

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 994**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/49 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61M 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2012 PCT/IB2012/053178**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12176172**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2012 E 12802409 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2723363**

54 Título: **Terapia de combinación para isquemia**

30 Prioridad:

24.06.2011 US 201161501117 P

28.03.2012 US 201261617001 P

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

23.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TYMIANSKI, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 690 994 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

Terapia de combinación para isquemia

Antecedentes

5 La apoplejía isquémica es una causa común de muerte y discapacidad grave y está habitualmente causada por un bloqueo en un vaso sanguíneo que conduce a o dentro de la cavidad intracraneal y/o el cerebro. Están disponibles pocos tratamientos eficaces. Un tratamiento consiste en retirar el bloqueo dentro del vaso sanguíneo en cuestión. Otros tratamientos consisten en alterar las presiones de perfusión dentro del cerebro aumentando la presión sanguínea al cerebro. El bloqueo de vasos sanguíneos puede retirarse usando un intervalo de dispositivos mecánicos, o usando "agentes disolventes de coágulos" que se suministran por vía intravenosa o intraarterial. Entre tales agentes disolventes de coágulos está el factor de plasminógeno de tejido (tPA), un agente trombolítico que se administra a algunos sujetos de apoplejía para disolver émbolos que causan la isquemia y restaurar por tanto el flujo sanguíneo al cerebro, y tPA recombinantes tales como alteplasa, reteplasa y tenecteplasa. Otros fármacos trombolíticos que degradan coágulos incluyen estreptocinasa, urocinasa y desmotaplasa. Entre los dispositivos de reperfusión mecánica, están los catéteres infraarteriales, balones, prótesis endovasculares y diversos dispositivos de recuperación de coágulo, tales como el catéter de reperfusión del Penumbra System. Entre los tratamientos que alteran las presiones de perfusión en el cerebro están los dispositivos que aumentan la presión arterial en el cerebro, tales como balones que pueden inflarse en las arterias extracerebrales tales como la aorta, desviando así el flujo de sangre de otras áreas del cuerpo y aumentando la perfusión arterial cerebral, tal como el dispositivo de catéter CoAxia NeuroFlo™. Colectivamente, estas estrategias pueden considerarse como agentes médicos y mecánicos que potencian la perfusión cerebral en el inicio de la isquemia cerebral o después (de aquí en adelante colectivamente "terapias de reperfusión").

Aunque el tPA y otras terapias de reperfusión administradas poco después del inicio de la isquemia son eficaces en la reducción de la muerte o discapacidad por apoplejía isquémica, menos de aproximadamente un 3 % de los sujetos que presentan apoplejía son tratados con tPA u otras terapias de reperfusión. El bajo uso de tPA y otras terapias de reperfusión es debido en parte al riesgo de muerte si se administran a un paciente que tiene o que está en riesgo elevado de padecer una hemorragia cerebral. La apoplejía puede ser el resultado de isquemia o hemorragia. Demasiado a menudo, el tiempo requerido para llevar el sujeto a un hospital, llegar a un diagnóstico inicial y efectuar un examen cerebral para distinguir entre apoplejía isquémica y hemorrágica pondría al sujeto fuera de la ventana en que el tPA u otras terapias de reperfusión pueden ser eficaces. Por tanto, muchos sujetos de apoplejía isquémica que podrían beneficiarse del tPA u otras terapias de reperfusión no reciben tal tratamiento.

Está ahora en ensayos clínicos una forma diferente de tratamiento para apoplejía y afecciones relacionadas (véanse los documentos WO 2010144721 y Aarts et al., Science 298, 846-850 (2002)). Este tratamiento usa Tat-NR2B9c (NA-1), un agente que inhibe PSD-95, desestabilizando por tanto la unión a receptores de D-aspartato de N-metil (NMDAR) y óxido nítrico sintasas neuronales (nNOS) y reduciendo la excitotoxicidad inducida por isquemia cerebral. El tratamiento reduce el tamaño del infarto y los déficits funcionales.

Breve descripción de las figuras

Figuras 1A, B, C y D: Descripción del protocolo para dosificar primates no humanos (PNH; A), y gráficas de los volúmenes de difusión resultantes en IRM indicando las áreas de daño. B. IPD de IRM 48 horas después del inicio de una apoplejía de 4,5 horas. C. Volumen a T2 48 horas después del inicio de una apoplejía de 4,5 horas. D. Volumen a T2 7 días después del inicio de una apoplejía de 4,5 horas.

