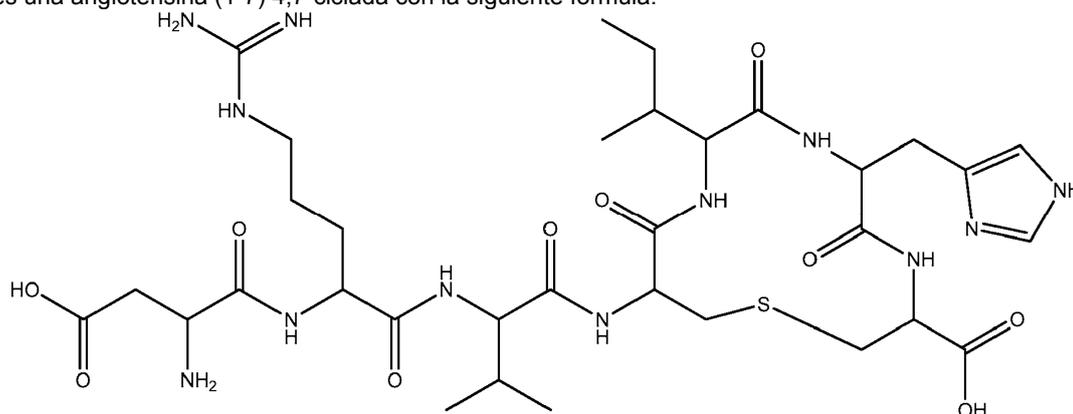
Se contempla que las diversas realizaciones pueden usar diferentes cantidades de péptido de angiotensina (1-7). En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 1-1.000 µg/kg/día (por ejemplo, que varía de aproximadamente 1-900 µg/kg/día, 1-800 µg/kg/día, 1-700 µg/kg/día, 1-600 µg/kg/día, 1-500 µg/kg/día, 1-400 µg/kg/día, 1-300 µg/kg/día, 1-200 µg/kg/día, 1-100 µg/kg/día, 1-90 µg/kg/día, 1-80 µg/kg/día, 1-70 µg/kg/día, 1-60 µg/kg/día, 1-50 µg/kg/día, 1-40 µg/kg/día, 1-30 µg/kg/día, 1-20 µg/kg/día, 1-10 µg/kg/día). En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 1-500 µg/kg/día. En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 1-100 µg/kg/día. En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 1-60 µg/kg/día. En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz seleccionada

de aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1.000 ug/kg/día.

El péptido de angiotensina (1-7) comprende la secuencia de aminoácidos de angiotensina (1-7) de origen natural de
 5 Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ (SEQ ID NO:1).

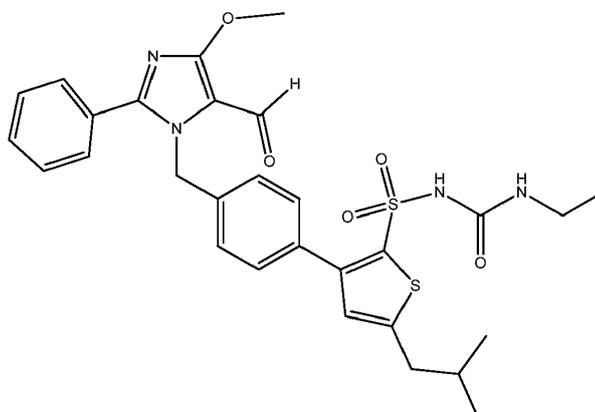
En algunos aspectos, el péptido de angiotensina (1-7) es un equivalente funcional de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el equivalente funcional es un péptido lineal. En algunos aspectos, el péptido lineal comprende una secuencia que incluye al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis aminoácidos de los siete aminoácidos que
 10 aparecen en la angiotensina (1-7) de origen natural, en donde al menos cuatro, cinco o seis los aminoácidos mantienen sus posiciones relativas tal como aparecen en la angiotensina (1-7) de origen natural. En algunos aspectos, el péptido lineal contiene 4-25 aminoácidos. En algunos aspectos, el péptido lineal es un fragmento de la Angiotensina (1-7) de origen natural. En algunos aspectos, el péptido lineal contiene sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos en la Angiotensina (1-7) de origen natural. En algunas realizaciones, el péptido lineal
 15 tiene una secuencia de aminoácidos de Asp¹-Arg²-Val³-Ser⁴-Ile⁵-His⁶-Cys⁷ (SEQ ID NO:6).

En algunos aspectos, el equivalente funcional es un péptido cíclico. En algunos aspectos, el péptido cíclico comprende una unión entre aminoácidos. En algunos aspectos, la unión se sitúa en los residuos correspondientes a las posiciones Tyr⁴ y Pro⁷ en la Angiotensina (1-7) de origen natural. En algunos aspectos, la unión es un puente
 20 tioéter. En algunos aspectos, el péptido cíclico comprende una secuencia de aminoácidos idéntica de otro modo a la secuencia de aminoácidos de Angiotensina (1-7) de origen natural de Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ (SEQ ID NO:1). En algunos aspectos, el péptido cíclico comprende una posición de reemplazo de norleucina (Nle) Val³ en la Angiotensina (1-7) de origen natural. En algunos aspectos, el péptido cíclico es una angiotensina (1-7) 4,7-ciclada con la siguiente fórmula Asp¹-Arg²-Val³-Ser⁴-Ile⁵-His⁶-Cys⁷ (SEQ ID NO: 22). En algunas realizaciones, el péptido
 25 cíclico es una angiotensina (1-7) 4,7-ciclada con la siguiente fórmula:



En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) comprende una o más modificaciones químicas para
 30 aumentar la resistencia a proteasas, estabilidad en suero y/o la biodisponibilidad. En algunas realizaciones, la una o más modificaciones químicas comprenden pegilación.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona métodos para tratar afecciones cerebrales incluyendo, pero sin limitación: ictus, demencia vascular y lesión cerebral traumática, incluyendo administrar a un sujeto que
 35 padece o es susceptible a una o más afecciones cerebrales, un agonista del receptor de angiotensina (1-7). En algunos aspectos, el agonista del receptor de angiotensina (1-7) es un agonista no peptídico. En algunas realizaciones, el agonista no peptídico es un compuesto con la siguiente estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Como se usa en esta solicitud, los términos "aproximadamente" y "en torno a" se usan como equivalentes. Se pretende que cualquier número usado en esta solicitud con o sin aproximadamente/en torno a incluya cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica relevante.

Otras características, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada, aunque indica realizaciones de la presente invención, se proporciona a modo de ilustración únicamente, no como limitación. Se harán evidentes diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

15

La Figura 1 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba de marcha administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y cierta cantidad de PanCyte durante 14 o 49 días.

20

La Figura 2 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba de colocación de miembros delanteros administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y cierta cantidad de PanCyte durante 14 o 49 días.

La Figura 3 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba de balanceo del cuerpo administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y cierta cantidad de PanCyte durante 14 o 49 días.

25

La Figura 4 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba neurológica (Escala de clasificación de neuropuntuación modificada) administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y cierta cantidad de PanCyte durante 14 o 49 días.

La Figura 5 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba de marcha administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y se les administró por vía subcutánea TXA127, PanCyte, o PanCyte lineal durante 28 días.

30

La Figura 6 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba de colocación de miembros delanteros administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y se les administró por vía subcutánea TXA127, PanCyte, o PanCyte lineal durante 28 días.

La Figura 7 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba de balanceo del cuerpo administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y se les administró por vía subcutánea TXA127, PanCyte, o PanCyte lineal durante 28 días.

35

La Figura 8 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba neurológica (Escala de clasificación de neuropuntuación modificada) administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y se les administró por vía subcutánea TXA127, PanCyte, o PanCyte lineal durante 28 días.

40

La Figura 9 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara la relación de perfusión de sangre entre los lados isolateral y contralateral, así como también el diámetro de vasos sanguíneos, en animales a los que se administró por vía subcutánea TXA127, PanCyte o PanCyte lineal a través de inyección durante 28 días.

La Figura 10 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba de marcha administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y se les administró

45

por vía subcutánea PanCyte o AVE0991 durante 28 días.

La Figura 11 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba de colocación de miembros delanteros administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y se les administró por vía subcutánea PanCyte o AVE0991 durante 28 días.

5 La Figura 12 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba de balanceo del cuerpo administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y se les administró por vía subcutánea PanCyte o AVE0991 durante 28 días.

10 La Figura 13 muestra un gráfico de barras ejemplar que compara los resultados de una prueba neurológica (Escala de clasificación de neuropuntuación modificada) administrada en ratas que recibieron una oclusión de la arteria cerebral media transitoria y se les administró por vía subcutánea PanCyte o AVE0991 durante 28 días.

DEFINICIONES

15 Con el propósito de que la presente invención sea entendida más fácilmente, a continuación se definen en primer lugar ciertos términos. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se exponen a lo largo de toda la memoria descriptiva.

Animal: Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal.

20 En algunas realizaciones, "animal" se refiere a seres humanos, en cualquier fase de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier fase de desarrollo. En ciertas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado vacuno, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero sin limitación, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal
25 puede ser un animal transgénico, un animal diseñado genéticamente y/o un clon.

En torno a o aproximadamente: Como se usa en el presente documento, el término "en torno a" o "aproximadamente", aplicado a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "en torno a" o "aproximadamente" se refiere a un intervalo
30 de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos en cualquier dirección (mayor de o menor de) del valor de referencia establecido a menos que se indique de otro modo o sea evidente de otra manera a partir del contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100% de un posible valor).

35 *Biológicamente activo:* Como se usa en el presente documento, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, y particularmente en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera que es biológicamente activo. En realizaciones particulares, cuando un péptido es biológicamente activo, una porción de ese péptido que comparte al menos una actividad biológica del péptido se denomina
40 típicamente como una porción "biológicamente activa". En ciertas realizaciones, un péptido que no tiene actividad biológica intrínseca pero que inhibe los efectos de uno o más compuestos de angiotensina de origen natural se considera que es biológicamente activo.

45 *Afección cerebral* - como se usa en el presente documento, una "afección cerebral" es cualquier enfermedad, trastorno o evento que da como resultado un daño y/o disfunción de al menos una porción del cerebro de un sujeto. Los ejemplos no limitantes de afecciones cerebrales incluyen: ictus (tanto isquémico como hemorrágico), demencia vascular y traumatismo craneoencefálico.

50 *Vehículo o diluyente:* Como se usa en el presente documento, los términos "vehículo" y "diluyente" se refieren a un vehículo o sustancia diluyente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, que es segura y no es tóxica para la administración a un ser humano) que es útil para la preparación de una formulación farmacéutica. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWF1), una solución de pH tamponado (por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

55 *Forma de dosificación:* Como se usa en el presente documento, los términos "forma de dosificación" y "forma de dosificación unitaria" se refieren a una unidad físicamente discreta de un agente terapéutico para el paciente a tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, se entenderá que la dosificación oral de la composición será decidida por el médico a cargo

del caso dentro del alcance del buen criterio médico.

Régimen de dosificación: Un "régimen de dosificación" (o "régimen terapéutico"), como ese término se usa en el presente documento, es un conjunto de dosis unitarias (típicamente más de una) que se administran individualmente a un sujeto, separadas típicamente por periodos de tiempo. En algunas realizaciones, un agente terapéutico determinado tiene un régimen de dosificación recomendado, el cual puede implicar una o más dosis. En una o más realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis cada una de las cuales está separada de la otra por un periodo de tiempo de la misma longitud; en algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y al menos dos periodos de tiempo diferentes que separan las dosis individuales.

10 En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra continuamente durante un periodo predeterminado. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra una vez al día (QD) o dos veces al día (BID).

Equivalente o derivado funcional: Como se usa en el presente documento, el término "equivalente funcional" o "derivado funcional" representa, en el contexto de un derivado funcional de una secuencia de aminoácidos, una molécula que retiene una actividad biológica (ya sea funcional o estructural) que es sustancialmente similar a la de la secuencia original. Un derivado o equivalente funcional puede ser un derivado natural o se prepara sintéticamente. Los derivados funcionales ejemplares incluyen secuencias de aminoácidos que tienen sustituciones, eliminaciones o adiciones de uno o más aminoácidos, con la condición de que se conserve la actividad biológica de la proteína. El aminoácido de sustitución tiene deseablemente propiedades fisicoquímicas que son similares a las del aminoácido sustituido. Las propiedades fisicoquímicas, similares, deseables incluyen similitudes en cuanto a la carga, voluminosidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y similares.

15

20

Mejorar, aumentar o reducir: Como se usa en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir" o equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición del valor inicial, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento, o una medición en un sujeto de control (o múltiples sujetos de control) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un "sujeto de control" es un sujeto afligido con la misma forma de enfermedad que el sujeto que se trata, quien tiene aproximadamente la misma edad que el sujeto que se trata.

25

In vitro: Como se usa en el presente documento, el término "*in vitro*" se refiere a eventos que tienen lugar en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o un recipiente de reacción, en un cultivo de células, etc., en lugar de dentro de un organismo multi-celular.

30

In vivo: Como se usa en el presente documento, el término "*in vivo*" se refiere a eventos que tienen lugar dentro de un organismo multi-celular, tal como un ser humano y un animal no humano. En el contexto de los sistemas basados en células, el término se puede usar para referirse a eventos que tienen lugar dentro de una célula viva (en contraposición a, por ejemplo, los sistemas *in vitro*).

35

Aislado: Como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a una sustancia y/o entidad que se ha (1) separado de al menos algunos de los componentes con los que estaba asociada cuando se produjo inicialmente (ya sea en un entorno natural y/o en un entorno experimental), y/o (2) producido, preparado y/o fabricado por el hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas se pueden separar de al menos aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, sustancialmente el 100%, o el 100% de los demás componentes con los que se asociaron inicialmente. En algunas realizaciones, los agentes aislados son puros en más de aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, sustancialmente el 100%, o el 100%. Como se usa en el presente documento, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Como se usa en el presente documento, el término "célula aislada" se refiere a una célula que no está contenida en un organismo multi-celular.

40

45

50

Prevenir: Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" o "prevención", cuando se usa en relación con la aparición de una enfermedad, trastorno y/o afección, se refiere a la reducción del riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno y/o afección. Véase la definición de "riesgo".

55

Polipéptido: El término "polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos conjuntamente a través de enlaces peptídicos. El término se usa para referirse a una cadena de

aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto en la técnica entenderá que el término no está limitado a cadenas largas y puede referirse a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos unidos conjuntamente a través de un enlace peptídico. Como se sabe por los expertos en la técnica, los polipéptidos pueden ser procesados y/o modificados.

5

Proteína: El término "proteína" como se usa en el presente documento se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad discreta. Si un polipéptido individual es la unidad funcional discreta y no requiere una asociación física permanente o temporal con otros polipéptidos con el fin de formar la unidad funcional discreta, los términos "polipéptido" y "proteína" se pueden usar de manera intercambiable. Si la unidad funcional discreta está compuesta por más de un polipéptido que se asocian físicamente entre sí, el término "proteína" se refiere a los múltiples polipéptidos que se acoplan físicamente y funcionan conjuntamente como la unidad discreta.

10

Riesgo: Como se entenderá a partir del contexto, un "riesgo" de una enfermedad, trastorno y/o afección comprende la probabilidad de que un individuo particular desarrollará una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, ictus). En algunas realizaciones, el riesgo se expresa como un porcentaje. En algunas realizaciones, el riesgo es del 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hasta el 100%. En algunas realizaciones, el riesgo se expresa como un riesgo en relación con un riesgo asociado con una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia. En algunas realizaciones, una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia tienen un riesgo conocido de una enfermedad, trastorno, afección y/o evento (por ejemplo, ictus). En algunas realizaciones, una muestra de referencia o un grupo de muestras de referencia son de individuos comparables con un individuo particular. En algunas realizaciones, el riesgo relativo es 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más.

15

20

Estabilidad: Como se usa en el presente documento, el término "estable" se refiere a la capacidad del agente terapéutico para mantener su eficacia terapéutica (por ejemplo, la totalidad o la mayoría de su actividad biológica pretendida y/o integridad fisicoquímica) durante periodos prolongados de tiempo. La estabilidad de un agente terapéutico y la capacidad de la composición farmacéutica para mantener la estabilidad de dicho agente terapéutico, se pueden evaluar durante periodos prolongados de tiempo (por ejemplo, durante al menos 1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36 meses o más). En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento han sido formuladas de tal manera que sean capaces de estabilizar, o, como alternativa, disminuir la velocidad o prevenir la degradación, de uno o más agentes terapéuticos formulados con las mismas. En el contexto de una formulación, una formulación estable es una en la que el agente terapéutico en la misma retiene esencialmente su integridad física y/o química y actividad biológica tras el almacenamiento y durante los procesos (tales como congelación/descongelación, mezcla mecánica y liofilización).

25

30

Sujeto: Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un ser humano o cualquier animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado vacuno, cerdo, oveja, caballo o primate). Un ser humano incluye formas pre y post-natales. En muchas realizaciones, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, el cual se refiere a un humano que se presenta en un proveedor médico para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término "sujeto" se usa en el presente documento de manera intercambiable con "individuo" o "paciente". Un sujeto puede estar afligido con o es susceptible a una enfermedad o trastorno pero puede exhibir o no síntomas de la enfermedad o trastorno.

35

40

Sustancialmente: Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir la extensión o el grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en la técnica biológica entenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente, si acaso, llegan a término y/o avanzan hasta su finalización o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

45

Que padece: Un individuo que "padece" una enfermedad, trastorno y/o afección ha sido diagnosticado con o presente uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección.

50

Susceptible a: Un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno y/o afección no ha sido diagnosticado con la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección puede no presentar síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno, condición o evento (por ejemplo, ictus isquémico) puede estar caracterizado por uno o más de los siguientes: (1) una mutación genética asociada con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (2) un polimorfismo genético asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (3) una expresión y/o actividad aumentada y/o disminuida de

55

una proteína asociada con la enfermedad, trastorno y/o afección; (4) hábitos y/o estilos de vida asociados con el desarrollo de la enfermedad, trastorno, condición y/o evento, (5) al que se ha sometido, o se planea someter, o que requiere un trasplante. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico significa una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, diagnosticar, prevenir y/o retardar la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. Se apreciará por los expertos en la técnica que una cantidad terapéuticamente eficaz se administra típicamente a través de un régimen de dosificación que comprende al menos una dosis unitaria.

Tratamiento: Como se usa en el presente documento, el término "tratar", "tratamiento" o "tratando" se refiere a cualquier método usado para aliviar, mejorar, mitigar, inhibir, prevenir, retardar la aparición de, reducir la gravedad de y/o reducir parcial, o completamente, la incidencia de uno o más síntomas o cualidades de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. El tratamiento se puede administrar a un sujeto quien no presente signos de una enfermedad y/o presente solo los primeros signos de la enfermedad con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS REALIZACIONES

La presente invención proporciona, entre otras cosas, composiciones mejoradas y métodos para tratar o reducir el riesgo de afecciones cerebrales que sean resultado del daño a o un trastorno del tejido cerebral.

Diversos aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones. No se pretende que el uso de secciones limite la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa.

30 Afecciones cerebrales

Ictus

El cerebro es sumamente vulnerable a una alteración en su suministro de oxígeno. La anoxia y la isquemia que duran solo algunos segundos pueden causar síntomas y si la condición persiste durante minutos, pueden causar daño neuronal irreversible. Por consiguiente, el ictus es una causa prominente de discapacidad seria a largo plazo y una causa principal de muerte en Estados Unidos. El ictus también es una carga significativa a la industria médica, en donde los costos sanitarios totales por discapacidad debida al ictus se estima que son de aproximadamente 53 billones de dólares anualmente.

Existen dos tipos de ictus: isquémico y hemorrágico. El ictus isquémico implica una obstrucción en uno o más vasos sanguíneos que suministran sangre al tejido cerebral, por ejemplo, la oclusión resultante de trombos ateroscleróticos, o embolia. El ictus isquémico (isquemia cerebral) representa aproximadamente el 88% de todos los ictus, lo que hace que el ictus isquémico sea uno de los tipos más comunes de lesión cerebrovascular. Las afecciones isquémicas en el cerebro conducen rápidamente a la muerte neuronal, que conduce a menudo a déficits sensoriales permanentes. Un ictus hemorrágico se define en el presente documento como la acumulación de sangre en cualquier parte dentro de la calota craneal. Los ictus hemorrágicos pueden ser resultado de muchas causas, incluyendo la lesión resultante de un hematoma en expansión, lo que altera o distorsiona el tejido.

Una barrera principal en el tratamiento del ictus tanto isquémico como hemorrágico es la administración de un agente terapéutico que alcanzará un tejido afectado. Dada la eficacia de la barrera hematoencefálica, pocos compuestos son capaces de cruzarla y afectar al tejido cerebral. Previamente, la administración de compuestos tales como angiotensina (1-7) tenía que hacerse usando la administración intracerebroventricular (ICV). Sorprendentemente, las realizaciones de la presente invención, incluyendo los péptidos de angiotensina (1-7) ejemplares descritos a continuación, son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica sin sistemas de suministro complejos tales como células madre modificadas o similares. En su lugar, en algunas realizaciones, los péptidos de angiotensina (1-7) se pueden administrar a través de rutas intravenosas o subcutáneas.

Demencia vascular

La demencia vascular es la segunda forma más común de demencia, por detrás de la enfermedad de Alzheimer. La demencia vascular puede ser resultado de problemas con el suministro de sangre en el cerebro, tal como los causados por el ictus isquémico o hemorrágico o de otras causas que conducen al desarrollo de lesiones en el cerebro. Otras causas de la demencia vascular incluyen angiopatía amiloidea cerebral, hipercolesterolemia, diabetes mellitus o enfermedad cardiovascular. La demencia resultante de uno o más ictus también se conoce como "demencia de infarto individual" o "demencia de múltiples infartos", dependiendo de la causa de origen.

El tratamiento de la demencia vascular se ha enfocado principalmente en la prevención de lesiones cerebrovasculares adicionales a través del uso de fármacos antiplaquetas y cambios de estilo de vida (alteración de la dieta, cese del hábito de fumar, etc.). Los inhibidores de colinesterasa tales como galantamina también se han explorado para su uso en este escenario clínico, pero este tipo de tratamiento está relacionado con el mantenimiento de la función de acetilcolina en el cerebro, y no la recuperación o generación de un suministro de sangre mejorado y sostenido. Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención representan una terapia intravenosa y subcutánea novedosa dirigida a mejorar las causas subyacentes de la enfermedad en lugar de la gestión de síntomas o la maximización de recursos de tejidos restantes.

Lesión cerebral traumática

La lesión cerebral traumática (TBI), una forma de una lesión cerebral adquirida, se produce cuando un traumatismo repentino causa daño al cerebro. La TBI puede producirse cuando la cabeza golpea repentinamente y violentamente un objeto (o viceversa), o cuando un objeto perfora el cráneo y entra en el tejido cerebral. Los síntomas de una TBI pueden ser leves, moderados o graves, dependiendo del grado del daño al cerebro. Una persona con una TBI leve puede permanecer consciente o puede experimentar una pérdida de conciencia durante pocos segundos o minutos. Otros síntomas del TBI leve incluyen cefalalgia, confusión, mareo, vértigo, visión borrosa u ojos cansados, zumbido en los oídos, mal gusto en la boca, fatiga o letargo, un cambio en los patrones de sueño, cambios de comportamiento o estado de ánimo y problemas con la memoria, concentración, atención o manera de pensar. Una persona con una TBI moderada o grave puede mostrar estos mismos síntomas, pero también puede tener una cefalalgia que empeora o no desaparece, vómito o náuseas repetidas, convulsiones o ataques epilépticos, incapacidad para despertarse, dilatación de una o ambas pupilas de los ojos, habla ininteligible, debilidad o entumecimiento en las extremidades, pérdida de coordinación y aumento de la confusión, inquietud o agitación.

Los tratamientos para la TBI se enfocan principalmente en la prevención de lesión o complicaciones adicionales. Las preocupaciones principales en el tratamiento de la TBI incluyen asegurar un suministro apropiado de oxígeno al cerebro y la inactividad del cuerpo, mantener un flujo adecuado de sangre y controlar la presión sanguínea. Frecuentemente, el tratamiento principal de una persona que padece TBI que recibe post-estabilización es la rehabilitación que implica programas de tratamiento adaptados individualmente en las áreas de terapia física, terapia ocupacional, terapia de habla/lenguaje, psicología/psiquiatría y apoyo social. Las realizaciones de la presente invención proporcionan un tratamiento novedoso para esos pacientes.

Péptidos de angiotensina (1-7)

Como se usa en el presente documento, el término "péptido de angiotensina (1-7)" se refiere tanto a Angiotensina (1-7) de origen natural como a cualquier equivalente funcional, análogo o derivado de Angiotensina (1-7) de origen natural. Como se usa en el presente documento, "péptido" y "polipéptido" son términos intercambiables y se refieren a dos o más aminoácidos unidos conjuntamente por un enlace peptídico. Como se usa en el presente documento, los términos "péptido" y "polipéptido" incluyen un péptido tanto lineal como cíclico. Los términos "angiotensina (1-7)", "Angiotensina (1-7)" y "Ang (1-7)" se usan de manera intercambiable.

Angiotensina (1-7) de origen natural

La Angiotensina (1-7) de origen natural (también denominada como Ang (1-7)) es un péptido de siete aminoácidos mostrado a continuación:

Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ (SEQ ID NO:1)

Es parte del sistema de renina-angiotensina y se convierte a partir de un precursor, también conocido como Angiotensinógeno, el cual es una α -2-globulina que se produce constitutivamente y se libera a la circulación principalmente por el hígado. El angiotensinógeno es un miembro de la familia de serpina y también es conocido

como sustrato de renina. El angiotensinógeno humano tiene 452 aminoácidos de largo, pero otras especies tienen un angiotensinógeno de varios tamaños. Típicamente, los primeros 12 aminoácidos son los más importantes para la actividad de la angiotensina:

5 Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰-Val¹¹-Ile¹² (SEQ ID NO:3)

Diferentes tipos de angiotensina se pueden formar por medio de la acción de diversas enzimas. Por ejemplo, la Angiotensina (1-7) se genera por la acción de la enzima 2 convertidora de Angiotensina (ACE 2).

10 La Ang (1-7) es un ligando endógeno para receptores de Mas. Los receptores de Mas son un receptor acoplado a la proteína G que contiene siete regiones que abarcan la transmembrana. Como se usa en el presente documento, el término "receptor de angiotensina (1-7)" incluye los Receptores de Mas acoplados a la proteína G.

15 Como se usa en el presente documento, el término "Angiotensina (1-7) de origen natural" incluye cualquier péptido de Angiotensina (1-7) purificado de fuentes naturales y cualquier péptido producido de manera recombinante o sintetizado químicamente que tenga una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la Angiotensina (1-7) de origen natural.

Equivalentes funcionales, análogos o derivados funcionales de Ang (1-7)

20 En algunas realizaciones, un péptido de angiotensina (1-7) adecuado para la presente invención es un equivalente funcional de Ang-(1-7) de origen natural. Como se usa en el presente documento, un equivalente funcional de la Ang (1-7) de origen natural se refiere a cualquier péptido que comparte una identidad de secuencias de aminoácidos con la Ang (1-7) de origen natural y retiene sustancialmente la misma o similar actividad que la Ang (1-7) de origen
25 natural. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un equivalente funcional de Ang (1-7) de origen natural descrito en el presente documento tiene actividad pro-angiogénica determinada utilizando métodos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica, o una actividad tal como liberación de óxido nítrico, vasodilatación, función endotelial mejorada, anti-diuresis, o una de las otras propiedades analizadas en el presente documento, que afecta positivamente la angiogénesis. En algunas realizaciones, un equivalente funcional de la Ang (1-7) de origen natural
30 descrito en el presente documento puede unirse a o activar un receptor de angiotensina (1-7) (por ejemplo, el receptor de Mas acoplado a la proteína G) según se determina usando diversos ensayos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, un equivalente funcional de Ang (1-7) también se denomina como un análogo o derivado de angiotensina (1-7), o un derivado funcional.

35 Típicamente, un equivalente funcional de angiotensina (1-7) comparte una similitud de secuencia de aminoácidos con la Ang (1-7) de origen natural. En algunas realizaciones, un equivalente funcional de la Ang (1-7) de acuerdo con la invención contiene una secuencia que incluye al menos 3 (por ejemplo, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7) aminoácidos de los siete aminoácidos que aparecen en la Ang (1-7) de origen natural, en donde al menos 3 (por ejemplo, al menos 4, al menos 5, al menos 6 o al menos 7) aminoácidos mantienen sus posiciones
40 relativas y/o separación como que aparecen en la Ang (1-7) de origen natural.

En algunas realizaciones, un equivalente funcional de la Ang (1-7) también comprende cualquier péptido que contiene una secuencia al menos el 50% (por ejemplo, al menos el 60%, 70%, 80% el o 90%) idéntica a la secuencia de aminoácidos de la Ang (1-7) de origen natural. El porcentaje de identidad de secuencias de
45 aminoácidos se puede determinar por medio del alineamiento de secuencias de aminoácidos. El alineamiento de secuencias de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras que se encuentran dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando un software de ordenador disponible públicamente tal como el software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo sobre la longitud
50 completa de las secuencias que son comparadas. Preferiblemente, el software WU-BLAST-2 se usa para determinar la identidad de secuencias de aminoácidos (Altschul et al., Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se ajustan a valores por defecto. Los parámetros ajustables se ajustan con los siguientes valores: extensión de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros de puntuación
55 de HSP (S) y S2 de HSP son valores dinámicos y se establecen por el propio programa, dependiendo de la composición de la secuencia particular, sin embargo, los valores mínimos se pueden ajustar y se pueden establecer como se ha indicado anteriormente.

En algunas realizaciones, un equivalente, análogo o derivado funcional de Ang (1-7) es un fragmento de la Ang (1-7)

de origen natural. En algunas realizaciones, un equivalente funcional, análogo o derivado de Ang (1-7) contiene sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos en la Ang (1-7) de origen natural. Los equivalentes funcionales, análogos o derivados de Ang (1-7) se pueden hacer alterando las secuencias de aminoácidos por medio de sustituciones, adiciones y/o eliminaciones. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de la

5 secuencia de la Ang (1-7) de origen natural (SEQ ID NO:1) pueden ser sustituidos por otro aminoácido de polaridad similar, el cual actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. La sustitución para un aminoácido dentro de la secuencia se puede seleccionar de otros miembros de la clase a la cual pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos de carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen leucina, isoleucina, alanina, fenilalanina, valina, prolina, triptófano y

10 metionina. Los aminoácidos polares sin carga incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos de carga negativa (ácidos) incluyen ácido glutámico y ácido aspártico. El aminoácido glicina puede ser incluido en ya sea la familia de aminoácidos no polares o la familia de aminoácidos polares sin carga (neutros). Se entiende generalmente que las sustituciones hechas dentro de una familia de aminoácidos son sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de un inhibidor de péptido se puede modificar o sustituir.

15 Los ejemplos de equivalentes funcionales, análogos y derivados de Ang (1-7) se describen en la sección titulada "Péptidos de angiotensina (1-7) ejemplares" a continuación.

Un péptido de angiotensina (1-7) puede ser de cualquier longitud. En algunas realizaciones, un péptido de

20 angiotensina (1-7) de acuerdo con la presente invención puede contener, por ejemplo, 4-25 aminoácidos (por ejemplo, 4-20, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7 aminoácidos). En algunas realizaciones, el péptido lineal contiene 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos.

En algunas realizaciones, un péptido de angiotensina (1-7) contiene una o más modificaciones para aumentar la

25 resistencia a proteasas, la estabilidad en suero y/o la biodisponibilidad. En algunas realizaciones, las modificaciones adecuadas se seleccionan de pegilación, acetilación, glucosilación, biotinilación, sustitución con D-aminoácido y/o aminoácido no natural y/o ciclación del péptido.

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier

30 compuesto y/o sustancia que pueda incorporarse en una cadena de polipéptidos. En ciertas realizaciones, un aminoácido tiene la estructura general $H_2N-C(H)(R)-COOH$. En ciertas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido de origen natural. En ciertas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido sintético o no natural (por ejemplo, aminoácidos α,α -disustituidos, aminoácidos de N-alquilo); en algunas realizaciones, un aminoácido es un d-

35 aminoácido; en ciertas realizaciones, un aminoácido es un 1-aminoácido. "Aminoácido estándar" se refiere a cualquiera de veinte aminoácidos estándar que se encuentran comúnmente en péptidos de origen natural que incluyen tanto 1- como d-aminoácidos los que se incorporan ambos en péptidos de origen natural. "Aminoácido no estándar" o "aminoácido no convencional" se refieren a cualquier aminoácido, diferente de los aminoácidos estándar, independientemente si se prepara de manera sintética o se obtiene de una fuente natural. Como se usa en el presente documento, "aminoácido sintético o no natural" incluye aminoácidos modificados químicamente,

40 incluyendo, pero sin limitación, sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas) y/o sustituciones. Los aminoácidos, incluyendo aminoácidos carboxi- y/o amino-terminales en péptidos, se pueden modificar por medio de la metilación, amidación, acetilación y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida en circulación del péptido sin afectar de manera adversa su actividad. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales o no naturales incluyen, pero sin limitación, citrulina, ornitina, norleucina, norvalina, 4-(E)-butenil-4(R)-metil-N-

45 metiltreonina (MeBmt), N-metil-leucina (MeLeu), ácido aminoisobutírico, estatina y N-metil-alanina (MeAla). Los aminoácidos pueden participar en un enlace de disulfuro. El término "aminoácido" se usa de manera intercambiable con "residuo de aminoácido" y puede referirse a un aminoácido libre y/o a un residuo de aminoácido de un péptido. Será aparente a partir del contexto en el cual se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o a un residuo de

50 péptido.

En ciertas realizaciones, los péptidos de angiotensina (1-7) contienen uno o más L-aminoácidos, D-aminoácidos y/o aminoácidos no naturales.

Además de péptidos que contienen solo aminoácidos de origen natural, los peptidomiméticos o análogos de

55 péptidos también están incluidos por la presente invención. Los análogos de péptidos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a aquellas del péptido plantilla. Los compuestos no peptídicos se denominan "miméticos peptídicos" o peptidomiméticos (Fauchere et al., Infect. Immun. 54:283-287 (1986); Evans et al., J. Med. Chem. 30:1229-1239 (1987)). Los miméticos peptídicos que están relacionados estructuralmente con los péptidos terapéuticamente útiles y se pueden usar para producir un efecto

terapéutico o profiláctico equivalente o aumentado. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares al polipéptido modelo (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica) tal como los polipéptidos que se unen a receptores de origen natural, pero tienen una o más vinculaciones peptídicas reemplazadas opcionalmente por enlaces tales como $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{CH}_2\text{SO}-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, $-\text{COCH}_2-$ etc., por métodos bien conocidos en la técnica (Spatola, Peptide Backbone Modifications, Vega Data, 1(3):267 (1983); Spatola et al. Life Sci. 38:1243-1249 (1986); Hudson et al. Int. J. Pept. Res. 14:177-185 (1979); y Weinstein. B., 1983, Chemistry and Biochemistry, of Amino Acids, Peptides and Proteins, Weinstein eds, Marcel Dekker, Nueva York,). Dichos miméticos peptídicos pueden tener ventajas significativas sobre los polipéptidos de origen natural que incluyen una producción más económica, una mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (por ejemplo, semivida, absorción, potencia, eficiencia, etc), antigenicidad reducida y otras.

Los péptidos de Ang (1-7) también incluyen otros tipos de derivados de péptidos que contienen porciones químicas adicionales que normalmente no son parte del péptido, con la condición de que el derivado retenga la actividad funcional deseada del péptido. Los ejemplos de estos derivados incluyen (1) derivados de N-acilo del grupo amino terminal o de otro grupo amino libre, en donde el grupo acilo puede ser un grupo alcanilo (por ejemplo, acetilo, hexanoilo, octanoilo), un grupo aroilo (por ejemplo, benzoilo) o un grupo bloqueador tal como F-moc (fluorenilmetil-O-CO-); (2) ésteres del grupo carboxi terminal o de otro grupo carboxi o hidroxilo libre; (3) amida del grupo carboxi terminal o de otro grupo carboxilo libre producido por medio de la reacción con amoniaco o con una amina adecuada; (4) derivados fosforilados; (5) derivados conjugados con un anticuerpo u otro ligando biológico y otros tipos de derivados; y (6) derivados conjugados con una cadena de polietilenglicol (PEG).

Los péptidos de Ang (1-7) se pueden obtener por cualquier método de síntesis de péptidos conocido por los expertos en la técnica, incluyendo técnicas sintéticas (por ejemplo, síntesis de fase sólida exclusiva, síntesis de fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis de solución clásica, ligadura nativa-química) y recombinantes. Por ejemplo, los péptidos o derivados de péptidos se pueden obtener por medio de la síntesis de péptidos de fase sólida, que, en resumen consiste en el acoplamiento del grupo carboxilo del aminoácido C-terminal a una resina (por ejemplo, resina de benzhidrilamina, resina clorometilada, resina de hidroximetilo) y la adición sucesivamente de aminoácidos protegidos N-alfa. Los grupos protectores pueden ser cualquiera de estos grupos conocidos en la técnica. Antes de que cada nuevo aminoácido se añada a la cadena creciente, el grupo protector del aminoácido previo añadido a la cadena se elimina. Esta síntesis de fase sólida se ha descrito, por ejemplo, por Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1964); Vale et al., Science 213:1394-1397 (1981), en las Patentes de Estados Unidos Números 4.305.872 y 4.316. 891, Bodonsky et al. Chem. Ind. (London), 38:1597 (1966); y Pietta y Marshall, Chem. Comm. 650 (1970) por medio de técnicas revisadas en Lubell et al. "Peptides" Science of Synthesis 21.11, Chemistry of Amides. Thieme, Stuttgart, 713-809 (2005). El acoplamiento de aminoácidos a resinas apropiadas también se conoce bien en la técnica y se ha descrito en la Patente de Estados Unidos Número 4.244.946. (Revisado en Houver-Weyl, Methods of Organic Chemistry. Vol E22a. Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Murray Goodman, Editor-in-Chief, Thieme. Stuttgart. Nueva York 2002).

A menos que se definan de otra manera, los términos y nomenclatura científicos y tecnológicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que aquel entendido comúnmente por un experto a la cual pertenece esta invención. Generalmente, los procedimientos de cultivos de células, infección, métodos de biología molecular y similares son métodos comunes que se usan en la técnica. Dichas técnicas estándar se pueden encontrar en manuales de referencia tal como, por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001; y Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 2001.

Durante cualquier proceso de la preparación de un péptido de Ang (1-7), puede ser deseable proteger los grupos reactivos sensibles en cualquiera de las moléculas en cuestión. Esto se puede lograr por medio de grupos protectores convencionales tales como los descritos en Protective Groups In Organic Synthesis by T.W. Greene & P.G.M. Wuts, 1991, John Wiley and Sons, Nueva York; y Peptides: chemistry and Biology de Sewald y Jakubke, 2002, Wiley-VCH, Weinheim pág.142. Por ejemplo, los grupos protectores de alfa-amino incluyen grupos protectores de tipo acilo (por ejemplo, trifluoroacetilo, formilo, acetilo), grupos protectores de uretano alifático (por ejemplo, t-butiloxicarbonilo (BOC), ciclohexiloxicarbonilo), grupos protectores de tipo uretano aromático (por ejemplo, fluorenil-9-metoxi-carbonilo (Fmoc), benciloxicarbonilo (Cbz), derivados de Cbz) y grupos protectores de tipo alquilo (por ejemplo, trifenilmetilo, bencilo). Los grupos protectores de cadenas laterales de aminoácidos incluyen bencilo (para Thr y Ser), Cbz (Tyr, Thr, Ser, Arg, Lys), metiletilo, ciclohexilo (Asp, His), Boc (Arg, His, Cys), etc. Los grupos protectores se pueden retirar en una etapa posterior conveniente utilizando métodos conocidos en la técnica.

Además, los péptidos de Ang (1-7) se pueden sintetizar de acuerdo con el protocolo de FMOC en una fase orgánica con grupos protectores. De manera deseable, los péptidos se purifican con un rendimiento del 70% con la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna de cromatografía C18 y se eluyen con un gradiente de acetonitrilo del 10-60%. El peso molecular de un péptido se puede verificar por medio de espectrometría de masas (revisado en Fields, G.B. "Solid-Phase Peptide Synthesis" Methods in Enzymology. Vol. 289, Academic Press, 1997).

Como alternativa, los péptidos de Ang (1-7) se pueden preparar en sistemas recombinantes utilizando, por ejemplo, secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Se entiende que un polipéptido puede contener más de una de las modificaciones descritas anteriormente dentro del mismo polipéptido.

10

Mientras que los péptidos pueden ser eficaces en la obtención de una actividad biológica *in vitro*, su eficacia *in vivo* podría reducirse por la presencia de proteasas. Las proteasas del suero tienen requerimientos específicos de sustratos. El sustrato debe tener tanto L-aminoácidos como enlaces peptídicos para la escisión. Adicionalmente, las exopeptidasas, que representan el componente más prominente de la actividad de proteasa en el suero, actúan usualmente sobre el primer enlace peptídico del péptido y requieren un extremo N libre (Powell et al., Pharm. Res. 10:1268-1273 (1993)). En vista de esto, frecuentemente es ventajoso usar versiones modificadas de péptidos. Los péptidos modificados retienen las características estructurales de los péptidos de L-aminoácidos originales que confieren la actividad biológica deseada de la Ang (1-7) pero ventajosamente no son susceptibles fácilmente a la escisión por proteasas y/o exopeptidasas.