Figuras 2A, B. A. Se sometieron los animales a una OACM de 4,5 horas y se trataron durante 5 min con Tat-NR2B9c o placebo. Curso temporal del aumento de la hiperintensidad de IPD después de OACM en animales tratados y de control. B. Imágenes de perfusión e IRM del cerebro en diferentes puntos temporales.

Figura 3. Evolución temporal de la discordancia de penumbra en animales con placebo o Tat-NR2B9c.

45 **Figuras 4A, B.** El Tat-NR2B9c reduce el agotamiento de ATP intracelular y protege las neuronas corticales de ratón frente a la citotoxicidad inducida por privación de oxígeno y glucosa (POG). (A) Fracción de muerte celular medida 20 horas después de la POG mediante el método de marcaje con yoduro de propidio. (B) Concentración de ATP intracelular de neuronas corticales determinada mediante un ensayo de detección de ATP quimioluminiscente, expresada como % de concentración de ATP respecto a muestras de control normotóxicas.

50 **Figura 5:** Demostración de que el NA-1 (Tat-NR2B9c), cuando se administra como una única dosis después de una apoplejía, puede detener el desarrollo de lesiones en el cerebro como se valora por toma de imágenes de resonancia magnética (IRM). Esta eficacia no actúa mediante la modificación del flujo sanguíneo cerebral.

55 **Figura 6:** A: Volúmenes de defectos de perfusión basales. B: Análisis de volúmenes de apoplejía medidos por IPD y toma de imágenes a T2 durante 30 días. C: Imágenes potenciadas en T2 representativas de apoplejías provocadas en animales tratados con placebo y fármaco 24 h después de la OACM. D: Secciones histológicas en serie representativas de animales tratados con NA-1 (Tat-NR2B9c) y placebo a los 30 días teñidas con hematoxilina y

eosina. E. Volúmenes de apoplejía calculados usando volúmenes de IPD de 24 h y volúmenes potenciados en T2 de 30 días. F. NHPSS durante el periodo de observación de 30 días.

5 **Figuras 7A-F:** A: Volumen de defectos de perfusión. B: Volúmenes de apoplejía medidos por IPD e IRM a T2 durante 7 días. C: Volúmenes de apoplejía por IPD e IRM potenciadas en T2 de 48 horas e IRM potenciadas en T2 de 7 días normalizadas a cada déficit de perfusión inicial del animal. D: IRM de 7 días representativa. E: Histología de 7 días representativa. F: Puntuaciones de NHPSS durante el periodo de observación de 7 días.

10 **Figuras 8A-F:** A: Volumen de defectos de perfusión. B: Volúmenes de apoplejía medidos por IPD e IRM a T2 durante 14 días. C: Volúmenes de apoplejía de IPD e IRM potenciadas en T2 de 48 h e IRM potenciadas en T2 de 14 días normalizadas al déficit de perfusión inicial de cada animal. D: IRM de 14 días representativa. E: Histología de 14 días representativa. F: Puntuaciones de NHPSS durante el periodo de observación de 14 días.

Figuras 9A, B: A: Gráfica que muestra la relación de coimmunoprecipitación de PSD-95:NMDAR entre los hemisferios ipsilateral y contralateral de ratas después de apoplejía y tratamiento con NA-1 (Tat-NR2B9c). B: Inmunotransferencias de ejemplo que muestran la cantidad de NMDAR inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-PSD-95 en presencia de diversas concentraciones de NA-1 o controles.

15 **Figura 10:** Gráfica que muestra la relación de coimmunoprecipitación de PSD-95:NMDAR entre los hemisferios ipsilateral y contralateral de ratas en diferentes puntos temporales después de apoplejía y tratamiento con NA-1 (Tat-NR2B9c).

Figura 11: Áreas de infarto en cerebros de rata 24 horas después de someterse a una apoplejía y tratarse con diversas combinaciones y tiempos de dosificación de tPA y NA-1 (Tat-NR2B9c).

20 Compendio de la invención reivindicada

La invención proporciona la materia en cuestión como se define en las reivindicaciones.