20

La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Por lo tanto, un derivado de péptido o peptidomimético de la presente invención puede ser un péptido todo L, todo D o D, L mezclado, en un orden ya sea directo o inverso. La presencia de un D-aminoácido N-terminal o C-terminal aumenta la estabilidad *in vivo* de un péptido puesto que las peptidasas no pueden usar un D-aminoácido como un sustrato (Powell et al., Pharm. Res. 10:1268-1273 (1993)). Los péptidos D inversos son péptidos que contienen D-aminoácidos, dispuestos en una secuencia inversa en relación con un péptido que contiene L-aminoácidos. Por lo tanto, el residuo C-terminal de un péptido de L-aminoácido se vuelve N-terminal para el péptido de D-aminoácido, etc. Los D-péptidos inversos retienen la misma conformación secundaria y, por lo tanto, una actividad similar, como los péptidos de L-aminoácidos, pero son más resistentes a la degradación enzimática *in vitro* e *in vivo*, y por lo tanto, pueden tener una mayor eficacia terapéutica que el péptido original (Brady y Dodson, Nature 368:692-693 (1994); Jameson et al., Nature 368:744-746 (1994)). De forma similar, un péptido L inverso se puede generar utilizando métodos estándar donde el extremo C-terminal del péptido precursor toma el lugar del extremo N-terminal del péptido L inverso. Se contempla que los péptidos L inversos de péptidos de L-aminoácidos que no tienen una estructura secundaria significativa (por ejemplo, péptidos cortos) retienen la misma separación y conformación de las cadenas laterales del péptido de L-aminoácido y, por lo tanto, tienen frecuentemente la actividad similar al péptido de L-aminoácido original. Además, un péptido inverso puede contener una combinación de L- y D-aminoácidos. La separación entre aminoácidos y la conformación de las cadenas laterales se puede retener dando como resultado una actividad similar al péptido de L-aminoácido original.

30

Otro enfoque eficaz para conferir resistencia a peptidasas que actúan sobre los residuos N-terminales o C-terminales de un péptido es añadir grupos químicos en los extremos del péptido, de tal manera que el péptido modificado no sea más un sustrato para la peptidasa. Tal modificación química de ese tipo es la glucosilación de los péptidos en cualquiera de o ambos extremos. Se ha mostrado que ciertas modificaciones químicas, en particular la glucosilación N-terminal, aumentan la estabilidad de péptidos en el suero humano (Powell et al., Pharm. Res. 10:1268-1273 (1993)). Otras modificaciones químicas las cuales mejoran la estabilidad en el suero incluyen, pero sin limitación, la adición de un grupo alquilo N-terminal, que consiste en un grupo alquilo inferior de uno a veinte átomos de carbono, tal como un grupo acetilo y/o la adición de un grupo amida C-terminal o amida sustituida. En particular, la presente invención incluye péptidos modificados que consisten de péptidos que llevan un grupo acetilo N-terminal y/o un grupo amida C-terminal.

45

La sustitución de aminoácidos que no son de origen natural por aminoácidos naturales en una subsecuencia de los péptidos también puede conferir resistencia a la proteólisis. Tal sustitución puede conferir, por ejemplo, resistencia a la proteólisis por exopeptidasas que actúan sobre el extremo N-terminal sin afectar a la actividad biológica. Los ejemplos de aminoácidos que no son de origen natural incluyen aminoácidos α,α -disustituidos, aminoácidos de N-alquilo, aminoácidos de C- α -metilo, β -aminoácidos y aminoácidos de β -metilo. Los análogos de aminoácidos que son útiles en la presente invención pueden incluir, pero sin limitación, β -alanina, norvalina, norleucina, ácido 4-aminobutírico, oritina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, ciclohexilalanina, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, fenilglicina, o-fosfoserina, N-acetil-serina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina y

55

otros aminoácidos no convencionales. Adicionalmente, la síntesis de péptidos con aminoácidos que no son de origen natural es una rutina en la técnica.

Además, se pueden generar péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica por métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387-418 (1992)). Por ejemplo, los péptidos restringidos se pueden generar añadiendo residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro y, así, dando como resultado un péptido cíclico. Los péptidos cíclicos se pueden construir para que no tengan N-terminales o C-terminales libres. Por consiguiente, no son susceptibles a la proteólisis por exopeptidasas, aunque pueden ser susceptibles a endopeptidasas, las cuales no se escinden en los extremos peptídicos. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos con D-aminoácidos N-terminales o C-terminales y de los péptidos cíclicos son sustancialmente idénticas a las secuencias de los péptidos a las cuales corresponden, excepto por la presencia de un residuo de D-aminoácido N-terminal o C-terminal, o su estructura circular, respectivamente.

15 **Péptidos cíclicos**

En algunas realizaciones, un equivalente funcional, análogo o derivado de la Ang (1-7) de origen natural es un péptido cíclico. Como se usa en el presente documento, un péptido cíclico tiene un enlace covalente intramolecular entre dos residuos no adyacentes. El enlace intramolecular puede ser un enlace esqueleto a esqueleto, de cadena lateral a esqueleto o de cadena lateral a cadena lateral (es decir, grupos funcionales terminales de un péptido lineal y/o grupos funcionales de cadena lateral de un residuo terminal o interior se pueden unir para lograr la ciclación). Los enlaces intramoleculares típicos incluyen enlaces de disulfuro, amida y tioéter. En la técnica se conoce bien una variedad de medios para ciclar polipéptidos, ya que son muchas otras modificaciones que se pueden hacer a estos péptidos. Para un análisis general, véanse las Patentes de publicación internacional N.º WO 01/53331 y WO 98/02452, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. Estos enlaces cíclicos y otras modificaciones también se pueden aplicar a los péptidos cíclicos y compuestos derivados de esta invención.

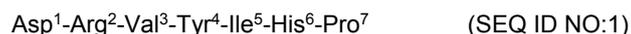
Los péptidos cíclicos como se describen en el presente documento pueden comprender residuos de L-aminoácidos, D-aminoácidos o cualquier combinación de los mismos. Los aminoácidos pueden ser de fuentes naturales o no naturales, con la condición de que al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxilo estén presentes en la molécula; los α - y β -aminoácidos se prefieren generalmente. Los péptidos cíclicos también pueden contener uno o más aminoácidos raros (tales como 4-hidroxiprolina o hidroxilisina), ácidos orgánicos o amidas y/o derivados de aminoácidos comunes, tales como aminoácidos que tienen el carboxilato C-terminal esterificado (por ejemplo, bencilo, éster metílico o etílico) o amidado y/o que tienen modificaciones del grupo amino N-terminal (por ejemplo, acetilación o alcóxycarbonilación), con o sin cualquiera de una amplia diversidad de modificaciones y/o sustituciones de la cadena lateral (por ejemplo, metilación, bencilación, t-butilación, tosilación, alcóxycarbonilación, y similares). Los derivados adecuados incluyen aminoácidos que tienen un grupo N-acetilo (de manera que el grupo amino que representa el extremo N del péptido lineal antes de la ciclación está acetilado) y/o un grupo amida C-terminal (es decir, el extremo carboxi del péptido lineal antes de la ciclación está amidado). Los residuos que no son aminoácidos comunes que pueden estar presentes con un péptido cíclico incluyen, pero si limitación, penicilamina, β,β -tetrametileno cisteína, β,β -pentametileno cisteína, ácido β -mercaptopropiónico, ácido β,β -pentametileno- β -mercaptopropiónico, 2-mercaptobenceno, 2-mercaptoanilina, 2-mercaptoprolina, ornitina, ácido diaminobutírico, ácido α -aminoadípico, ácido m-aminometilbenzoico y ácido α,β -diaminopropiónico.

Después de la síntesis de un péptido lineal, con o sin N-acetilación y/o C-amidación, la ciclación se puede lograr por medio de cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas en la técnica. Dentro de una realización, se puede generar un enlace entre cadenas laterales de aminoácidos reactivos. Por ejemplo, un puente de disulfuro se puede formar a partir de un péptido lineal que comprende dos residuos que contienen tiol por medio de la oxidación del péptido utilizando cualquiera de una diversidad de métodos. Dentro de este método, la oxidación con aire de tioles puede generar uniones de disulfuro durante un periodo de varios días utilizando medios acuosos ya sea básicos o neutros. El péptido se usa en una dilución alta para minimizar la agregación y reacciones secundarias intermoleculares. Como alternativa, los agentes oxidantes fuertes tales como I_2 y $K_3Fe(CN)_6$ se pueden usar para formar enlaces de disulfuro. Los expertos en la técnica reconocerán que se debe tener cuidado para no oxidar las cadenas laterales sensibles de Met, Tyr, Trp o His. Dentro de realizaciones adicionales, la ciclación se puede lograr por medio de la formación de enlaces de amida. Por ejemplo, un enlace de péptido se puede formar entre grupos funcionales terminales (es decir, los extremos amino y carboxi de un péptido lineal antes de la ciclación). Dentro de esta realización, el péptido lineal comprende un D-aminoácido. Como alternativa, la ciclación se puede realizar al unir un extremo y una cadena lateral de residuo o utilizando dos cadenas laterales, con o sin un grupo acetilo N-terminal y/o una amida C-terminal. Los residuos capaces de formar un enlace de lactama incluyen lisina, ornitina

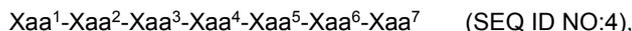
(Orn), ácido α -aminoadípico, ácido m-aminometilbenzoico, ácido α,β -diaminopropiónico, glutamato o aspartato. Los métodos para formar enlaces de amida se conocen bien generalmente en la técnica. Dentro de este método, la formación de lactama mediada por carbodiimida se puede realizar por medio de la reacción del ácido carboxílico con DCC, DIC, EDAC o DCCI, dando como resultado la formación de una O-acilurea que se puede hacer reaccionar inmediatamente con el grupo amino libre para completar la ciclación. Como alternativa, la ciclación se puede realizar usando el método de azida, en el cual un producto intermedio de azida reactivo se genera a partir de un éster alquílico a través de una hidrazida. Como alternativa, la ciclación se puede realizar utilizando ésteres activados. La presencia de sustituyentes aceptores de electrones en el alcóxicarbono de ésteres incrementa su susceptibilidad a la aminólisis. La alta reactividad de ésteres de p-nitrofenol, compuestos de N-hidroxi y fenoles polihalogenados ha hecho que estos "ésteres activos" sean útiles en la síntesis de enlaces de amida. Dentro de una realización adicional, un enlace de tioéter se puede formar entre la cadena lateral de un residuo que contiene tiol y un α -aminoácido derivatizado apropiadamente. A modo de ejemplo, una cadena lateral de lisina se puede acoplar al ácido bromoacético a través del método de acoplamiento de carbodiimida (DCC, EDAC) y luego se puede hacer reaccionar con la cadena lateral de cualquiera de los residuos que contienen tiol mencionados anteriormente para formar una unión de tioéter. Con el propósito de formar ditioéteres, cualquier par de cadenas laterales que contienen tiol se puede hacer reaccionar con dibromoetano y diisopropilamina en DMF.

Péptidos de angiotensina (1-7) ejemplares

20 En ciertos aspectos, la invención proporciona péptidos de angiotensina (1-7) lineales. Como se planteó anteriormente, la estructura de Ang (1-7) de origen natural es de la siguiente manera:



25 Los péptidos y análogos de péptidos de la invención pueden representarse generalmente por la siguiente secuencia:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

30

Xaa¹ es cualquier aminoácido o un ácido dicarboxílico. En ciertas realizaciones, Xaa¹ es Asp, Glu, Asn, Acpc (ácido 1-aminociclopentano-carboxílico), Ala, Me₂Gly (N,N-dimetilglicina), Pro, Bet (betaína, hidróxido de 1-carboxi-N,N,N-trimetilmetanamonio), Glu, Gly, Asp, Sar (sarcosina) o Suc (ácido succínico). En ciertas realizaciones de ese tipo, Xaa¹ es un aminoácido de carga negativa, tal como Asp o Glu, típicamente Asp.

35

Xaa² es Arg, Lys, Ala, Cit (citrulina), Orn (ornitina), Ser acetilado, Sar, D-Arg y D-Lys. En ciertas realizaciones, Xaa² es un aminoácido cargado positivamente, tal como Arg o Lys, típicamente Arg.

Xaa³ es Val, Ala, Leu, Nle (norleucina), Ile, Gly, Lys, Pro, HidroxiPro (hidroxipropila), Aib (ácido 2-aminoisobutírico), Acpc o Tyr. En ciertas realizaciones, Xaa³ es un aminoácido alifático, tal como Val, Leu, Ile o Nle, típicamente Val o Nle.

40

Xaa⁴ es Tyr, Tyr(PO₃), Thr, Ser, homoSer (homoserina), azaTyr (aza- α ¹-homo-L-tirosina) o Ala. En ciertas realizaciones, Xaa⁴ es un aminoácido hidroxilo-sustituido tal como Tyr, Ser o Thr, típicamente Tyr.

45

Xaa⁵ es Ile, Ala, Leu, norLeu, Val o Gly. En ciertas realizaciones, Xaa⁵ es un aminoácido alifático, tal como Val, Leu, Ile o Nle, típicamente Ile.

Xaa⁶ es His, Arg o 6-NH₂-Phe (6-aminofenilalanina). En ciertas realizaciones, Xaa⁶ es un aminoácido completa o parcialmente cargado positivamente tal como Arg o His.

50

Xaa⁷ es Cys, Pro o Ala.

En ciertas realizaciones, uno o más de Xaa¹-Xaa⁷ es idéntico al aminoácido correspondiente en Ang-(1-7) de origen natural. En ciertas realizaciones de este tipo, todos menos uno o dos de Xaa¹-Xaa⁷ son idénticos al aminoácido correspondiente en Ang-(1-7) de origen natural. En otras realizaciones, cada uno de Xaa¹-Xaa⁶ son idénticos al aminoácido correspondiente en la Ang-(1-7) de origen natural.

55

En ciertas realizaciones, Xaa³ es Nle. Cuando Xaa³ es Nle, uno o más de Xaa¹-Xaa² y Xaa⁴⁻⁷ son opcionalmente

idénticos al aminoácido correspondiente en Ang-(1-7) de origen natural. En ciertas realizaciones de este tipo, todos menos uno o dos de Xaa¹-Xaa² y Xaa⁴⁻⁷ son idénticos al aminoácido correspondiente en Ang-(1-7) de origen natural. En otras realizaciones, cada uno de Xaa¹-Xaa² y Xaa⁴⁻⁷ son idénticos al aminoácido correspondiente en la Ang-(1-7) de origen natural, dando como resultado la secuencia de aminoácidos: Asp¹-Arg²-Nle³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ (SEQ ID NO:5).

En ciertas realizaciones, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-Val³-Ser⁴-Ile⁵-His⁶-Cys⁷ (SEQ ID NO:6) o Asp¹-Arg²-Val³-ser⁴-Ile⁵-His⁶-Cys⁷ (SEQ ID NO:2).

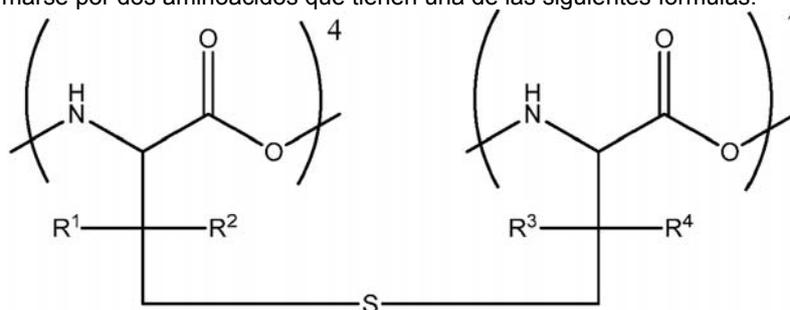
10 En algunas realizaciones, un péptido lineal de angiotensina (1-7) como se describe en el presente documento es un péptido que tiene una secuencia de Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹ (SEQ ID NO: 22), que es idéntica a la secuencia de Ang(1-9). En algunas realizaciones, un péptido de angiotensina (1-7) es un derivado de Ang (1-9). Por ejemplo, los péptidos de Ang (1-9), incluyendo derivados de Ang(1-9), véase la Publicación de Patente de Estados Unidos 2012/0172301, cuya descripción se incorpora por la presente por referencia.

15 En algunas realizaciones, un péptido lineal de angiotensina (1-7) es un péptido con una secuencia de aminoácidos de Ala¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ (SEQ ID NO: 23). Las secuencias adicionales derivadas de la SEQ ID NO: 23 pueden encontrarse en la Solicitud de Patente Europea 2.264.048, cuya descripción se incorpora por la presente por referencia.

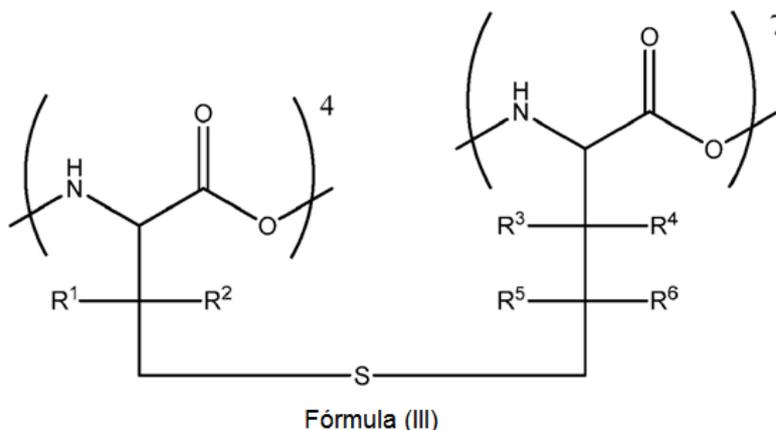
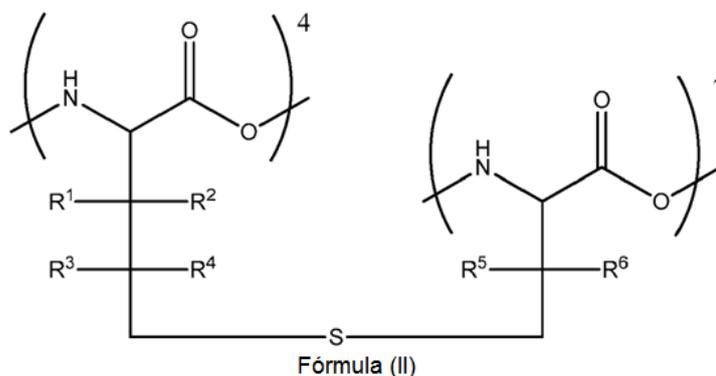
20 **Péptidos cíclicos de angiotensina (1-7) ejemplares**

En ciertos aspectos, la invención proporciona un análogo de péptido de angiotensina (1-7) (Ang (1-7)) cíclico que comprende una unión, tal como entre las cadenas laterales de aminoácidos que corresponden a las posiciones Tyr⁴ y Pro⁷ en Ang. Estos análogos peptídicos comprenden típicamente 7 residuos de aminoácidos, pero también pueden incluir una secuencia escindible. Como se analiza con mayor detalle a continuación, la invención incluye fragmentos y análogos donde uno o más aminoácidos son sustituidos por otro aminoácido (incluyendo los fragmentos). Un ejemplo de tal análogo es Asp¹-Arg²-Val³-Ser⁴-Ile⁵-His⁶-Cys⁷ (SEQ ID NO: 6), en el que se forma una unión entre Ser⁴ y Cys⁷.

30 Aunque la siguiente sección describe aspectos de la descripción en términos de un enlace de tioéter que une residuos en las posiciones 4 y 7, se debe entender que otras uniones (como se ha descrito anteriormente) podrían reemplazar el puente tioéter y que otros residuos podrían ciclarse. Un puente tioéter también se denomina como un puente monosulfuro o, en el caso de Ala-S-Ala, como un puente de lantionina. Los péptidos que contienen puentes de tioéter pueden formarse por dos aminoácidos que tienen una de las siguientes fórmulas:



Fórmula (I)



- 5 En estas fórmulas, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son independientemente -H, un alquilo (por ejemplo, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₄) o un grupo aralquilo, donde los grupos alquilo y aralquilo están sustituidos opcionalmente con uno o más halógenos, grupos -OH o -NRR' (donde R y R' son independientemente -H o alquilo C₁-C₄). En ciertas realizaciones, R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente -H o -CH₃, tales donde todos son -H.
- 10 En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un análogo o derivado de Ang que comprende un puente de tioéter de acuerdo con la fórmula (I). Típicamente, R¹, R², R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -H y -CH₃. Los péptidos que comprenden un puente tioéter de acuerdo con la fórmula (I) pueden producirse, por ejemplo, por enzimas lantibióticas o por medio de la extrusión en azufre de un disulfuro. En un ejemplo, el disulfuro del cual se extruye el azufre puede formarse por D-cisteína en la posición 4 y L-cisteína en la posición 7 o por D-cisteína en la posición 4 y L-penicilamina en la posición 7 (véase, por ejemplo, Galande, Trent y Spatola (2003) Biopolymers 71, 534-551).
- 15 En otras realizaciones, la unión de los dos aminoácidos pueden ser los puentes representados en la Fórmula (II) o la Fórmula (III). Los péptidos que comprenden un puente tioéter de acuerdo con la Fórmula (II) se pueden hacer, por ejemplo, por medio de la extrusión de azufre de un disulfuro formado por D-homocisteína en la posición 4 y L-cisteína en la posición 7. De forma similar, los péptidos que comprenden un puente tioéter como en la Fórmula (III) se pueden hacer, por ejemplo, por medio de la extrusión en azufre de un disulfuro formado por D-cisteína en la posición 4 y L-homocisteína en la posición 7.
- 20 Como ha analizado anteriormente, los análogos y derivados de Ang de la descripción varían en su longitud y la composición de aminoácidos. Los análogos y derivados de Ang de la invención tienen preferiblemente una actividad biológica o son una molécula precursora inactiva que puede ser activada proteolíticamente (tal como la angiotensina (I), con 10 aminoácidos, se convierte en fragmentos activos por medio de la escisión de 2 aminoácidos). El tamaño de un análogo o derivado de Ang puede variar pero está típicamente entre aproximadamente 5 y 10 aminoácidos,
- 25 siempre y cuando esté incluido el segmento pentamérico "central" que comprende la estructura 3-7 Nle-anillo de

tioéter. La secuencia de aminoácidos de un análogo o derivado de la descripción puede variar, típicamente con la condición de que sea biológicamente activa o pueda activarse proteolíticamente. La actividad biológica de un análogo o derivado se puede determinar utilizando métodos conocidos en la técnica, que incluyen estudios de unión de radioligandos, ensayos de activación de células *in vitro* y experimentos *in vivo*. Véase, por ejemplo, Godeny y Sayeski, (2006) Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 291:C1297-1307; Sarr et al., Cardiovasc. Res. (2006) 71:794-802; y Koziazar et al., (1933) Gen. Pharmacol. 24:705- 713.

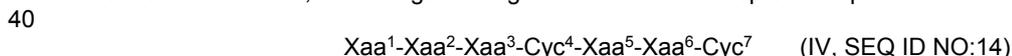
Los análogos y derivados de Ang donde solo la longitud del péptido se varía incluyen los siguientes:

- 10 Un análogo 4,7-ciclado designado [Cyc⁴⁻⁷]Ang-(1-7), que se deriva de Ang-(1-7) natural (Asp¹-Arg²-Val³-Cyc⁴-Ile⁵-His⁶-Cyc⁷, SEQ ID NO:7).
 un análogo 4,7-ciclado designado [Nle³, Cyc⁴⁻⁷]Ang-(1-10), que se deriva de Angiotensina I natural (Ang-(1-10)) (Asp¹-Arg²-Nle³-Cyc⁴-Ile⁵-His⁶-Cyc⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰, SEQ ID NO:8);
 un análogo 4,7-ciclado designado [Nle³, Cyc⁴⁻⁷]Ang-(1-8), que se deriva de Angiotensina II natural (Ang-(1-8)) (Asp¹-Arg²-Nle³-Cyc⁴-Ile⁵-His⁶-Cyc⁷-Phe⁸, SEQ ID NO:9);
 15 un análogo 4,7-ciclado designado [Nle³, Cyc⁴⁻⁷]Ang-(2-8), que se deriva de Angiotensina III natural (Ang-(2-8)) (Arg²-Nle³-Cyc⁴-Ile⁵-His⁶-Cyc⁷-Phe⁸, SEQ ID NO:10);
 un análogo 4,7-ciclado designado [Nle³, Cyc⁴⁻⁷]Ang-(3-8), que se deriva de Angiotensina IV natural (Ang-(3-8)) (Nle³-Cyc⁴-Ile⁵-His⁶-Cyc⁷-Phe⁸, SEQ ID NO:11);
 20 un análogo 4,7-ciclado designado [Nle³, Cyc⁴⁻⁷]Ang-(1-7) derivado de Ang-(1-7) natural (Asp¹-Arg²-Nle³-Cyc⁴-Ile⁵-His⁶-Cyc⁷, SEQ ID NO:12); y
 un análogo 4,7-ciclado designado [Nle³, Cyc⁴⁻⁷]Ang-(1-9) derivado de Ang-(1-9) natural (Asp¹-Arg²-Nle³-Cyc⁴-Ile⁵-His⁶-Cyc⁷-Phe⁸-His⁹, SEQ ID NO:13).

25 Estos análogos pueden tener uno de los puentes tioéter mostrados en las Fórmulas (I)-(III) como el resto Cyc⁴⁻⁷, por ejemplo, donde Cyc⁴ y Cyc⁷ se representan por la Fórmula (I), tal como donde R¹-R⁴ son cada uno -H o -CH₃, típicamente -H.

En comparación con la secuencia de aminoácidos del péptido de angiotensina natural, los aminoácidos en las posiciones 4 y 7 del análogo Cyc⁴⁻⁷ se modifican para permitir la introducción de las estructuras de anillos de tioéter mostradas anteriormente. Además de la longitud de los análogos de Ang, los aminoácidos en las posiciones diferentes de 3, 4 y 7 pueden ser las mismas o diferentes del péptido de origen natural, típicamente con la condición de que el análogo retenga una función biológica. Por análogos de precursores inactivos, como [Cyc⁴⁻⁷]Ang-(1-10), la función biológica se refiere a una o ambas de la susceptibilidad de un análogo a enzimas convertidoras de la angiotensina que pueden escindirlos en un fragmento biológicamente activo (por ejemplo, Ang (1-8) o Ang (1-7)) o la actividad biológica del propio fragmento. En ciertas realizaciones, un análogo o derivado de Ang de la invención no tiene una función intrínseca sino que inhibe los efectos de uno o más compuestos de angiotensina de origen natural.

En ciertas realizaciones, un análogo de Ang de la invención se representa por la Fórmula (IV):



Xaa¹ es cualquier aminoácido, pero típicamente un aminoácido cargado negativamente tal como Glu o Asp, más típicamente Asp.

45 Xaa² es un aminoácido cargado positivamente, tal como Arg o Lys, típicamente Arg.

Xaa³ es un aminoácido alifático, tal como Leu, Ile o Val, típicamente Val.

50 Cyc⁴ forma un puente tioéter junto con Cyc⁷. Cyc⁴ puede ser un D-estereoisómero y/o un L-estereoisómero, típicamente un D-estereoisómero. Los ejemplos de Cyc⁴ (tomados con Cyc⁷) se muestran en las Fórmulas (I), (II) e (III). Típicamente, los grupos R en las Fórmulas (I), (II) y (III) son -H o -CH₃, especialmente -H.

Xaa⁵ es un aminoácido alifático, tal como Leu, Ile o Val, típicamente Ile.

55 Xaa⁶ es His.

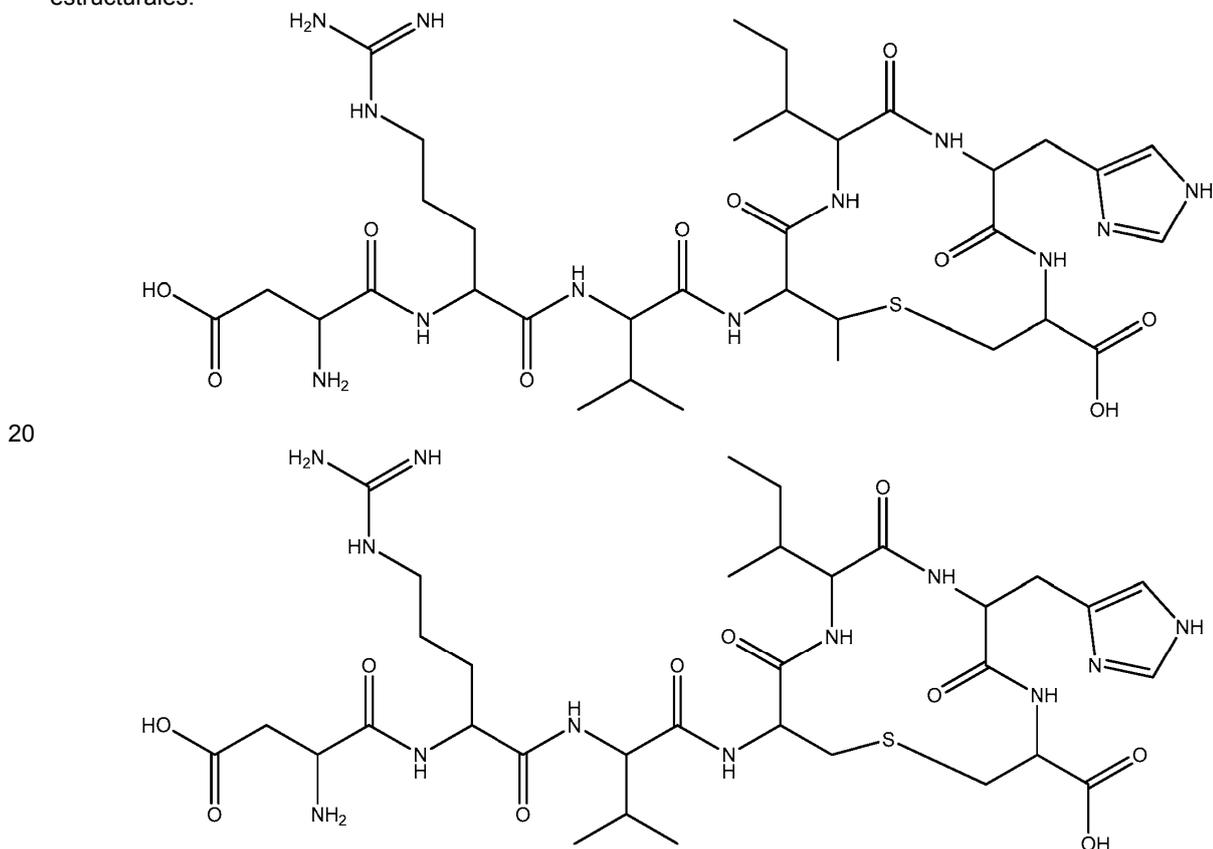
Cyc⁷ forma un puente tioéter junto con Cyc⁴, tal como en la Fórmula (I), (II) o (III). Cyc⁷ puede ser un D-estereoisómero y/o un L-estereoisómero, típicamente un L-estereoisómero. Los ejemplos de Cyc⁷ (tomados con

Cyc⁴) se muestran en las Fórmulas (I), (II), (III) y (IV). Típicamente, los grupos R en las Fórmulas (I), (II), (III) y (IV) son -H o -CH₃, especialmente -H.

En ciertas realizaciones, uno o más de Xaa¹-Xaa⁶ (a excepción de Cyc⁴ y Cyc⁷) son idénticos al aminoácido 5 correspondiente en Ang-(1-7) de origen natural. En ciertas realizaciones de este tipo, todos menos uno o dos de Xaa¹-Xaa⁶ son idénticos al aminoácido correspondiente en Ang-(1-7) de origen natural. En otras realizaciones, cada uno de Xaa¹-Xaa⁶ son idénticos al aminoácido correspondiente en la Ang-(1-7) de origen natural.

En ciertas realizaciones, Cyc⁴ y Cyc⁷ se seleccionan independientemente de Abu (ácido 2-aminobutírico) y Ala 10 (alanina), donde Ala está presente en al menos una posición. Por lo tanto, los análogos cíclicos pueden tener una unión tioéter formada por -Ala⁴-S-Ala⁷- (Fórmula (I), donde R¹-R⁴ son cada uno -H); -Ala⁴-S-Abu⁷- (Fórmula (I): R¹-R³ son -H y R⁴ es -CH₃) o -Abu⁴-S-Ala⁷- (Fórmula (I): R¹, R³ y R⁴ son -H y R² es -CH₃). Los ejemplos específicos de análogos cíclicos comprenden una unión -Abu⁴-S-Ala⁷- o -Ala⁴-S-Ala⁷-.

15 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un análogo Ang-(1-7) con un puente tioéter entre la posición 4 y la posición 7 que tiene la secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-Val³-Abu⁴-Ile⁵-His⁶-Ala⁷ (SEQ ID NO:15) o la secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-Val³-Ala⁴-Ile⁵-His⁶-Ala⁷ (SEQ ID NO:16), que se representan por los siguientes diagramas estructurales:



En ciertas realizaciones, un análogo o derivado de Ang de la invención se representa por la Fórmula (V):

25 Xaa¹-Xaa²-Nle³-Cyc⁴-Xaa⁵-Xaa⁶-Cyc⁷-Xaa⁸-Xaa⁹-Xaa (V, SEQ ID NO:17)

Como se ha analizado anteriormente, uno o más de Xaa¹, Xaa², Xaa⁸, Xaa⁹ y Xaa¹⁰ están ausentes en ciertas realizaciones. Por ejemplo, (1) Xaa¹⁰ está ausente, (2) Xaa⁹ y Xaa¹⁰ están ausentes, (3) Xaa⁸, Xaa⁹ y Xaa¹⁰ están ausentes, (4) Xaa¹ está ausente, (5) Xaa¹ y Xaa¹⁰ están ausentes, (6) Xaa¹, Xaa⁹ y Xaa¹⁰ están ausentes, (7) Xaa¹, 30 Xaa⁸, Xaa⁹ y Xaa¹⁰ están ausentes, (8) Xaa¹ y Xaa² están ausentes, (9) Xaa¹, Xaa² y Xaa¹⁰ están ausentes, (10) Xaa¹, Xaa², Xaa⁹ y Xaa¹⁰ están ausentes, o (11) Xaa¹, Xaa², Xaa⁸, Xaa⁹ y Xaa¹⁰ están ausentes. Para cada una de

estas realizaciones, los aminoácidos restantes tienen los valores descritos a continuación.

Xaa¹, cuando está presente, es cualquier aminoácido, pero típicamente un aminoácido cargado negativamente, tal como Glu o Asp, más típicamente Asp.

5

Xaa², cuando está presente, es un aminoácido cargado positivamente, tal como Arg o Lys, típicamente Arg.

Nle³ es norleucina.

10 Cyc⁴ forma un puente tioéter junto con Cyc⁷. Cyc⁴ puede ser un D-estereoisómero y/o un L-estereoisómero, típicamente un D-estereoisómero. Los ejemplos de Cyc⁴ (tomados con Cyc⁷) se muestran en las Fórmulas (I), (II) e (III). Típicamente, los grupos R en las Fórmulas (I), (II) y (III) son -H o -CH₃, especialmente -H.

Xaa⁵ es un aminoácido alifático, tal como Leu, Nle, Ile o Val, típicamente Ile.

15

Xaa⁶ es His.

Cyc⁷ forma un puente tioéter junto con Cyc⁴, tal como en la Fórmula (I), (II) o (III). Cyc⁷ puede ser un D-estereoisómero y/o un L-estereoisómero, típicamente un L-estereoisómero. Los ejemplos de Cyc⁷ (tomados con Cyc⁴) se muestran en las Fórmulas (I), (II) e (III). Típicamente, los grupos R en las Fórmulas (I), (II) y (III) son -H o -CH₃, especialmente -H.

20

Xaa⁸, cuando está presente, es un aminoácido distinto de Pro, típicamente Phe o Ile. En ciertas realizaciones, Ile da como resultado un inhibidor de Ang(1-8). En ciertas realizaciones, Phe mantiene la actividad biológica de Ang(1-8) o Ang(1-10).

25

Xaa⁹, cuando está presente, es His.

Xaa¹⁰, cuando está presente, es un residuo alifático, por ejemplo, Ile, Val o Leu, típicamente Leu.

30

En ciertas realizaciones, uno o más de Xaa¹-Xaa¹⁰ (a excepción de Nle³, Cyc⁴ y Cyc⁷) son idénticos al aminoácido correspondiente en Ang de origen natural (incluyendo Ang-(1-7), Ang(1-8), Ang(1-9), Ang(1-10), Ang(2-7), Ang(2-8), Ang(2-9), Ang(2-10), Ang(3-8), Ang(3-9) y Ang(3-10)). En ciertas realizaciones de este tipo, todos menos uno o dos de Xaa¹-Xaa¹⁰ (para los presentes) son idénticos al aminoácido correspondiente en Ang de origen natural. En otras realizaciones, cada uno de Xaa¹-Xaa¹⁰ (para los presentes) son idénticos al aminoácido correspondiente en Ang de origen natural.

35

En ciertas realizaciones, Cyc⁴ y Cyc⁷ se seleccionan independientemente de Abu (ácido 2-aminobutírico) y Ala (alanina), donde Ala está presente en al menos una posición. Por lo tanto, se incluyen análogos cíclicos que comprenden una unión tioéter formada por -Ala⁴-S-Ala⁷- (Fórmula (I), donde R¹-R⁴ son cada uno -H); -Ala⁴-S-Abu⁷- (Fórmula (I): R¹-R³ son -H y R⁴ es -CH₃) o -Abu⁴-S-Ala⁷- (Fórmula (I): R¹, R³ y R⁴ son -H y R² es -CH₃). Los análogos cíclicos específicos comprenden una unión -Abu⁴-S-Ala⁷- o -Ala⁴-S-Ala⁷-.

40

En particular, la descripción proporciona un análogo o derivado de Ang-(1-7) con un puente de tioéter entre la posición 4 y la posición 7 que tiene la secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-Nle³-Abu⁴-Ile⁵-His⁶-Ala⁷ (SEQ ID NO:18) o la secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-Nle³-Ala⁴-Ile⁵-His⁶-Ala⁷ (SEQ ID NO:19).

45

En otro aspecto, la descripción proporciona un análogo o derivado con un puente tioéter entre la posición 4 y la posición 7 que tiene una actividad antagonista, en particular un análogo o derivado de Ang(1-8) que tiene la secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-Nle³-Abu⁴-Ile⁵-His⁶-Ala⁷-Ile⁸ (SEQ ID NO:20), o la secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-Nle³-Ala⁴-Ile⁵-His⁶-Ala⁷-Ile⁸ (SEQ ID NO:21).

50

Un grupo alquilo es un hidrocarburo no aromático de cadena recta o ramificada que está saturado completamente. Típicamente, un grupo alquilo de cadena recta o ramificada tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a aproximadamente 10. Los ejemplos de grupos alquilo de cadena recta y ramificada incluyen metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, pentilo y octilo. Un grupo alquilo C1-C 4 de cadena recta o ramificada se denomina también un grupo "alquilo inferior".

55

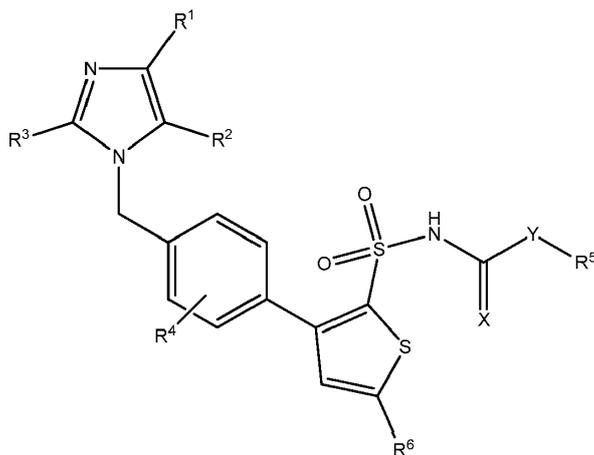
Un grupo aralquilo es un grupo alquilo sustituido por un grupo arilo. Los grupos aromáticos (arilo) incluyen grupos

aromáticos carbocíclicos tales como fenilo, naftilo y antracilo, y grupos heteroarilo tales como imidazolilo, tienilo, furilo, piridilo, pirimidilo, piranilo, pirazolilo, pirrolilo, pirazinilo, tiazolilo, oxazolilo y tetrazolilo. Los grupos aromáticos también incluyen sistemas anulares aromáticos, policíclicos, fusionados en los cuales un anillo aromático carbocíclico o un anillo de heteroarilo está condensado a uno o más de otros anillos de heteroarilo. Los ejemplos incluyen benzotienilo, benzofurilo, indolilo, quinolinilo, benzotiazol, benzoxazol, bencimidazol, quinolinilo, isoquinolinilo e isoindolilo.