Se divulga un método de tratamiento de un efecto dañino de la isquemia sobre el sistema nervioso central, que comprende administrar un inhibidor de PSD-95 a un sujeto que tiene o está en riesgo de isquemia y efectuar terapia de reperfusión en el sujeto, en el que el inhibidor de PSD-95 y la terapia de reperfusión tratan un efecto dañino de la isquemia sobre el sistema nervioso central del sujeto. Opcionalmente, se administra el inhibidor de PSD-95 antes de efectuar la terapia de reperfusión. Opcionalmente, se administra el inhibidor de PSD-95 a un sujeto en riesgo de isquemia antes del inicio de la isquemia y se efectúa la terapia de reperfusión después de inicio de la isquemia. Opcionalmente, se administra el inhibidor de PSD-95 y se efectúa la terapia de reperfusión después del inicio de la isquemia. En algunos métodos, la isquemia es isquemia cerebral. En algunos métodos, el sujeto tiene una apoplejía. En algunos métodos, la isquemia es isquemia cardiaca, pulmonar o de miembro principal que afecta al sistema nervioso central al inhibir el flujo sanguíneo a o desde el SNC. En algunos métodos, se ensaya en el sujeto la presencia de isquemia cerebral y/o la ausencia de hemorragia cerebral entre la administración del agente y la práctica de la terapia de reperfusión. En algunos métodos, se valora en el sujeto la presencia o riesgo de hemorragia entre la administración del agente y la práctica de la terapia de reperfusión. En algunos métodos, la valoración incluye efectuar una TEP, TAC, IRM o revisar el historial médico del sujeto o el uso de uno o más biomarcadores que proporcionan indicación de la isquemia. En algunos métodos, el inhibidor de PSD-95 es un péptido. En algunos métodos, el agente es NA-1 (Tat-NR2B9c). En algunos métodos, se efectúa la reperfusión administrando un agente trombolítico. En algunos métodos, el agente trombolítico es un activador de plasminógeno. En algunos métodos, el agente trombolítico es tPA. En algunos métodos, la terapia de reperfusión es una reperfusión mecánica. En algunos métodos, la terapia de reperfusión se efectúa más de 3 horas después del inicio de la isquemia. En algunos métodos, la terapia de reperfusión se efectúa más de 4,5 horas después del inicio de la isquemia. En algunos métodos, la terapia de reperfusión se efectúa más de 4,5 horas y menos de 24 horas después del inicio de la isquemia. En algunos métodos, la terapia de reperfusión se efectúa después de determinar que el sujeto cumple los requisitos para reperfusión basados en la falta de un infarto completo, una penumbra isquémica y la falta de hemorragia, como se muestra por análisis de TAC, IRM o TEP. En algunos métodos, la terapia de reperfusión se efectúa al menos 12 o al menos 24 horas después de inicio de la isquemia. En algunos métodos, la terapia de reperfusión se efectúa 275-690 minutos después del inicio de la isquemia. En algunos métodos, el intervalo entre la administración de PSD-95 y la terapia de reperfusión puede ser de 30 min a 6 h. En algunos métodos, se administra un agente trombolítico mediante administración localizada en un sitio de flujo sanguíneo deficiente. En cualquiera de los métodos anteriores, el péptido u otro agente puede ligarse con un péptido de internalización o lipídarse, facilitando así el paso del péptido a través de la membrana celular o la barrera hematoencefálica. Algunos péptidos u otros agentes están miristoilados. Los péptidos están preferiblemente miristoilados en el extremo N.

Se divulga adicionalmente un método de tratamiento de una población de sujetos que presentan un signo o signos y/o síntoma o síntomas de isquemia, que comprende administrar un inhibidor de PSD-95 a los sujetos, en el que en los sujetos se analiza el riesgo inaceptable de efectos secundarios de la terapia de reperfusión, y los sujetos sin un riesgo inaceptables de efectos secundarios recibe terapia de reperfusión y los sujetos con un riesgo inaceptable de efectos secundarios no reciben terapia de reperfusión. En algunos métodos, el análisis del riesgo inaceptable de efectos secundarios incluye el análisis de la presencia o riesgo de hemorragia. En algunos métodos, los sujetos presentan un

signo o signos y/o un síntoma o síntomas de apoplejía y el análisis incluye efectuar un examen cerebral que distingue la apoplejía isquémica y la apoplejía hemorrágica, y los sujetos que tienen apoplejía isquémica reciben la terapia de reperfusión y los sujetos que tienen apoplejía hemorrágica no.

5 Se divulga un agente que inhibe la unión de PSD-95 a NMDAR 2B u otra u otras subunidades de NMDAR 2 para uso en el tratamiento de un efecto dañino de la isquemia sobre el sistema nervioso central en un sujeto que recibe también terapia de reperfusión, en el que la terapia de reperfusión y el agente tratan efectos dañinos de la isquemia sobre el sistema nervioso central.

10 Se divulga adicionalmente un agente o dispositivo para uso en terapia de reperfusión en un sujeto que recibe también un agente que inhibe la unión de PSD-95 a NMDAR 2B, 2A o nNOS, en el que la terapia de reperfusión y el agente tratan un efecto dañino de la isquemia sobre el sistema nervioso central. Opcionalmente, el dispositivo es una espiral, prótesis endovascular, balón (p. ej., balón intraaórtico, bomba) o catéter. Opcionalmente, el agente es un agente trombolítico, vasodilatador o hipertensivo.

Definiciones

15 Un "péptido quimérico" significa un péptido que tiene dos péptidos componentes no asociados naturalmente entre sí unidos entre sí como una proteína de fusión o por ligamiento químico.

Una proteína o polipéptido de "fusión" hace referencia a un polipéptido compuesto, concretamente una secuencia aminoacídica contigua única compuesta por secuencias de dos (o más) polipéptidos heterólogos distintos que no están normalmente fusionados entre sí en una única secuencia polipeptídica.

20 El término "dominio PDZ" hace referencia a un dominio de proteína modular de aproximadamente 90 aminoácidos, caracterizado por una identidad de secuencia significativa (p. ej., al menos 60 %) con la proteína sináptica cerebral PSD-95, la proteína de unión septada de *Drosophila* Discs-Large (DLG) y la proteína de unión estrecha epitelial ZO1 (ZO1). Los dominios PDZ son también conocidos como repeticiones de homología de Discs-Large ("DHR") y repeticiones de GLGF (SEQ ID NO: 7). Los dominios PDZ generalmente parecen mantener una secuencia de consenso central (Doyle, D. A., 1996, Cell 85: 1067-76). Se divulgan proteínas que contienen el dominio PDZ y secuencias del dominio PDZ ejemplares en la solicitud de EE. UU. n° 10/714.537, que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad.

30 El término "proteína PL" o "proteína ligando de PDZ" hace referencia a una proteína de origen natural que forma un complejo molecular con el dominio PDZ, o con una proteína cuyo extremo carboxi, cuando se expresa separadamente de la proteína completa (p. ej., como un fragmento peptídico de 3-25 residuos, p. ej., 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 14 o 16 residuos) forma tal complejo molecular. El complejo molecular puede observarse *in vitro* usando el "ensayo A" o "ensayo G" descritos, p. ej., en el documento US 20060148711, o *in vivo*.

El término "receptor de NMDA" o NMDAR" hace referencia a una proteína asociada a membrana que es conocida por interaccionar con NMDA, incluyendo las diversas formas de subunidad descritas a continuación. Tales receptores pueden ser humanos o no humanos (p.ej. de ratón, rata, conejo y mono).

35 Un "motivo PL" hace referencia a la secuencia aminoacídica del extremo C de una proteína PL (p.ej. los 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 20 o 25 residuos contiguos C-terminales) ("secuencia PL C-terminal") o a una secuencia interna conocida por unirse a un dominio PDZ ("secuencia PL interna").

Un "péptido PL" es un péptido que comprende o consiste o está basado de otro modo en un motivo PL que se une específicamente a un dominio PDZ.

40 Los términos "aislado" o "purificado" significan que la especie en cuestión (p. ej., un péptido) se ha purificado de contaminantes que están presentes en una muestra, tal como una muestra obtenida de fuentes naturales que contienen la especie en cuestión. Si una especie en cuestión se aísla o purifica, es la especie macromolecular (p. ej., polipeptídica) predominante presente en una muestra (concretamente, en base molar, es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente la especie en cuestión comprende al menos aproximadamente un 50 % (en base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición aislada, purificada o sustancialmente pura comprende más de 80 a 90 % de todas las especies macromoleculares presentes en una composición. Lo más preferiblemente, la especie en cuestión se purifica esencialmente hasta homogeneidad (concretamente, no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales), en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular. El término aislado o purificado no excluye necesariamente la presencia de otros componentes que se pretende que actúen en combinación con una especie aislada. Por ejemplo, un péptido de internalización puede describirse como aislado a pesar de que esté ligado a un péptido activo.

55 Un "peptidomimético" hace referencia a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales que un péptido consistente en aminoácidos naturales. El peptidomimético puede contener análogos no naturales enteramente sintéticos de aminoácidos, o puede ser una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El

peptidomimético puede incorporar también cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales siempre que tales sustituciones no alteren sustancialmente tampoco la estructura y/o actividad inhibitoria y/o de unión del mimético. Las composiciones miméticas de polipéptido pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son típicamente de tres grupos estructurales: a) grupos de enlace de residuos distintos de los grupos de enlace de enlace amida natural (“enlace peptídico”); b) residuos no naturales en lugar de residuos aminoacídicos de origen natural o c) residuos que inducen una mimesis estructural secundaria, concretamente inducen o estabilizan una estructura secundaria, p. ej. una conformación de giro beta, giro gamma, lámina beta, hélice alfa y similares. En un peptidomimético de un péptido quimérico que comprende un péptido activo y un péptido de internalización, tanto el resto activo como el resto de internalización o ambos pueden ser un peptidomimético.