Agonistas del receptor de Ang (1-7)

- 10 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos para tratar afecciones cerebrales incluyendo administrar a un sujeto que padece o es susceptible a una o más afecciones cerebrales, un agonista del receptor de angiotensina (1-7). Como se usa en el presente documento, el término "agonista del receptor de angiotensina (1-7)" incluye cualquier molécula que tenga un impacto positivo en una función de un receptor de angiotensina (1-7), en particular, el receptor de Mas acoplado a la proteína G. En algunas realizaciones, un agonista de receptor de angiotensina (1-7) mejora, fortalece, activa y/o aumenta directa o indirectamente una actividad del receptor de angiotensina (1-7) (es decir, el receptor de Mas). En algunas realizaciones, un agonista del receptor de angiotensina (1-7) interactúa directamente con un receptor de angiotensina (1-7) (es decir, el receptor de Mas). Dichos agonistas pueden ser peptídicos o no peptídicos incluyendo, por ejemplo, proteínas, compuestos químicos, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, anticuerpos, fármacos, ligandos u otros agentes. En algunas realizaciones, el agonista del receptor de angiotensina (1-7) es un agonista no peptídico.

Una clase ejemplar de agonistas de receptores de angiotensina (1-7) son los 1-(p-tienilbencil)imidazoles. Los ejemplos de estos agonistas de receptores de angiotensina (1-7) no peptídicos se representan por la Fórmula estructural (VI):



(VI),

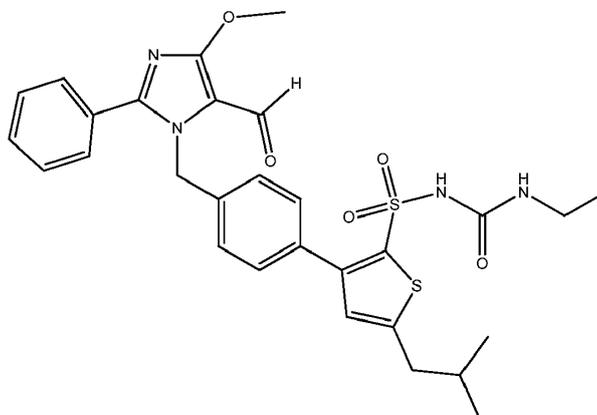
- 25 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

- 30 R¹ es halógeno, hidroxilo, alcoxi (C₁-C₄), alcoxi (C₁-C₈)-, en el que 1 a 6 átomos de carbono se reemplazan por los heteroátomos O, S, o NH (preferiblemente por O), alcoxi (C₁-C₄) sustituido por un éter cíclico saturado tal como tetrahidropirano o tetrahydrofurano, O-alquenoilo (C₁-C₄), O-alquilarilo (C₁-C₄), o ariloxi, que está sin sustituir o sustituido por un sustituyente seleccionado de halógeno, alquilo (C₁-C₃), alcoxi (C₁-C₃) y trifluorometilo;
- R² es CHO, COOH, o (3) CO-O-alquilo (C₁-C₄);
- 35 R³ es alquilo (C₁-C₄) o arilo;
- R⁴ es hidrógeno, halógeno (cloro, bromo, flúor), o alquilo (C₁-C₄);
- X es oxígeno o azufre;
- Y es oxígeno o -NH-;
- R⁵ es hidrógeno, alquilo (C₁-C₆); o alquilarilo (C₁-C₄), donde R⁵ es hidrógeno, cuando Y es -NH-; y
- 40 R⁶ es alquilo (C₁-C₅).

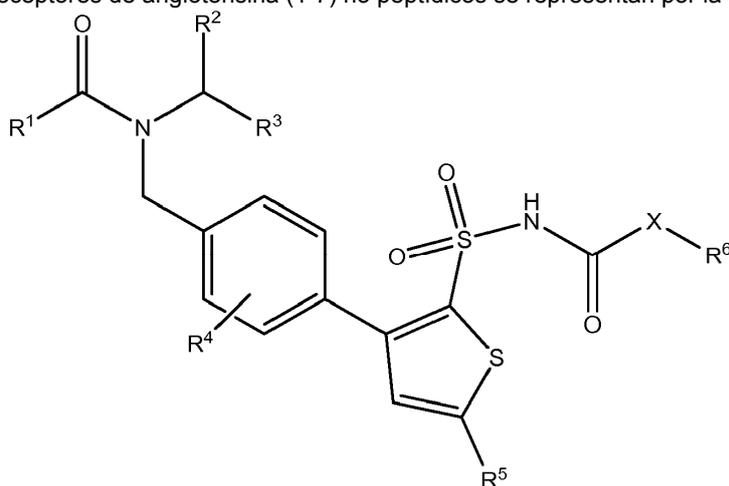
En ciertas realizaciones, R¹ no es halógeno, cuando R² es COOH o CO-O-alquilo (C₁-C₄).

En algunas realizaciones, un agonista del receptor de angiotensina-(1-7) es AVE 0991, 5-formil-4-metoxi-2-fenil-1[[4-

[2-(etilaminocarbonilsulfonamido)-5-isobutil-3-tienil]-fenil]-metil]-imidazol, que se representa por la siguiente estructura:



5 Otra clase ejemplar de agonistas de receptores de angiotensina (1-7) son las p-tienilbencilamidas. Los ejemplos de estos agonistas de receptores de angiotensina (1-7) no peptídicos se representan por la Fórmula estructural (VII):



(VII),

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

- 10 R¹ es alquilo (C₁-C₅) que está sin sustituir o sustituido por un radical seleccionado de NH₂, halógeno, O-alquilo (C₁-C₃), CO-O-alquilo (C₁-C₃) y CO₂H, cicloalquilo (C₃-C₈), alquil (C₁-C₃)-cicloalquilo (C₃-C₈), arilo (C₆-C₁₀) que está sin sustituir o sustituido por un radical seleccionado de halógeno y O-alquilo (C₁-C₃), alquil (C₁-C₃)-arilo (C₆-C₁₀), donde el radical arilo está sin sustituir o sustituido por un radical seleccionado de halógeno y O-alquilo (C₁-C₃), heteroarilo (C₁-C₅), o alquil (C₁-C₃)-heteroarilo (C₁-C₅);
- 15 R² es hidrógeno, alquilo (C₁-C₆) que está sin sustituir o sustituido por un radical elegido de halógeno y O-alquilo (C₁-C₃), cicloalquilo (C₃-C₈), alquil (C₁-C₃)-cicloalquilo (C₃-C₈), arilo (C₆-C₁₀) que está sin sustituir o sustituido por un radical elegido de entre halógeno, O-alquilo (C₁-C₃) y CO-O-alquilo (C₁-C₃), o alquil (C₁-C₃)-arilo (C₆-C₁₀) que está sin sustituir o sustituido por un radical elegido de halógeno y O-alquilo (C₁-C₃);
- 20 R³ es hidrógeno, COOH, o COO-alquilo (C₁-C₄);
- R⁴ es hidrógeno, halógeno; o alquilo (C₁-C₄);
- R⁵ es hidrógeno o alquilo (C₁-C₆);
- R⁶ es hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), alquil (C₁-C₃)-cicloalquilo (C₃-C₈), o alqueno (C₂-C₆); y
- X es oxígeno o NH.
- 25 Los ejemplos adicionales de agonistas del receptor de angiotensina-(1-7) se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 6.235.766.

Diversos agonistas del receptor de angiotensina (1-7) descritos anteriormente pueden estar presentes como sales

farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, "una sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que retienen la actividad deseada del péptido o compuesto equivalente, pero que preferiblemente no afectan de manera perjudicial la actividad del péptido u otro componente de un sistema, que usa el péptido. Los ejemplos de estas sales son sales de adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, y similares. Las sales también se pueden formar con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pámico, ácido algínico, ácido poliglutámico y similares. Las sales formadas a partir de un material catiónico pueden usar la base conjugada de esas sales inorgánicas y orgánicas. Las sales también se pueden formar con cationes de metales polivalentes tales como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel y similares o con un catión orgánico formado a partir de N,N'-dibenciletilendiamina o etilendiamina, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, una sal de tanato de cinc). Se prefieren las sales fisiológicamente aceptables, no tóxicas.

15 Las sales se pueden formar por medios convencionales tal como haciendo reaccionar las formas de ácido libre o base libre del producto con uno o más equivalentes del ácido o base apropiado en un disolvente o un medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente tal como agua que luego se elimina al vacío, o por liofilización, o al intercambiar los cationes de una sal existente por otro catión en una resina de intercambio iónico adecuada.

20 Un grupo alquilo es un hidrocarburo no aromático de cadena recta o ramificada que está saturado completamente. Típicamente, un grupo alquilo de cadena recta o ramificada tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a aproximadamente 10. Los ejemplos de grupos alquilo de cadena recta y ramificada incluyen metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y octilo. Un grupo alquilo C1-C 4 de cadena recta o ramificada se denomina también un grupo "alquilo inferior".

25 Un grupo alqueno es un hidrocarburo no aromático de cadena recta o ramificada que incluye uno o más dobles enlaces. Típicamente, un grupo alqueno de cadena recta o ramificada tiene de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a aproximadamente 10. Los ejemplos de grupos alqueno de cadena recta y ramificada incluyen etenilo, n-propenilo y n-butenilo.

30 Los grupos aromáticos (arilo) incluyen grupos aromáticos carbocíclicos tales como fenilo, naftilo y antracilo, y grupos heteroarilo tales como imidazolilo, tienilo, furilo, piridilo, pirimidilo, piranilo, pirazolilo, pirrolilo, pirazinilo, tiazolilo, oxazolilo y tetrazolilo. Los grupos aromáticos también incluyen sistemas anulares aromáticos, policíclicos, fusionados en los cuales un anillo aromático carbocíclico o un anillo de heteroarilo está condensado a uno o más de otros anillos de heteroarilo. Los ejemplos incluyen benzotienilo, benzofurilo, indolilo, quinolinilo, benzotiazol, benzoxazol, bencimidazol, quinolinilo, isoquinolinilo e isoindolilo.

Un grupo aralquilo es un grupo alquilo sustituido por un grupo arilo.

40 **Formulaciones**

De acuerdo con los métodos de la descripción, un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) como se describe en el presente documento se puede administrar a un sujeto solo (por ejemplo, como un péptido o compuesto purificado), o como un componente de una composición o medicamento (por ejemplo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad), como se describe en el presente documento. Las composiciones se pueden formular con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable para preparar una composición farmacéutica. El vehículo y la composición pueden ser estériles. La formulación debe adaptarse al modo de administración, por ejemplo administración intravenosa o subcutánea. Los métodos para formular composiciones se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceuticals Sciences, 17ª Edición, Mack Publishing Co., (Alfonso R. Gennaro, editor) (1989)).

Los vehículos adecuados, farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas (por ejemplo, NaCl), una solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares tales como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como también combinaciones de los mismos. Las preparaciones farmacéuticas se pueden mezclar, si se desea, con agentes auxiliares (por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influenciar la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes y/o aromáticas y similares) los cuales no reaccionan

de manera perjudicial con los compuestos activos o interfieren con su actividad. En una realización preferida, se usa un vehículo soluble en agua que es adecuado para la administración intravenosa.

5 La composición o medicamento, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampones de pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, formulación de liberación sostenida o polvo. La composición también se puede formular como un supositorio, con sustancias aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos.

10 La composición o medicamento se puede formular de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica que está adaptada para la administración a seres humanos. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición para la administración intravenosa es típicamente una solución en un tampón acuoso, isotónico, estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran ya sea por separado o se mezclan conjuntamente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un 15 concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición debe administrarse por medio de una infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de grado farmacéutico, solución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra por medio de una inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de 20 la administración.

Un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) como se describen en el presente documento se pueden formular como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, 25 etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.

Un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) como se describe en el presente documento (o una composición o medicamento que contiene un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de 30 angiotensina (1-7) descrito en el presente documento) se administra por cualquier ruta apropiada. En algunas realizaciones, un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) descrito en el presente documento se administra por vía subcutánea. Como se usa en el presente documento, el término "tejido subcutáneo" se define como una capa de tejido conectivo, irregular, suelto inmediatamente debajo de la piel. Por ejemplo, la administración subcutánea se puede realizar inyectando una composición en áreas que incluyen, pero 35 sin limitación, la región del muslo, región abdominal, región glútea o región escapular. En algunas realizaciones, un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) descrito en el presente documento se administra por vía intravenosa. Como alternativa, un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) descrito en el presente documento (o una composición o medicamento que contiene un péptido de Ang (1-7) o un agonista de receptor de angiotensina (1-7) descrito en el presente documento) se puede administrar por 40 inhalación, por vía parenteral, intradérmica, transdérmica, rectal o transmucosa. Se puede usar más de una ruta concurrentemente, si se desea.

En algunas realizaciones, una composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz y/o de acuerdo con un régimen de dosificación que se correlaciona con un resultado deseado, particular (por ejemplo, con el 45 tratamiento o reducción del riesgo de ictus isquémico).

Las dosis o cantidades particulares a administrar de acuerdo con la presente invención pueden variar, por ejemplo, dependiendo de la naturaleza y/o grado del resultado deseado, en particular de la ruta y/o temporización de administración, y/o de una o más características (por ejemplo, peso, edad, historial personal, característica genética, 50 parámetro de estilo de vida, gravedad de defecto cardíaco y/o nivel de riesgo de defecto cardíaco, etc., o combinaciones de los mismos). Dichas dosis o cantidades pueden determinarse por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, una dosis o cantidad apropiada se determina de acuerdo con técnicas clínicas estándar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una dosis o cantidad apropiada es una dosis o cantidad suficiente para reducir una puntuación del índice de gravedad de la enfermedad en el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 55 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100% o más. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una dosis o cantidad apropiada es una dosis o cantidad suficiente para reducir una puntuación del índice de gravedad de la enfermedad en el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100%. Como alternativa, o adicionalmente, en algunas realizaciones, una dosis o cantidad apropiada se determina a través del uso de uno o más ensayos *in vitro* o *in vivo*

para ayudar a identificar intervalos de dosificación o cantidades deseables u óptimas a administrar.

En diversas realizaciones, un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se determina en gran medida con base en la cantidad total del agente terapéutico que está contenido en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (por ejemplo, tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar la enfermedad o afección subyacente). En algunas realizaciones particulares, las dosis o cantidades apropiadas a administrar pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de prueba de modelo *in vitro* o animal.

Las cantidades de dosificación terapéuticamente eficaces de péptidos de angiotensina (1-7) o agonistas del receptor de angiotensina (1-7), incluyendo derivados, análogos y/o sales pueden estar presentes en cantidades variables en diversas realizaciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de angiotensina (1-7) puede ser una cantidad que varía de aproximadamente 10-1000 mg (por ejemplo, aproximadamente 20 mg - 1.000 mg, 30 mg - 1.000 mg, 40 mg - 1.000 mg, 50 mg - 1.000 mg, 60 mg - 1.000 mg, 70 mg - 1.000 mg, 80 mg - 1.000 mg, 90 mg - 1.000 mg, aproximadamente 10-900 mg, 10-800 mg, 10-700 mg, 10-600 mg, 10-500 mg, 100-1000 mg, 100-900 mg, 100-800 mg, 100-700 mg, 100-600 mg, 100-500 mg, 100-400 mg, 100-300 mg, 200-1000 mg, 200-900 mg, 200-800 mg, 200-700 mg, 200-600 mg, 200-500 mg, 200-400 mg, 300-1000 mg, 300-900 mg, 300-800 mg, 300-700 mg, 300-600 mg, 300-500 mg, 400 mg - 1.000 mg, 500 mg - 1.000 mg, 100 mg - 900 mg, 200 mg - 800 mg, 300 mg - 700 mg, 400 mg - 700 mg, y 500 mg - 600 mg). En algunas realizaciones, un péptido de angiotensina (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) está presente en una cantidad de o mayor de aproximadamente 10 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg. En algunas realizaciones, un péptido de angiotensina (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) está presente en una cantidad de o menor de aproximadamente 1000 mg, 950 mg, 900 mg, 850 mg, 800 mg, 750 mg, 700 mg, 650 mg, 600 mg, 550 mg, 500 mg, 450 mg, 400 mg, 350 mg, 300 mg, 250 mg, 200 mg, 150 mg, o 100 mg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz descrita en el presente documento se proporciona en una dosis. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz descrita en el presente documento se proporciona en un día.

En otras realizaciones, una cantidad de dosificación terapéuticamente eficaz puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 500 mg/kg de peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 400 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 300 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 200 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 100 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 90 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 80 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 70 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 60 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 50 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 40 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 30 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 25 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 20 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 15 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a 10 mg/kg de peso. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz descrita en el presente documento se proporciona en una dosis. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz descrita en el presente documento se proporciona en un día.

En aún otras realizaciones, una cantidad de dosificación terapéuticamente eficaz puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a aproximadamente 1 mg/kg de peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a aproximadamente 0,9 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a aproximadamente 0,8 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a aproximadamente 0,7 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a aproximadamente 0,6 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso a aproximadamente 0,5 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso a aproximadamente 1 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso a aproximadamente 0,9 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso a aproximadamente 0,8 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso a aproximadamente 0,7 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso a aproximadamente 0,6 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso a aproximadamente 0,5 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,02 mg/kg de peso a aproximadamente 1 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,02 mg/kg de peso a aproximadamente 0,9 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,02 mg/kg de peso a aproximadamente 0,8 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,02 mg/kg de peso a aproximadamente 0,7 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,02 mg/kg de peso a aproximadamente 0,6 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,02 mg/kg de peso a aproximadamente 0,5

mg/kg de peso, de aproximadamente 0,03 mg/kg de peso a aproximadamente 1 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,03 mg/kg de peso a aproximadamente 0,9 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,03 mg/kg de peso a aproximadamente 0,8 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,03 mg/kg de peso a aproximadamente 0,7 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,03 mg/kg de peso a aproximadamente 0,6 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,03 mg/kg de peso a aproximadamente 0,5 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,04 mg/kg de peso a aproximadamente 0,9 mg/kg de peso a aproximadamente 1 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,04 mg/kg de peso a aproximadamente 0,8 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,04 mg/kg de peso a aproximadamente 0,7 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,04 mg/kg de peso a aproximadamente 0,6 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,04 mg/kg de peso a aproximadamente 0,5 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso a aproximadamente 1 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso a aproximadamente 0,9 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso a aproximadamente 0,8 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso a aproximadamente 0,7 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso a aproximadamente 0,6 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso a aproximadamente 0,5 mg/kg de peso. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz descrita en el presente documento se proporciona en una dosis. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz descrita en el presente documento se proporciona en un día.

En aún otras realizaciones, una cantidad de dosificación terapéuticamente eficaz puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,1 mg/kg de peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,09 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,08 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,07 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,06 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,05 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a aproximadamente 0,04 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,03 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,02 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,019 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,018 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,017 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,016 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,015 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,014 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,013 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,012 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,011 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,01 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,009 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,008 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,007 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,006 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,005 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,004 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,003 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso a 0,002 mg/kg de peso. En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz puede ser 0,0001 mg/kg de peso, 0,0002 mg/kg de peso, 0,0003 mg/kg de peso, 0,0004 mg/kg de peso, 0,0005 mg/kg de peso, 0,0006 mg/kg de peso, 0,0007 mg/kg de peso, 0,0008 mg/kg de peso, 0,0009 mg/kg de peso, 0,001 mg/kg de peso, 0,002 mg/kg de peso, 0,003 mg/kg de peso, 0,004 mg/kg de peso, 0,005 mg/kg de peso, 0,006 mg/kg de peso, 0,007 mg/kg de peso, 0,008 mg/kg de peso, 0,009 mg/kg de peso, 0,01 mg/kg de peso, 0,02 mg/kg de peso, 0,03 mg/kg de peso, 0,04 mg/kg de peso, 0,05 mg/kg de peso, 0,06 mg/kg de peso, 0,07 mg/kg de peso, 0,08 mg/kg de peso, 0,09 mg/kg de peso, o 0,1 mg/kg de peso. La dosis eficaz para un individuo en particular se puede variar (por ejemplo, aumentar o disminuir) a lo largo del tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo.

En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 1-1.000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (por ejemplo, que varía de aproximadamente 1-900 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-800 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-700 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-90 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$). En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 1-500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. En algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz seleccionada de aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1.000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$.

Programas de dosificación

Diversas realizaciones pueden incluir diferentes regímenes de dosificación. En algunas realizaciones, el péptido de

angiotensina (1-7) o el agonista del receptor de angiotensina (1-7) se administra a través de infusión continua. En algunas realizaciones, la infusión continua es intravenosa. En otras realizaciones, la infusión continua es subcutánea. Como alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, el péptido de angiotensina (1-7) o el agonista del receptor de angiotensina (1-7) se administra bimensualmente, mensualmente, dos veces al mes, cada 5 tres semanas, cada dos semanas, cada semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, diariamente, dos veces al día, o en otro programa de dosificación clínicamente deseable. El régimen de dosificación para un sujeto individual no necesita ser un intervalo fijo, sino que se puede cambiar a través del tiempo, dependiendo de las necesidades del sujeto.