El término “unión específica” hace referencia a la unión entre dos moléculas, por ejemplo un ligando y un receptor, caracterizada por la capacidad de una molécula (ligando) de asociarse con otra molécula específica (receptor) incluso en presencia de muchas otras moléculas diversas, concretamente muestra unión preferencial de una molécula con otra en una mezcla heterogénea de moléculas. La unión específica de un ligando a un receptor se evidencia también por la unión reducida de un ligando marcado detectablemente al receptor en presencia de ligando no marcado en exceso (concretamente, un ensayo de unión competitiva).

La excitotoxicidad es el proceso patológico mediante el cual se dañan las neuronas y se matan por la sobreactivación de receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato, tales como los receptores de NMDA, p. ej. receptores de NMDA que portan la subunidad NMDAR 2B.

El término “sujeto” incluye seres humanos y animales de veterinaria, tales como mamíferos, así como modelos animales de laboratorio, tales como ratones o ratas usados en estudios preclínicos.

El término “agente” incluye cualquier compuesto que incluya compuestos con o sin actividad farmacéutica, compuestos naturales, compuestos sintéticos, moléculas pequeñas, péptidos y peptidomiméticos. Un inhibidor de PSD-95 es un agente que inhibe PSD-95 como se describe adicionalmente a continuación.

La expresión “agente farmacológico” significa un agente que tiene una actividad farmacológica. Los agentes farmacológicos incluyen compuestos que son fármacos conocidos, compuestos para los que se ha identificado actividad farmacológica, pero que están experimentando evaluación terapéutica adicional en modelos animales o ensayos clínicos. Un agente quimérico comprende un agente farmacológico ligado con un péptido de internalización. Un agente puede describirse por tener actividad farmacológica si exhibe actividad en un sistema de cribado que indica que el agente activo es o puede ser útil en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad. El sistema de cribado puede ser *in vitro*, celular, animal o humano. Los agentes pueden describirse por tener actividad farmacológica a pesar de que pueda requerirse ensayo adicional para establecer la utilidad profiláctica o terapéutica real en el tratamiento de una enfermedad.

Un péptido tat significa un péptido que comprende o consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID NO:1), en que no se eliminan, sustituyen o insertan en la secuencia más de 5 residuos, que retiene la capacidad de facilitar la incorporación de un péptido ligado u otro agente a células. Preferiblemente, cualquier cambio aminoacídico son sustituciones conservativas. Preferiblemente, cualquier sustitución, deleción o inserción interna en el agregado deja el péptido con una carga catiónica neta, preferiblemente similar a la de la secuencia anterior. Esto puede lograrse no sustituyendo ni eliminando un número significativo de residuos R y K. Los aminoácidos de un péptido tat pueden derivatizarse con biotina o molécula similar para reducir la respuesta inflamatoria.

La coadministración de un agente farmacológico significa que los agentes se administran suficientemente cercanos en el tiempo para que se presenten cantidades detectables de los agentes simultáneamente en el plasma y/o para que los agentes ejerzan un efecto de tratamiento sobre el mismo episodio de enfermedad o los agentes actúen cooperativa o sinérgicamente en el tratamiento del mismo episodio de enfermedad. Por ejemplo, un agente antiinflamatorio actúa cooperativamente con un agente que incluye un péptido tat cuando los dos agentes se administran suficientemente próximos en el tiempo de modo que el agente antiinflamatorio pueda inhibir la respuesta antiinflamatoria inducida por el péptido de internalización.

Estadísticamente significativo hace referencia a un valor de p que es <0,05, preferiblemente <0,01 y lo más preferiblemente <0,001.

Un episodio de una enfermedad significa un periodo cuando están presentes signos y/o síntomas de la enfermedad intercalado con periodos más largos flanqueantes en que los signos y/o síntomas están ausentes o presentes en una menor medida.