10 **Terapias de combinación**

En algunas realizaciones, un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7) se usará como parte de una terapia de combinación. Se contempla que cualquier agente terapéutico o tratamiento conocido para una o más afecciones cerebrales se puede usar con uno o más péptidos de Ang (1-7) o agonistas del receptor de angiotensina (1-7) como se describe en el presente documento. Los compuestos ejemplares que se pueden usar con uno o más péptidos de Ang (1-7) o agonistas del receptor de angiotensina (1-7) como una terapia de combinación incluyen, pero sin limitación, compuestos trombolíticos, antioxidantes u otros agentes de especies de oxígeno reactivo, interferón beta-la (por ejemplo, Avonex, Rebif, CinnoVex, Recigen), interferón beta-lb (Betaseron), acetato de glatiramer (Copaxone), mitoxantrona (Novantrona) natalizumab (Tisabri), fingolimod (Gilenya), el primer fármaco oral disponible, y Teriflunomida (Aubagio) o combinaciones de los mismos.

Kits

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona además kits u otros artículos de fabricación los cuales contienen un péptido de Ang (1-7), un agonista de receptor de angiotensina (1-7) o una formulación que contiene los mismos y proporciona instrucciones para su reconstitución (si están liofilizados) y/o uso. Los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir un recipiente, una jeringa, vial y cualquier otro artículo, dispositivo o equipo que sea útil en la administración (por ejemplo, subcutánea, por inhalación). Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas (por ejemplo, jeringas precargadas), ampollas, cartuchos, depósitos o lyo-jects. El recipiente puede formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. En algunas realizaciones, un recipiente es una jeringa precargada. Las jeringas precargadas adecuadas incluyen, pero sin limitación, jeringas de vidrio de borosilicato con recubrimiento de silicona horneado, jeringas de vidrio de borosilicato con silicona pulverizada, o jeringas de resina de plástico sin silicona.

Típicamente, el recipiente puede conservar formulaciones y una etiqueta sobre, o asociada con, el recipiente que puede indicar instrucciones para la reconstitución y/o uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación se reconstituye a las concentraciones descritas anteriormente. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada a, por ejemplo, la administración subcutánea. En algunas realizaciones, un recipiente puede contener una dosis individual de una formulación estable que contiene un péptido de Ang (1-7) o un agonista del receptor de angiotensina (1-7). En diversas realizaciones, una dosis individual de la formulación estable está presente en un volumen menor de aproximadamente 15 ml, 10 ml, 5,0 ml, 4,0 ml, 3,5 ml, 3,0 ml, 2,5 ml, 2,0 ml, 1,5 ml, 1,0 ml, o 0,5 ml. Como alternativa, un recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de múltiples usos, el cual permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2 a 6 administraciones) de la formulación. Los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, BWF1, solución salina, solución salina tamponada). Tras la mezcla del diluyente y la formulación, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida será generalmente de al menos 1 mg/ml (por ejemplo, al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 100 mg/ml). Los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para el uso. En algunas realizaciones, los kits u otros artículos de fabricación pueden incluir una instrucción para la autoadministración.

Ejemplos

55 **Ejemplo 1. Administración continua de PanCyte**

Se han usado varios modelos animales para estudiar la isquemia cerebral en un esfuerzo por entender su patofisiología y por identificar las estrategias terapéuticas para minimizar la gravedad del daño isquémico. La isquemia focal causa un infarto cerebral localizado y puede ser inducida por la oclusión de la arteria cerebral media

(MCAO). Un modelo de rata de MCAO ha ganado aceptación como un modelo para el infarto hemisférico en seres humanos. Después de la MCAO, se produce un infarto cortical y estriatal con evolución temporal y espacial dentro de la región vascular suministrada por la arteria cerebral media.

- 5 En los últimos años, se ha reunido abundante evidencia con respecto a evaluaciones de comportamiento en estudios de animales con ictus, que incluyen el modelo de rata de MCAO de ictus isquémico. Se cree que la mejora del comportamiento es un parámetro fiable para estudios de eficacia de agentes terapéuticos potenciales.

10 Un tratamiento deseable para complicaciones vasculares de ictus será un medio no invasivo para promover la neovascularización en tejidos isquémicos. Las realizaciones de la presente invención proporcionan este tratamiento terapéutico. La unión de péptidos de angiotensina (1-7) sobre la superficie celular de células endoteliales puede rescatar estas células de la apoptosis, inducir su proliferación, migración y formación de vasos sanguíneos pequeños *in vitro*.

- 15 En este ejemplo, el modelo de rata de MCAO se usó para evaluar la eficacia dependiente de la dosis de péptidos de angiotensina (1-7), por ejemplo, PanCyte, en la mejora de la función post-oclusión según se midió por medio de varias evaluaciones de comportamiento aceptadas.

20 La manipulación de animales se realizó de acuerdo con las directrices del National Institute of Health (NIH) y la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Los animales se alojaron en jaulas de polietileno (5/jaula) que median 35 x 30 x 15 cm, con una rejilla superior de acero inoxidable que facilitaba el alimento granulado y el agua potable en una botella de plástico; material de cama: se usó cáscara de arroz limpia esterilizada con vapor (Harlan, Sani-chip Cat. n.º: 2018SC+F) y el material de cama se cambió junto con la jaula al menos dos veces a la semana. En este ejemplo, se usó un total de 60 ratas y cada rata pesaba aproximadamente
25 300 gramos al inicio del estudio.

Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial para roedores (Teklad Certified Global 18% Protein Diet cat. n.º: 106S8216). Los animales tenían acceso a agua potable acidificada (pH entre 2,5 y 3,5) obtenida del suministro del municipio de acuerdo con SOP de PharmaSeed N.º 214 (Water System). Los animales se alojaron
30 en condiciones estándar de laboratorio, aire acondicionado y filtrado (HEPA F6/6) con un suministro de aire fresco adecuado (15 cambios de aire como mínimo/hora). Los animales se mantuvieron en un entorno de clima controlado. Los animales se mantuvieron dentro de un intervalo de temperatura de aproximadamente 20-24 °C con un intervalo de humedad relativa del 30-70% y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se inspeccionaron a la
35 llegada y se inspeccionaron a diario para determinar cualquier signo de morbilidad o mortalidad. Los animales encontrados en una condición moribunda y los animales que mostraban dolor grave y signos duraderos de angustia grave (tales como disnea, posición recostada lateral, convulsiones, parálisis o incapacidad para alcanzar el alimento o agua) se sacrificaron humanitariamente.

Para los fines de este ejemplo, el Día del procedimiento de la oclusión de la arteria cerebral media transitoria
40 (tMCAO) se define como el "Día 1" en este estudio. El día de la cirugía, la anestesia se indujo con isoflurano al 4% en una mezcla de N₂O al 70% y O₂ al 30% y se mantuvo con isoflurano al 1,5-2%.

Los procedimientos de tMCAO se realizaron de acuerdo con el método descrito por R. Schmid-Elsaesser et al. En
45 resumen, la CCA (arteria carótida común) derecha se expuso a través de una incisión en la línea media del cuello y se diseccionó cuidadosamente libre de nervios circundantes y fascia - desde su bifurcación hasta la base del cráneo. Las ramificaciones arteriales occipitales de la ECA (arteria carótida externa) se aislaron entonces, y esas ramificaciones se diseccionaron y se coagularon. La ECA se diseccionó además distalmente y se coaguló junto con las ramificaciones de arterias lingual terminal y maxilar, que después se dividió. La ICA (arteria carótida interna) se
50 aisló y se separó cuidadosamente del nervio vagal adyacente y la arteria pterigopalatina se ligó cerca de su origen con una sutura de nylon 5-0 (SMI, Bélgica). Después, una sutura de seda 4-0 se ató holgamente alrededor del muñón inmovilizado de la ECA, y una sutura de nylon de monofilamento 4-0 con 4 cm de longitud (la punta de la sutura se despuntó por medio del uso de una flama, y la sutura se revistió con polilisina, antes de la inserción) se insertó a través de la ECA próxima en la ICA y desde ahí al círculo de Willis, ocluyendo de manera eficaz la MCA. La herida quirúrgica se cerró y los animales se devolvieron a sus jaulas para recuperarse de la anestesia. Una hora y
55 media después de la oclusión, las ratas se anestesiaron de nuevo, el monofilamento se retiró para permitir la perfusión, la herida quirúrgica se cerró y las ratas se devolvieron a sus jaulas.

Los animales se sujetaron a una Escala de clasificación neurológica modificada (mNRS) a las 24 horas post-perfusión. Solamente se incluyeron en este estudio los animales con una puntuación total de ≥10. Los animales se

asignaron a grupos de ensayo, de acuerdo con los resultados del la mNRS el día 2, con el propósito de tener una distribución similar de la actuación de las ratas entre los grupos. Iniciado el día 2, 24 horas después de la cirugía, a cada animal se le implantó por vía subcutánea una bomba osmótica Alzet y se trató por medio de la administración continua de PanCyte (2,5 mg/ml o 25 mg/ml en PBS; SEC ID NO.6). Véase la Tabla 1 para la asignación de grupos:

5

Tabla 1 - Asignación de grupos

Grupo	Tratamiento	Dosis	Duración del tratamiento (días)	Ratas totales
1	Vehículo	0	49	15
2	PanCyte	50 µg/kg (2,5 mg/ml)	49	15
3	PanCyte	500 µg/kg (25 mg/ml)	49	15
4	PanCyte	50 µg/kg (2,5 mg/ml)	14	15

Prueba de marcha (Evaluación el Día 8, Día 15, Día 22, Día 29 y Día 36)

10 Los animales se sometieron a pruebas para determinar la acinesia de los miembros delanteros en una prueba de marcha. El animal se mantuvo con sus miembros posteriores fijos con una mano y el miembro delantero no supervisado con la otra, mientras que la pata delantera no restringida toca una mesa. El número de pasos de ajuste se contó mientras que el animal se movía lateralmente a lo largo de la superficie de la mesa (85 cm en aproximadamente cinco segundos), en la dirección de la pata delantera y la pata posterior para ambos miembros

15 delanteros. La Figura 1 muestra los resultados de la prueba de marcha los días 8, 15, 22, 29 y 36. Se analizaron cuatro grupos en este ensayo, un grupo de control (que recibió solo PBS durante 49 días), un grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 49 días, un grupo que recibió 500 µg/kg de PanCyte durante 4 9 días y un grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 14 días. Los datos muestran que cada grupo que recibió una administración de PanCyte experimentó un rendimiento aumentado de las ratas el día 22 en comparación con los animales de control,

20 y que este efecto continuó hasta el día 36, con una significación estadística creciente. Adicionalmente, el grupo que se expuso a 50 µg/kg de dosis de PanCyte durante 49 días rindió significativamente mejor que los controles el día 15 también, mientras que los grupos expuestos a 500 µg/kg de PanCyte durante 49 días o 50 µg/kg de PanCyte durante 14 días, a pesar de la tendencia hacia la mejora, no alcanzaron niveles estadísticamente significativos en este punto del tiempo en este experimento particular.

25

Colocación miembros delanteros (Evaluación el Día 8, Día 15, Día 22, Día 29 y Día 36)

Las pruebas de colocación de miembros se dividieron en pruebas tanto de miembros delanteros como de miembros posteriores. Para la prueba de colocación de miembros delanteros, el examinador mantuvo a la rata cerca de la parte superior de una mesa y apuntó la capacidad de la rata para colocar el miembro delantero sobre la parte superior de la mesa en respuesta a la estimulación de los bigotes, visual, táctil, o propioceptiva. De forma similar, para la prueba de colocación de los miembros posteriores, el examinador evaluó la capacidad de la rata para colocar el miembro posterior sobre la parte superior de una mesa en respuesta a la estimulación táctil y propioceptiva. Se obtuvieron subpuntuaciones separadas para cada modo de entrada sensorial y se añadieron para proporcionar

30 puntuaciones totales (para la prueba de colocación de miembros delanteros: 0 = normal, 12 = deteriorado al máximo; para la prueba de colocación de miembros posteriores: 0 = normal; 6 = deteriorado al máximo). Se proporcionaron puntuaciones en aumentos de medios puntos de la siguiente manera: Prueba de colocación de miembros delanteros: colocación de bigotes (0-2), colocación visual -delantera (0-2), -lateral (0-2); colocación táctil -dorsal (0-2), -lateral (0-2); colocación propioceptiva (0-2); para un total de 0-12. La Figura 2 muestra los resultados de la

40 prueba de colocación de miembros delanteros los días 8, 15, 22, 29 y 36. Se analizaron cuatro grupos en este ensayo, un grupo de control (que recibió solo PBS durante 49 días), un grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 49 días, un grupo que recibió 500 µg/kg de PanCyte durante 4 9 días y un grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 14 días. Los datos muestran que cada grupo que recibió una administración de PanCyte experimentó un rendimiento aumentado en esta prueba el día 29 en comparación con los animales de control, y que

45 este efecto continuó hasta el día 36. Además, el grupo expuesto a 50 µg/kg de PanCyte durante 14 días rindió significativamente mejor que los animales de control que comenzaron el día 15, mientras que los otros grupos de tratamiento, aunque con una tendencia de la misma manera, no alcanzaron una significación estadística hasta el día 29 en este experimento.

50 Prueba de balanceo del cuerpo (Evaluación el Día 8, Día 15, Día 22, Día 29 y Día 36)

La rata se mantuvo aproximadamente a 1 pulgada de la base de su cola. Después se elevó a una pulgada por

encima de una superficie de una mesa. La rata se mantuvo en el eje vertical, definido como no más de 10° al lado izquierdo o al lado derecho. Se registró un balanceo cuando la rata movió su cabeza fuera del eje vertical a cualquier lado. Antes de intentar otro balanceo, la rata tenía que regresar a la posición vertical para que el siguiente balanceo se contara. Se contaron veinte (20) balanceos totales. Una rata normal tiene típicamente un número igual de balanceos a cada lado. Después de la isquemia focal, las ratas tienden a balancearse al lado contralateral (lado izquierdo en este ejemplo). Las puntuaciones de balanceo del cuerpo se expresan como un porcentaje de balanceos totales sobre la derecha. La Figura 3 muestra los resultados de la prueba de balanceo del cuerpo los días 8, 15, 22, 29 y 36. Se analizaron cuatro grupos en este ensayo, un grupo de control (que recibió solo PBS durante 49 días), un grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 49 días, un grupo que recibió 500 µg/kg de PanCyte durante 49 días y un grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 14 días. Los datos muestran que cada grupo que recibió la administración de PanCyte experimentó un rendimiento mejorado en la prueba el día 36 en comparación con el grupo de control, mostrando el grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 14 días una significación estadística que comenzó el día 29 en comparación con el control en este experimento. Todos los grupos de tratamiento presentaron una tendencia hacia puntuaciones mejoradas comenzando el día 8 en comparación con el grupo de control.

Evaluación de mNRS (Evaluación el Día 1, Día 8, Día 15, Día 22, Día 29 y Día 36)

La Escala de clasificación neurológica modificada (mNRS) se administró por un individuo que desconocía el fármaco/dosis administrada (prueba ciega). La mNRS según se administró permite una neuro-puntuación en una escala de 0 a 18 puntos posibles. Los animales con puntuaciones más altas mostraron más síntomas graves y discapacidad que las ratas de puntuaciones más bajas. La Figura 4 muestra los resultados de la evaluación de mNRS los días 1, 8, 15, 22, 29 y 36. Se analizaron cuatro grupos en este ensayo, un grupo de control (que recibió solo PBS durante 49 días), un grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 49 días, un grupo que recibió 500 µg/kg de PanCyte durante 49 días y un grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 14 días. Los datos muestran que cada grupo que recibió la administración de PanCyte experimentó un rendimiento mejorado en la prueba el día 29 en comparación con el grupo de control. Además de los días 29 y 36, el grupo que recibió 50 µg/kg de PanCyte durante 49 días mostró un rendimiento estadísticamente mejorado los días 8 y 15, y el grupo que recibió 500 µg/kg de PanCyte durante 49 días mostró un rendimiento estadísticamente mejorado el día 22 en este experimento.

Ejemplo 2. Comparación de la administración de TXA127, PanCyte y PanCyte lineal

El modelo animal, los procedimientos quirúrgicos y los procedimientos y condiciones de cuidado de los animales fueron como se ha descrito para el Ejemplo 1, a menos que se especifique de otro modo. En este ejemplo, se usaron un total de 105 animales, y la Tabla 2 muestra la asignación de grupos para este estudio:

Tabla 2 - Asignación de grupos

Grupo	Tratamiento	Dosis	Duración del tratamiento (días)	Ratas totales
1	Vehículo	0	28	15
2	TXA127	500 µg/kg	28	15
3	TXA127	1.000 µg/kg	28	15
4	TXA127	500 µg/kg*	28	15
5	PanCyte	500 µg/kg*	28	15
6	PanCyte	500 µg/kg	28	15
7	PanCyte lineal	50 µg/kg*	28	15

* = ratas tratadas con la administración continua de la bomba Alzet por vía subcutánea

Los animales se sujetaron a una Escala de clasificación neurológica modificada (mNRS) a las 24 horas post-reperusión. Solamente se incluyeron en este estudio los animales con una puntuación total de ≥10. Los animales se asignaron a grupos de ensayo, de acuerdo con los resultados del la mNRS el día 2, con el propósito de tener una distribución similar de la actuación de las ratas entre los grupos. Comenzando el día 2, 24 horas después de la cirugía, a los animales en los grupos 4, 5 y 7 se les implantó por vía subcutánea una bomba osmótica Alzet y se trataron con 500 µg/kg de TXA127 (SEQ ID NO:1), 500 µg/kg de PanCyte (ciclado SEQ ID NO:6), o 50 µg/kg de PanCyte lineal (SEQ ID NO:6). Los animales en los grupos 2, 3 y 6 recibieron 500 µg/kg o 1.000 µg/kg de TXA127 o 500 µg/kg de PanCyte, administrados por vía subcutánea a través de inyección diaria. Los animales en el grupo 1 se trataron con una inyección subcutánea diaria de PBS (vehículo).

Prueba de marcha (Evaluación antes de la operación, Día 14, Día 21, Día 28, Día 35, Día 42 y Día 49)

Los animales se sometieron a pruebas para determinar la acinesia de los miembros delanteros en una prueba de marcha (ST). El animal se mantuvo con sus miembros posteriores fijos con una mano y el miembro delantero sin supervisar con la otra, mientras que la pata delantera no restringida toca la mesa. El número de pasos de ajuste se cuentan mientras que el animal se mueve lateralmente a lo largo de la superficie de la mesa (85 cm en aproximadamente cinco segundos), en la dirección de la pata delantera y la pata posterior para ambos miembros delanteros. La Figura 5 muestra que el tratamiento con TXA127, PanCyte o Pancyte lineal mejoró significativamente el rendimiento de las ratas tratadas en todas las condiciones experimentales el Día 21 después de la cirugía, en comparación con la condición del vehículo de control. Se observó una tendencia de mejora tan pronto como el Día 14 después de la cirugía. Cabe destacar que aunque solo se administraron 50 ug/kg de PanCyte lineal, los resultados son sustancialmente equivalentes a diez veces tanto con TXA127MR como con PanCyte.

Colocación de miembros delanteros (Evaluación antes de la operación, Día 14, Día 21, Día 28, Día 35, Día 42 y Día 49)

Para la prueba de colocación de miembros delanteros, la rata se mantuvo cerca de la parte superior de una mesa y se puntuó la capacidad de la rata para colocar el miembro delantero sobre la parte superior de la mesa en respuesta a una estimulación de bigotes, visual, táctil o propioceptiva (0 = normal, 12 = deteriorado al máximo). Se proporcionaron puntuaciones en aumentos de medios puntos de la siguiente (véase a continuación). Típicamente, hay una recuperación lenta y estable del comportamiento de colocación de miembros durante el primer mes después del ictus. La Figura 6 muestra que se observó una mejora significativa en el rendimiento en todas las condiciones de tratamiento, en comparación con el control de vehículo, comenzando el Día 14 y continuando hasta la duración del estudio. Parece de nuevo que el grupo de PanCyte lineal tuvo el mejor rendimiento, particularmente desde el Día 35 en adelante, a pesar de que se expuso a una dosis mucho más baja de agente que los otros grupos experimentales.

Balaceo del cuerpo (Evaluación antes de la operación, Día 14, Día 21, Día 28, Día 35, Día 42 y Día 49)

Cada rata se mantuvo aproximadamente a 1 pulgada de la base de su cola. Después se elevó a una pulgada por encima de una superficie de una mesa. La rata se mantuvo en el eje vertical, definido como no más de 10° al lado izquierdo o al lado derecho. Se registró un balanceo cuando la rata movió su cabeza fuera del eje vertical a cualquier lado. Antes de intentar otro balanceo, la rata debe regresar a la posición vertical para que el siguiente balanceo se cuente. Se contaron veinte (20) balanceos totales. Una rata normal tiene típicamente un número igual de balanceos a cada lado. Después de la isquemia focal, la rata tiende a balancearse al lado contralateral (lado izquierdo en este caso). Las puntuaciones de balanceo del cuerpo se expresan como un porcentaje de balanceos totales sobre la derecha. A menudo, existe una recuperación parcial espontánea de puntuaciones de balanceo del cuerpo (hacia el 50%) durante el primer mes después del ictus. La Figura 7 muestra que los grupos de 1.000 µg/kg de TXA127, TXA Alzet, PanCyte Alzet, 500 µg/kg de PanCyte, y PanCyte lineal muestran todos una mejora significativa del rendimiento el Día 28, en comparación con el control de vehículo. El grupo de 500 µg/kg de TXA127 no mostró resultados significativos hasta el Día 35. Los grupos de 1.000 µg/kg de TXA127, TXA Alzet, PanCyte Alzet, y PanCyte lineal mostraron todos una mejora el Día 21, y todos los grupos experimentales mostraron una tendencia hacia la mejora el Día 14. El Día 49, cada uno de los grupos de TXA 1.000 g/kg de TXA Alzet, y PanCyte lineal parecían actuar a un nivel casi normal (sin lesión).

Evaluación de mNRS (Evaluación antes de la operación, Día 1, Día 14, Día 21, Día 28, Día 35, Día 42 y Día 49)

La Escala de clasificación neurológica modificada (mNRS) se administró por un individuo que desconocía el fármaco/dosis administrada (prueba ciega). La mNRS según se administró permite una neuro-puntuación en una escala de 0 a 18 puntos posibles. Los animales con puntuaciones más altas mostraron más síntomas graves y discapacidad que las ratas de puntuaciones más bajas. La Figura 8 muestra que cada grupo experimental mostró una mejora significativa del rendimiento el Día 14, en comparación con el control de vehículo. El aumento del rendimiento observado se mantuvo en toda la duración estudio.

Estos resultados muestran que TXA127, PanCyte y PanCyte lineal son todos candidatos terapéuticos fuertes con la capacidad de mejorar drásticamente el rendimiento de los animales después de un ictus. Además de los beneficios de rendimiento analizados anteriormente, el flujo de sangre y el diámetro de los vasos sanguíneos se midió usando Láser Doppler, de acuerdo con protocolos conocidos, en cada grupo diferente de Alzet el Día 50. Los resultados se muestran en la Figura 9 y muestran que los animales en todos los grupos de tratamiento evaluados mostraron un aumento significativo de los vasos sanguíneos y el flujo de sangre en comparación con los animales de control el Día 50. En particular, PanCyte lineal parece tener un potencial terapéutico significativamente mejorado incluso más

allá de los otros tratamientos eficaces sometidos a prueba en este ejemplo. Estos resultados son particularmente sorprendentes puesto que la única diferencia entre PanCyte y PanCyte lineal parece ser que PanCyte está ciclado, mientras que PanCyte lineal no. Se cree típicamente que la ciclación de un péptido permite que un péptido sea más eficaz *in vivo* al hacerlo más resistente a la degradación de proteasas. Sin embargo, PanCyte lineal es casi igualmente eficaz a una dosis inferior de 50 µg/kg (en comparación con 500 µg/kg de PanCyte) en este ejemplo.

Ejemplo 3. Comparación de la administración de PanCyte y AVE0991

El modelo animal, los procedimientos quirúrgicos y los procedimientos y condiciones de cuidado de los animales fueron como se ha descrito para el Ejemplo 1, a menos que se especifique de otro modo. En este ejemplo, se usaron un total de 75 animales, y la Tabla 3 muestra la asignación de grupos para este estudio:

Tabla 3 - Asignación de grupos

Grupo	Tratamiento	Dosis	Duración del tratamiento (días)	Ratas totales
1	Vehículo	0	28	15
2	PanCyte	50 µg/kg	28	15
3	AVE0991	50 µg/kg	28	15
4	AVE0991	500 µg/kg	28	15
5	AVE0991	Sonda nasogástrica 10 mg/kg	28	15

Los animales se sujetaron a una Escala de clasificación neurológica modificada (mNRS) a las 24 horas post-reperusión. Solamente se incluyeron en este estudio los animales con una puntuación total de ≥ 10 . Los animales se asignaron a grupos de ensayo, de acuerdo con los resultados del la mNRS el día 2, con el propósito de tener una distribución similar de la actuación de las ratas entre los grupos. A partir del día 2, 24 horas después de la cirugía, los animales en los Grupos 2, 3 y 4 recibieron PanCyte o AVE0991 administrados por vía subcutánea mediante inyección diaria. Los animales en el Grupo 5 recibieron AVE0991 administrado por sonda nasogástrica dos veces al día y los animales en el Grupo 1 (control de vehículo) se trataron con vehículo administrado por vía subcutánea mediante inyección diaria.

Prueba de marcha (Evaluación antes de la operación, Día 15, Día 22, y Día 29)

Los animales se sometieron a pruebas para determinar la acinesia de los miembros delanteros en una prueba de marcha (ST). El animal se mantuvo con sus miembros posteriores fijos con una mano y el miembro delantero sin supervisar con la otra, mientras que la pata delantera no restringida toca la mesa. El número de pasos de ajuste se cuentan mientras que el animal se mueve lateralmente a lo largo de la superficie de la mesa (85 cm en aproximadamente cinco segundos), en la dirección de la pata delantera y la pata posterior para ambos miembros delanteros. La Figura 10 muestra que el tratamiento con PanCyte y AVE0991 dio como resultado una mejora significativa el día 22 y continúa hasta el día 29, con una tendencia hacia la mejora que se hizo evidente el día 15 en comparación con el control de vehículo.

Colocación de miembros delanteros (Evaluación antes de la operación, Día 15, Día 22, y Día 29)

Para la prueba de colocación de miembros delanteros, la rata se mantuvo cerca de la parte superior de una mesa y se puntuó la capacidad de la rata para colocar el miembro delantero sobre la parte superior de la mesa en respuesta a una estimulación de bigotes, visual, táctil o propioceptiva (0 = normal, 12 = deteriorado al máximo). Se proporcionaron puntuaciones en aumentos de medios puntos de la siguiente (véase a continuación). Típicamente, hay una recuperación lenta y estable del comportamiento de colocación de miembros durante el primer mes después del ictus. La Figura 11 muestra que el tratamiento con PanCyte y AVE0991 dio como resultado una mejora significativa en el rendimiento el día 22 y hasta el día 29, en comparación con el control de vehículo. Cabe apreciar que los animales que recibieron 50 mkg de AVE0991 mostraron una mejora estadísticamente significativa del rendimiento el día 15, mientras que los otros grupos, incluyendo diez veces más AVE0991 (500 mkg), mostraron solo una tendencia hacia la mejoría.

Balanceo del cuerpo (Evaluación antes de la operación, Día 15, Día 22, y Día 29)

Cada rata se mantuvo aproximadamente a 1 pulgada de la base de su cola. Después se elevó a una pulgada por encima de una superficie de una mesa. La rata se mantuvo en el eje vertical, definido como no más de 10° al lado izquierdo o al lado derecho. Se registró un balanceo cuando la rata movió su cabeza fuera del eje vertical a cualquier

lado. Antes de intentar otro balanceo, la rata debe regresar a la posición vertical para que el siguiente balanceo se cuente. Se contaron veinte (20) balanceos totales. Una rata normal tiene típicamente un número igual de balanceos a cada lado. Después de la isquemia focal, la rata tiende a balancearse al lado contralateral (lado izquierdo en este caso). Las puntuaciones de balanceo del cuerpo se expresan como un porcentaje de balanceos totales sobre la derecha. La Figura 12 muestra que el tratamiento con PanCyte o AVE0991 (por sonda nasogástrica) mostró una mejora significativa el día 22, en comparación con el control de vehículo. El AVE0991 administrado por vía subcutánea mostró una tendencia hacia la mejora el día 22.

Evaluación de mNRS (Evaluación antes de la operación, Día 2, Día 15, Día 22, y Día 29)

10

La Escala de clasificación neurológica modificada (mNRS) se administró por un individuo que desconocía el fármaco/dosis administrada (prueba ciega). La mNRS según se administró permite una neuro-puntuación en una escala de 0 a 18 puntos posibles. Los animales con puntuaciones más altas mostraron más síntomas graves y discapacidad que las ratas de puntuaciones más bajas. La Figura 13 muestra que la administración de PanCyte y

15

AVE0991 (mediante sonda nasogástrica) dio como resultado una mejora significativa del rendimiento el día 22, mientras que AVE0991 administrado por vía subcutánea tendió a una mejora en comparación con el control de vehículo. Para el día 29, todos los grupos de tratamiento presentaron un rendimiento significativamente mejorado en comparación con el control de vehículo. Todos los grupos de tratamiento mostraron una tendencia hacia la mejora desde el día 15.

20

Este Ejemplo muestra que AVE0991 es también un fuerte candidato terapéutico para el tratamiento del ictus, proporcionando un beneficio significativo para los sujetos en recuperación dentro de las 2-3 semanas de tratamiento.

EQUIVALENTES Y ALCANCE

25

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. El alcance de la presente invención no está destinado a limitarse a la Descripción anterior, sino que se expone en las siguientes reivindicaciones:

30

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de angiotensina (1-7), que es un péptido de siete aminoácidos de origen natural de la secuencia Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ (SEQ ID NO:1), para su uso en un método para tratar ictus que comprende administrar, a un sujeto que padece o es susceptible a ictus, dicho péptido de angiotensina (1-7) a través de una vía de administración intravenosa o subcutánea.
2. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ictus es ictus isquémico.
3. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ictus es ictus hemorrágico.
4. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ictus es una combinación de ictus isquémico y hemorrágico.
5. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido de angiotensina (1-7) no se administra por vía intracerebroventricular.
6. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido de angiotensina (1-7) se administra por infusión continua.
7. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido de angiotensina (1-7) se administra una vez al día.
8. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 1-1.000 µg/kg/día.
9. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 50-500µg/kg/día.
10. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido de angiotensina (1-7) se administra a una dosis eficaz que varía de aproximadamente 1-60µg/kg/día.
11. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido de angiotensina (1-7) comprende una o más modificaciones químicas para aumentar la resistencia a la proteasa, la estabilidad del suero y/o la biodisponibilidad.
12. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la una o más modificaciones químicas comprenden pegilación.