Descripción detallada

I. General

La presente invención proporciona una combinación para uso en el tratamiento de isquemia en el SNC o que lo afecta de otro modo, tal como apoplejía isquémica, como se define en las reivindicaciones. El tratamiento implica la

- administración de un inhibidor de PSD-95 y la práctica de una terapia de reperfusión (p.ej., mediante la administración de tPA u otro agente trombolítico, o usando un dispositivo mecánico para aumentar el flujo sanguíneo al área del SNC afectada). En el uso convencional de tPA y otras terapias de reperfusión, la eficacia baja al aumentar el tiempo desde el inicio de la isquemia y aumenta el potencial de efectos secundarios hemorrágicos. Por tanto, en el caso de tPA, esta estrategia trombolítica se considera ineficaz después de aproximadamente 3-4,5 h desde el inicio de la isquemia. La invención está basada en parte en la comprensión de que la administración de un inhibidor de PSD-95 en combinación con una terapia de reperfusión aumenta la eficacia de la terapia de reperfusión y/o retarda la rebaja de eficacia de tPA u otras terapias de reperfusión con el tiempo después del inicio de la isquemia, extendiendo por tanto la ventana en que puede administrarse tPA u otras terapias de reperfusión.
- Mientras que el tPA y otras terapias de reperfusión pueden administrarse con seguridad solo a sujetos de apoplejía conocidos por tener una apoplejía isquémica, el inhibidor de PSD-95 puede administrarse con seguridad a un sujeto con cualquier apoplejía o posible apoplejía, independientemente de si el sujeto tiene apoplejía isquémica u hemorrágica e independientemente de si el sujeto ha padecido una apoplejía en absoluto. Al administrar el inhibidor de PSD-95, hay más tiempo disponible para practicar un examen cerebral o cualquier otra prueba de diagnóstico para determinar la presencia de apoplejía isquémica, y administrar entonces tPA u cualquier otra terapia de reperfusión si es apropiado. Por tanto, más sujetos con apoplejía isquémica pueden beneficiarse del tPA u otras terapias de reperfusión y beneficiarse al mismo tiempo del tratamiento con un inhibidor de PSD-95.

II. Agentes inhibidores de PSD-95

- Los inhibidores de PSD-95 inhiben la interacción entre PSD-95 y uno o más NMDAR (p. ej., 2A, 2B, 2C o 2D) o nNOS (p. ej., Swiss-Prot P29475). La inhibición puede ser, por ejemplo, el resultado de la unión específica a PSD-95. Tales agentes son útiles para reducir uno o más efectos dañinos de la apoplejía y otras afecciones neurológicas mediadas al menos en parte por la excitotoxicidad de NMDAR. Tales agentes incluyen péptidos que tienen una secuencia aminoacídica que incluye o está basada en el motivo PL de un receptor de NMDA o dominio PDZ de PSD-95. Tales péptidos pueden inhibir también las interacciones entre PSD-95 y nNOS y otros receptores de glutamato (p. ej., receptores de kainita o receptores de AMPA) tales como KV1-4 y GluR6. Los péptidos preferidos inhiben la interacción entre los dominios de PDZ 1 y 2 de la proteína posináptica de densidad 95 (PSD-95) (secuencia aminoacídica humana proporcionada por Stathakism, Genomics 44(1): 71-82 (1997)) y la secuencia de PL C-terminal de una o más subunidades de receptor 2 de NMDA, incluyendo la subunidad NR2B del receptor de D-aspartato de N-metiló neuronal (Mandich et al., Genomics 22, 216-8 (1994)). El NMDAR2B tiene una GenBank ID 4099612, un FNGSSNGHVYEKLSIESDV terminal de 20 aminoácidos (SEQ ID NO:11) y un motivo de PL ESDV (SEQ ID NO:12). Los péptidos preferidos inhiben las formas humanas de PSD-95 y receptores NMDAR humanos. Sin embargo, también puede mostrarse inhibición por variantes de especie de las proteínas. Aparece a continuación una lista de los receptores de NMDA y glutamato que pueden usarse:

Tabla 1: Receptores de NMDA con secuencias de PL

Nombre	GI o nº de Acc	Secuencia de 20 unidades C-terminal	Secuencia de 4 unidades C-terminal	PL?	PL-ID interna
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:14)	HRES (SEQ ID NO: 28)		
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:14)	HRES (SEQ ID NO: 28)		

NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISLES EV (SEQ ID NO:15)	ESEV (SEQ ID NO: 29)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:11)	ESDV (SEQ ID NO: 12)	X	AA34.1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEQRTSRT CES (SEQ ID NO:16)	TCES (SEQ ID NO: 30)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:11)	ESDV (SEQ ID NO: 12)	X	
NMDAR2A	558748	LNCSNRRVYKKMPSIE SDV (SEQ ID NO:17)	ESDV (SEQ ID NO: 12)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGS AHFSSLE SEV (SEQ ID NO:18)	ESEV (SEQ ID NO: 29)	X	
Receptor de glutamato delta 2	AF0090 14	QPTPTLGLNLGNDPDRG TSI (SEQ ID NO:19)	GTSI (SEQ ID NO: 31)	X	
Receptor de glutamato 1	I28953	MQSIPCMSSHSGMPLGA TGL (SEQ ID NO:20)	ATGL (SEQ ID NO: 32)	X	
Receptor de glutamato 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIES VKI (SEQ ID NO:21)	SVKI (SEQ ID NO: 33)	X	
Receptor de glutamato 3	AF167332	QNYATYREGYNVYGTE SVKI (SEQ ID NO:22)	SVKI (SEQ ID NO: 33)	X	
Receptor de glutamato 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASD LP (SEQ ID NO:23)	SDLP (SEQ ID NO: 34)		
Receptor de glutamato 5	U16125	SFTSILTCHQRRRTQRKET VA (SEQ ID NO:24)	ETVA (SEQ ID NO: 35)	X	
Receptor de glutamato 6	U16126	EVINMHTFNDRRRLPGKE TMA (SEQ ID NO:25)	ETMA (SEQ ID NO: 36)	X	

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

- 5 Los péptidos pueden incluir o estar basados en un motivo PL del extremo C de cualquiera de las subunidades anteriores y tener una secuencia aminoacídica que comprende [S/T]-X-[V/L]. Esta secuencia aparece preferiblemente en el extremo C de los péptidos de la invención. Los péptidos preferidos tienen una secuencia aminoacídica que comprende [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID NO:38) en su extremo C. Los péptidos ejemplares comprenden: ESDV (SEQ ID NO:12), ESEV (SEQ ID NO:29), ETDV (SEQ ID NO:39), ETEV (SEQ ID NO:40), DTDV (SEQ ID NO:41) y DTEV (SEQ ID NO:42) como aminoácidos C-terminales. Son dos péptidos particularmente preferidos KLSSIESDV (SEQ ID NO:5) y KLSSIEDTV (SEQ ID NO:43). Tales péptidos tienen habitualmente 3-25 aminoácidos (sin un péptido de internalización), se prefieren longitudes peptídicas de 5-10 aminoácidos y particularmente 9 aminoácidos (también sin un péptido de internalización). En algunos de tales péptidos, todos los aminoácidos son del extremo C de un receptor de NMDA (no incluyendo los aminoácidos de un péptido de internalización).
- 10
- 15 Otros péptidos que inhiben las interacciones entre PDS95 y NDMAR incluyen péptidos del dominio 1 de PDZ y/o 2 de PSD-95 o un subfragmento de cualquiera de estos que inhiba las interacciones entre PSD-95 y un receptor de NMDA, tal como NR2B. Tales péptidos activos comprenden al menos 50, 60, 70, 80 o 90 aminoácidos del dominio 1 de PDZ y/o del dominio 2 de PDZ de PSD-95, que aparecen en aproximadamente los aminoácidos 65-248 de PSD-95

proporcionada por Stathakism, Genomics 44(1): 71-82 (1997) (secuencia humana) o NP_031890.1, GI:6681195 (secuencia de ratón) o regiones correspondientes de otras variantes de especie.

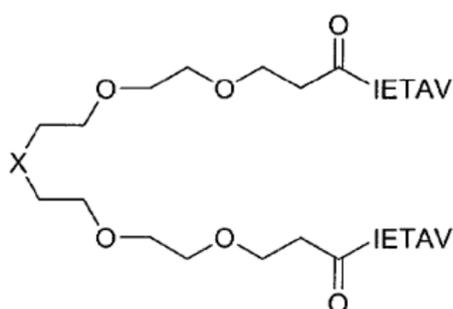
Los péptidos y peptidomiméticos pueden contener residuos aminoacídicos modificados, por ejemplo, residuos que están N-alquilados. Las modificaciones de alquilo N-terminal pueden incluir, p. ej., N-metilo, N-etilo, N-propilo, N-butilo, N-ciclohexilmetilo, N-ciclohexiletilo, N-bencilo, N-feniletilo, N-fenilpropilo,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