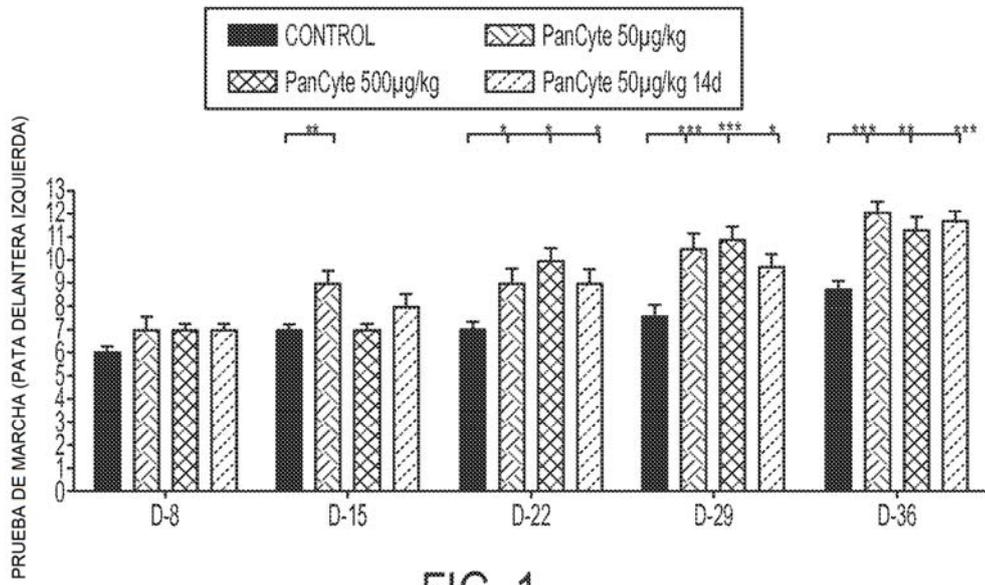


FIG. 1

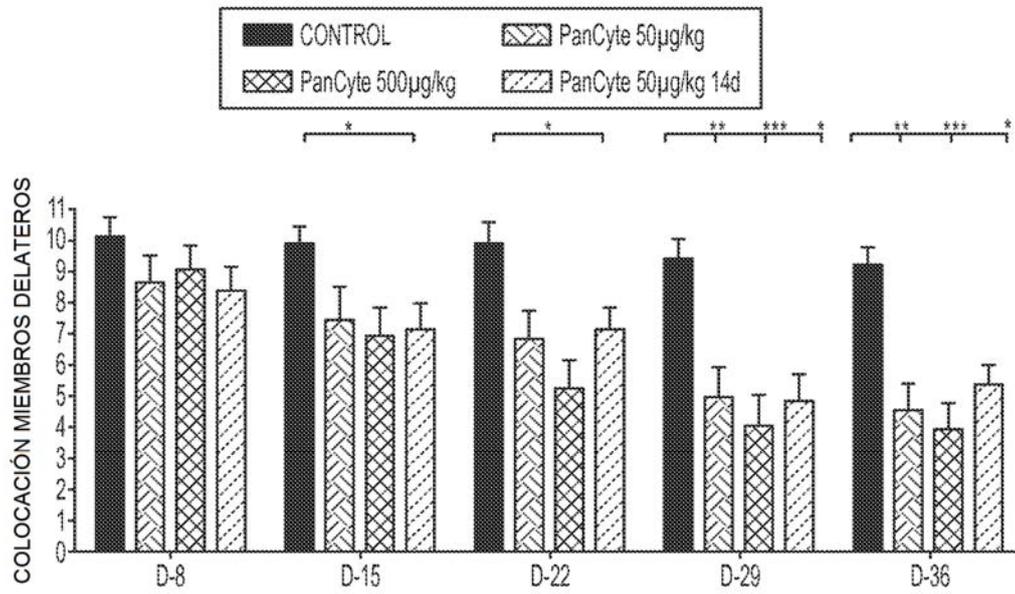


FIG. 2

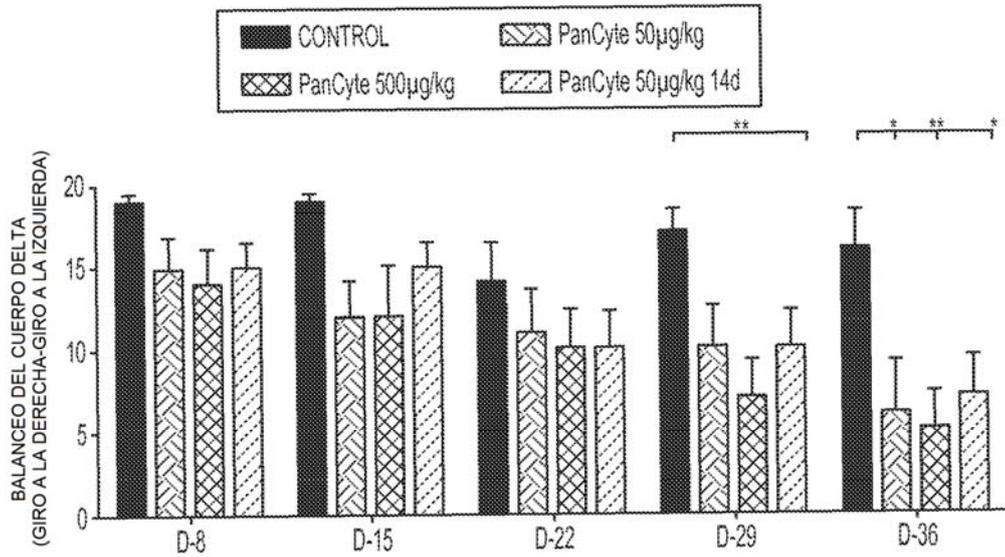


FIG. 3

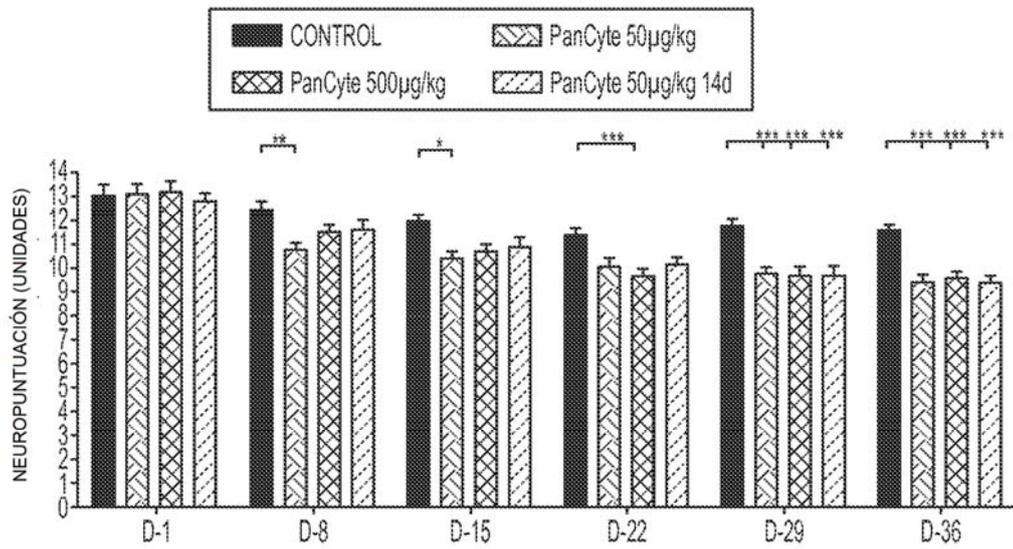


FIG. 4

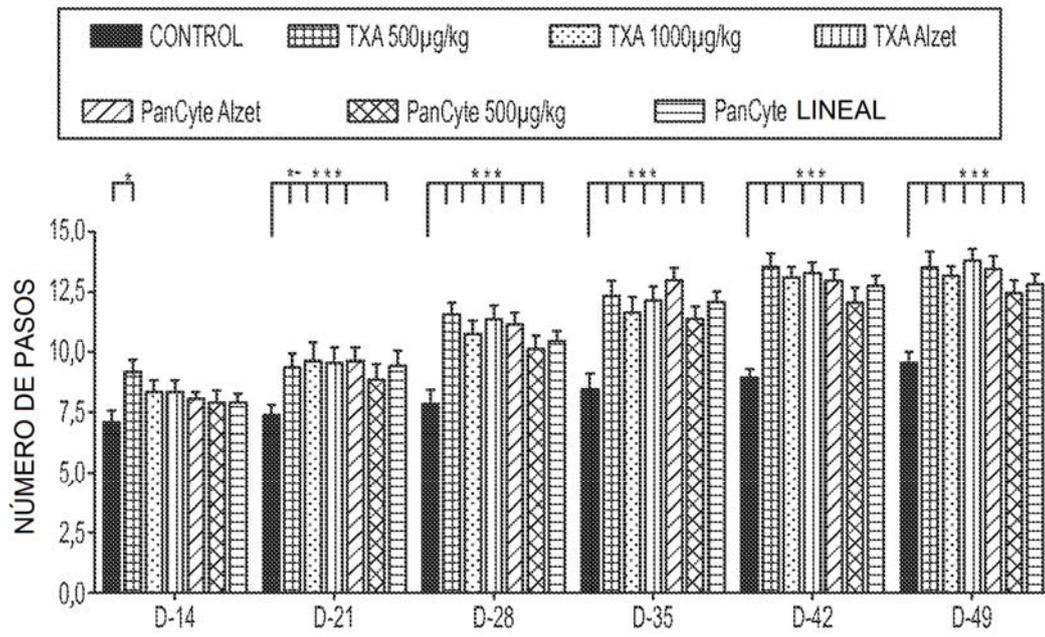


FIG. 5

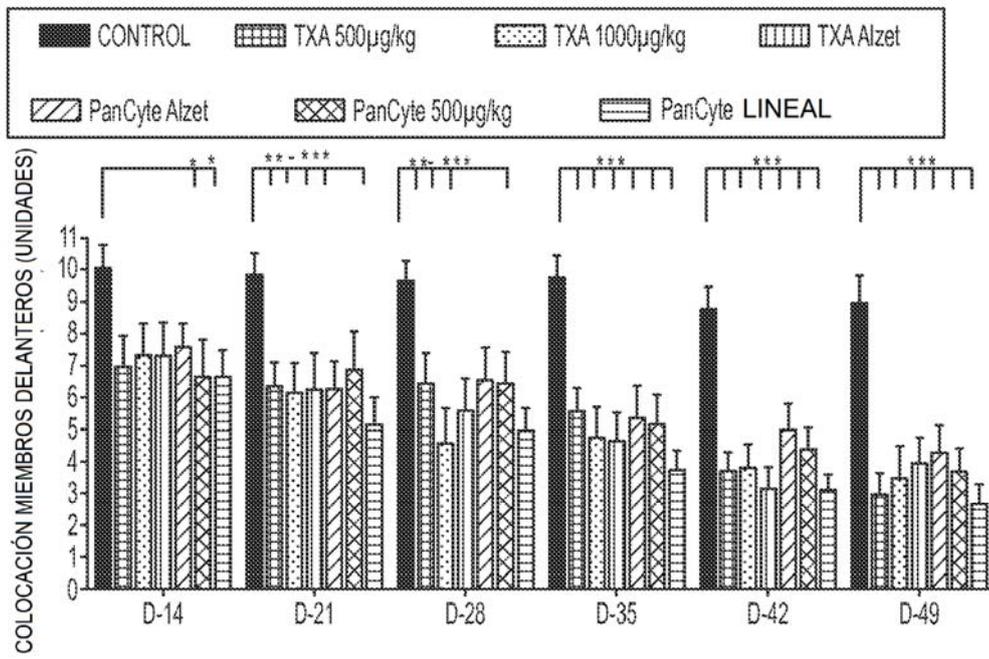


FIG. 6

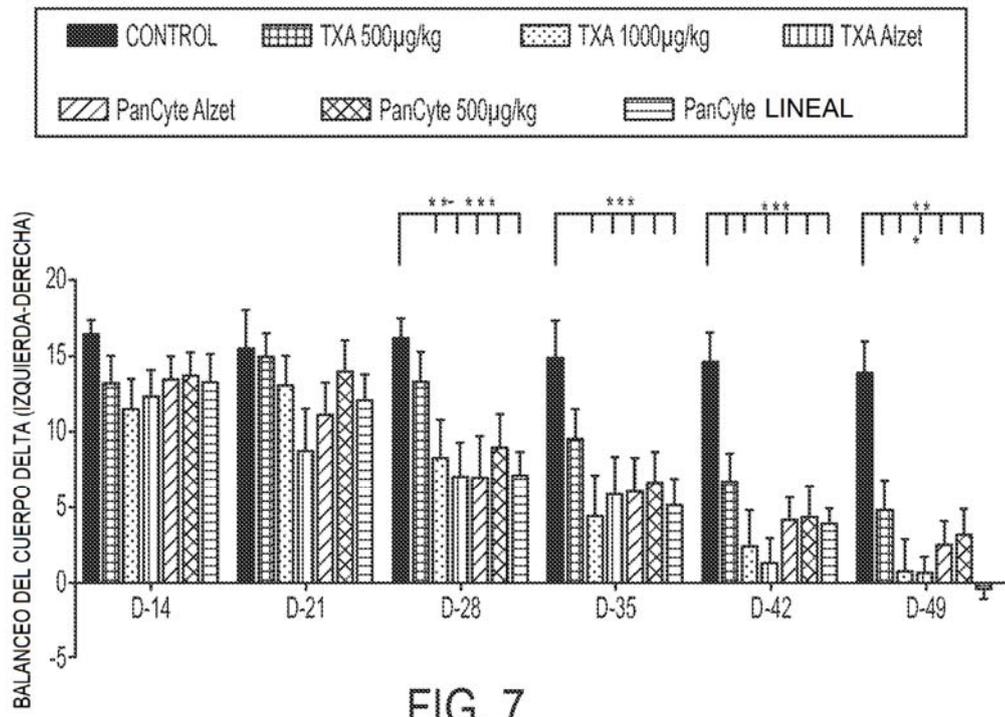


FIG. 7

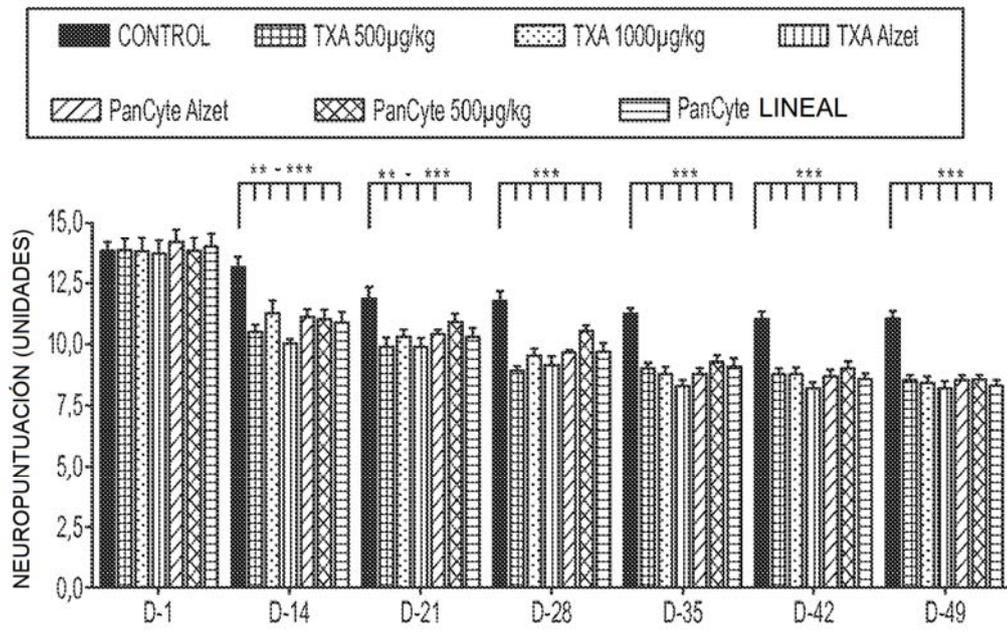


FIG. 8

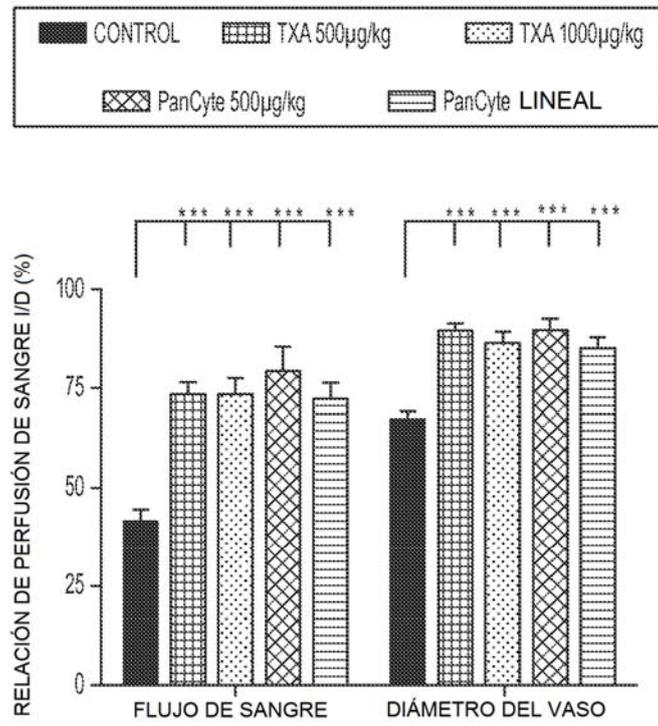


FIG. 9

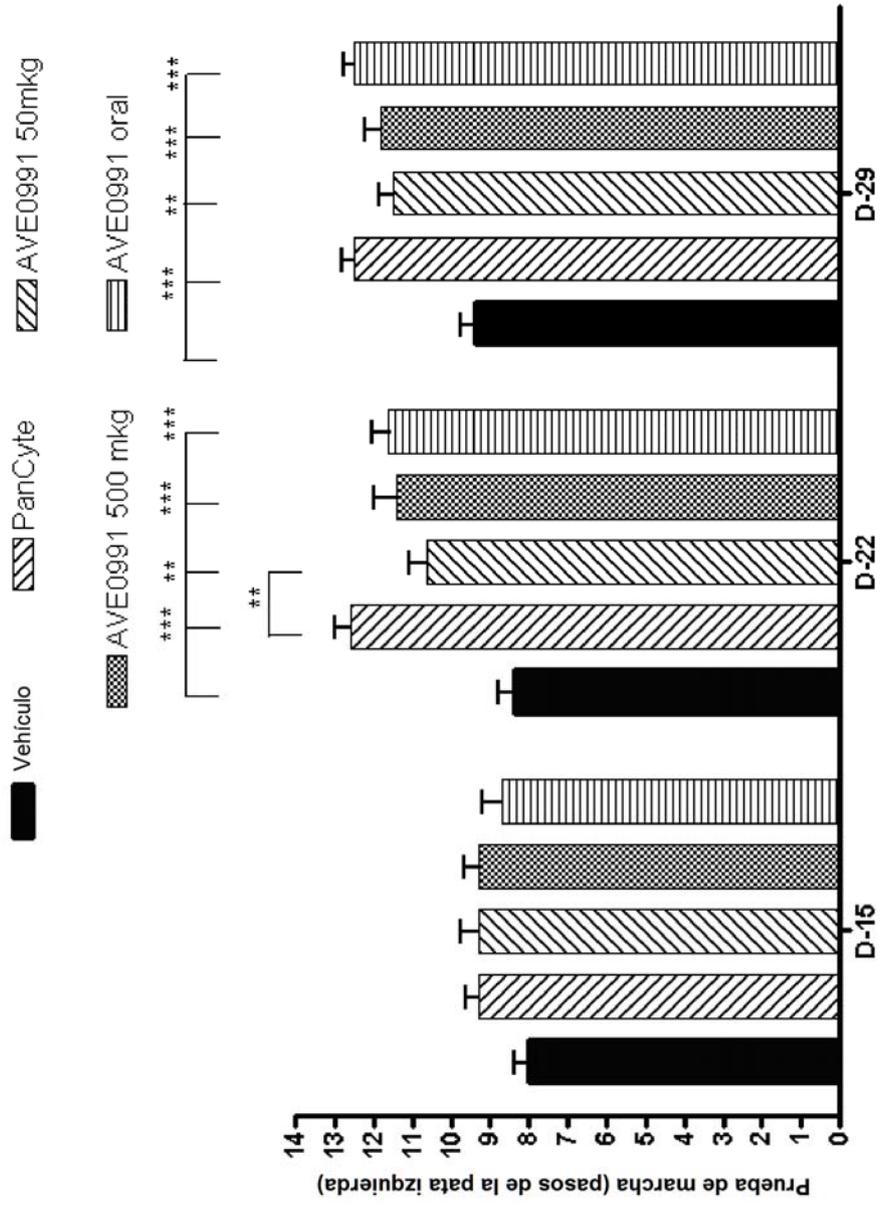


FIG. 10

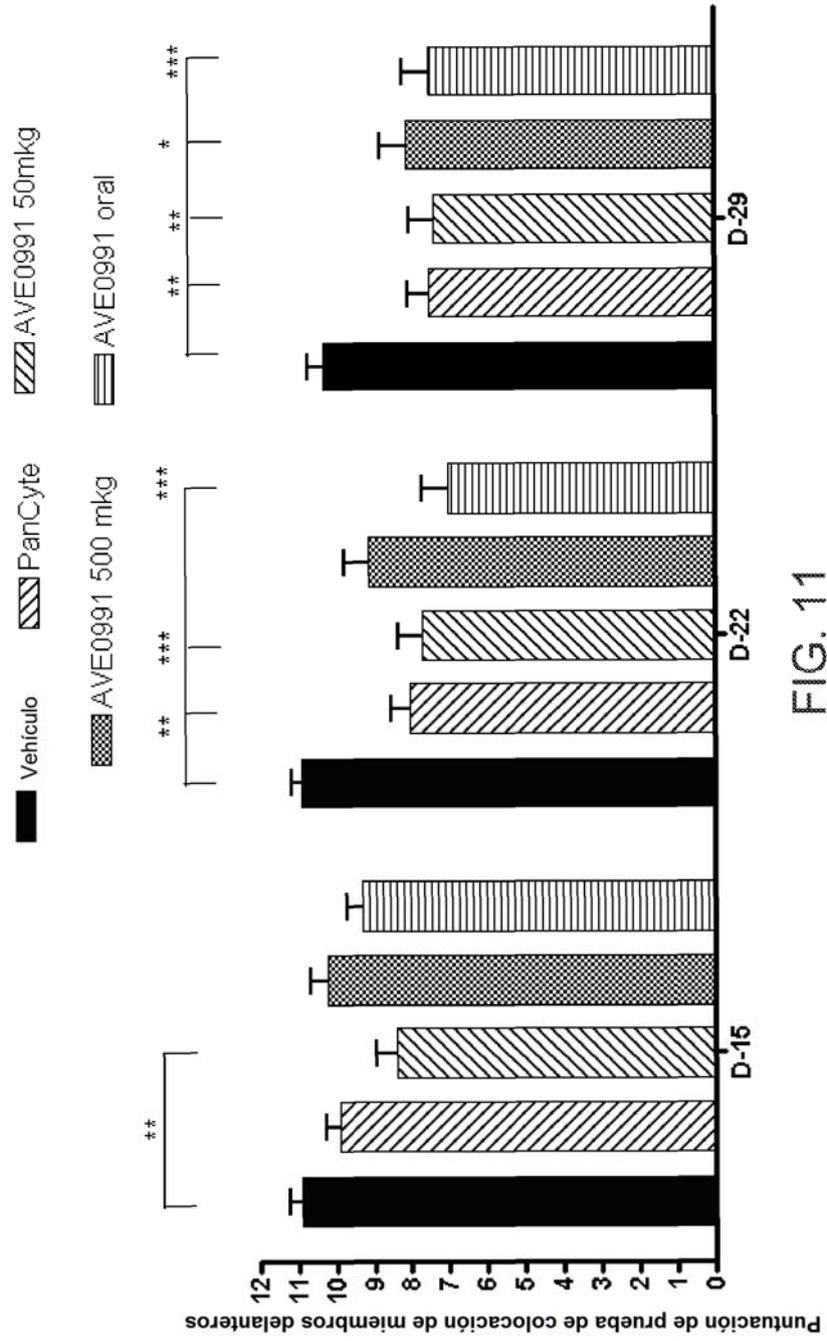


FIG. 11

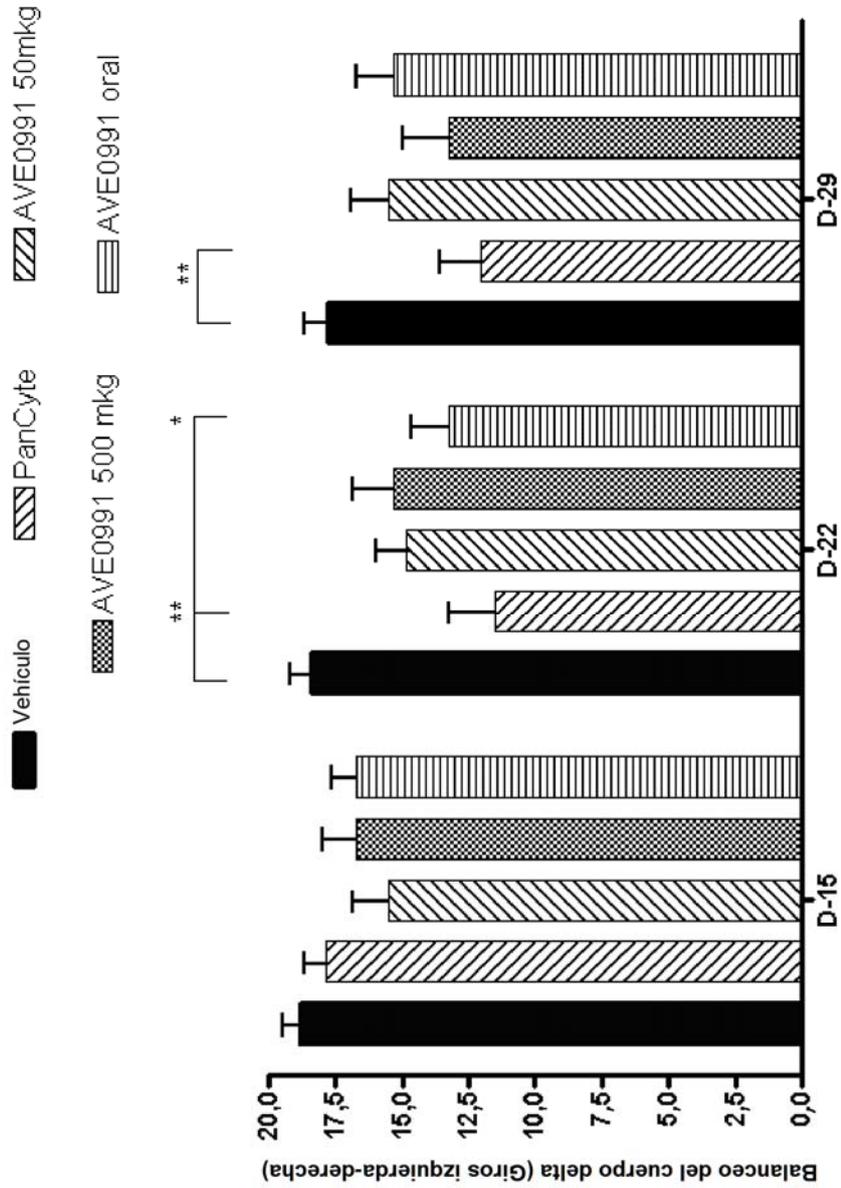


FIG. 12

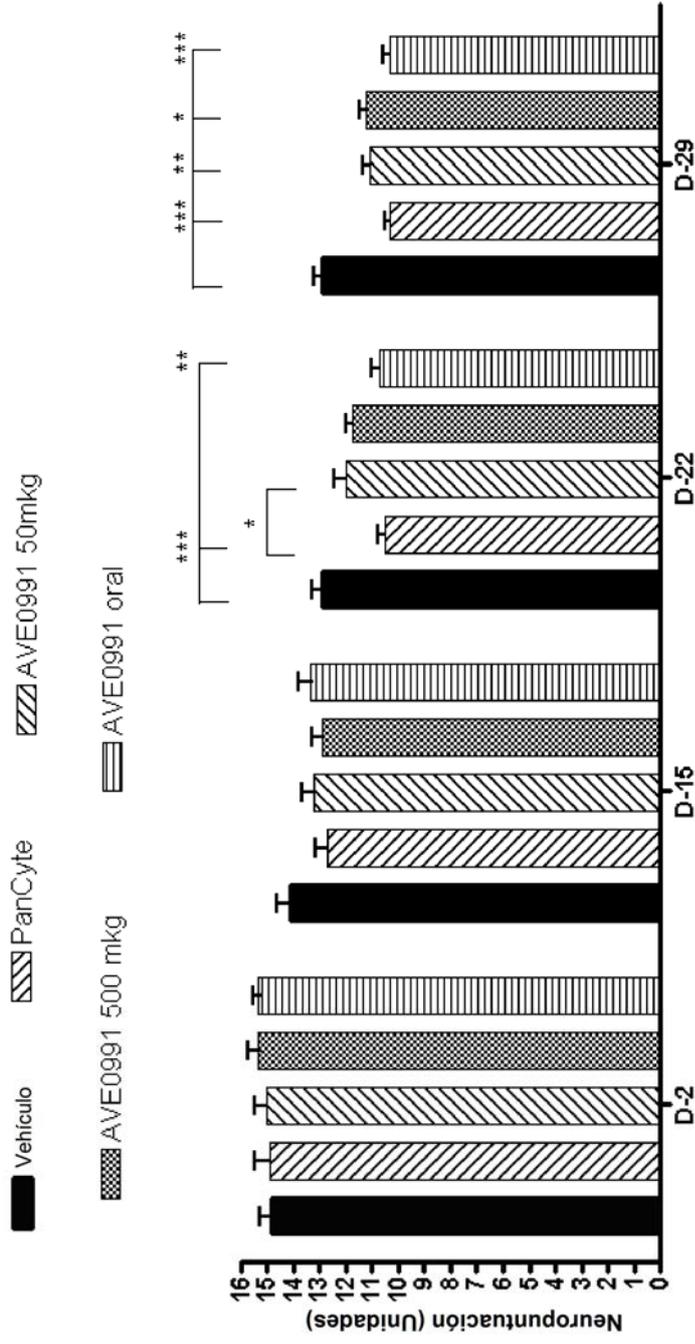


FIG. 13