Bach, J. Med. Chem. 51, 6450-6459 (2008) y WO 2010/004003 han descrito una serie de análogos de NR2B9c (SEQ ID NO:6). Se exhibe actividad de unión a PDZ por péptidos que tienen solo tres aminoácidos C-terminales (SDV). Bach reseña también análogos que tienen una secuencia aminoacídica que comprende o consiste en X_1tSX_2V (SEQ ID NO:68), en la que t y S son aminoácidos alternativos, X_1 se selecciona de entre E, Q y A o un análogo de los mismos, X_2 se selecciona de entre A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D y N-Me-N o un análogo de los mismos. Opcionalmente, el péptido está N-alquilado en posición P3 (tercer aminoácido desde el extremo C, concretamente la posición ocupada por tS). El péptido puede estar N-alquilado con un sustituyente ciclohexano o aromático y comprende además un grupo espaciador entre el sustituyente y el grupo amino terminal del péptido o análogo peptídico, en el que el espaciador es un grupo alquilo seleccionado preferiblemente de entre metileno, etileno, propileno y butileno. El sustituyente aromático puede ser un resto naftalen-2-ilo o un anillo aromático sustituido con uno o dos grupos halógeno y/ alquilo.

Pueden incorporarse también otras modificaciones sin afectar adversamente la actividad y estas incluyen la sustitución de uno más de los aminoácidos en la forma isomérica natural L por aminoácidos en la forma isomérica D. Por tanto, cualquier aminoácido de origen natural en configuración L (al que puede hacerse referencia también como R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) puede reemplazarse por el aminoácido del mismo tipo estructural químico o un peptidomimético, pero de quiralidad opuesta, al que se hace referencia generalmente como D-aminoácido, pero al que puede hacerse referencia adicionalmente como forma R o S. Por tanto, un peptidomimético puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, al menos 50 % o todos los residuos de D-aminoácidos. Se hace referencia a veces a un peptidomimético que contienen algunos o todos los residuos D como un péptido "inverso".

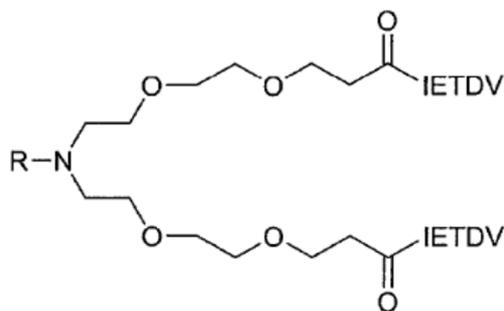
Los peptidomiméticos incluyen también retropéptidos. Un retropéptido tiene una secuencia aminoacídica inversa. Los peptidomiméticos incluyen también péptidos retroinversos en que el orden de los aminoácidos está invertido de modo que el aminoácido originalmente C-terminal aparece en el extremo N y se usan D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos. El documento WO 2008/014917 describe un análogo retroinverso de Tat-NR2B9c que tiene la secuencia aminoacídica vdseisslk-rrrqrkkrgyin (SEQ ID NO:8) (las letras minúsculas indican D-aminoácidos) y reseña que es eficaz para inhibir la isquemia cerebral. Es otro péptido eficaz descrito en la presente memoria Rv-Tat-NR2B9c (RRRQRKKGKGYKLSSIESDV; SEQ ID NO:70).

Puede usarse un ligador, p.ej. un ligador de polietilenglicol, para dimerizar el resto activo del péptido o peptidomimético para potenciar su afinidad y selectividad hacia proteínas que contienen dominios PDZ en tándem. Véanse, p. ej., Bach et al., (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48: 9685-9689 y el documento WO 2010/004003. Se dimeriza preferiblemente un péptido que contiene el motivo PL mediante unión de los extremos N de dos de tales moléculas, dejando los extremos C libres. Bach reseña además que un péptido pentamérico IESDV (SEQ ID NO:71) del extremo C de NMDAR 2B era eficaz para inhibir la unión de NMDAR 2B a PSD-95. IETDV (SEQ ID NO:73) puede usarse también en lugar de IESDV. Opcionalmente, pueden unirse aproximadamente 2-10 copias de un PEG en tándem como ligador. Opcionalmente, el ligador puede enlazarse también con un péptido de internalización o lipidarse para potenciar la captación celular. Se muestran a continuación ejemplos de inhibidores diméricos ilustrativos (véase Bach et al., PNAS 109 (2012) 3317-3322). Puede usarse cualquiera de los inhibidores de PSD-95 divulgados en la presente memoria en lugar de IETDV y puede usarse cualquier péptido de internalización o resto lipidante en lugar de tat. Pueden usarse también ligadores distintos a los mostrados.



Dímero-O (X= O)

Dímero-N (X= N)



Dímero Tat-N (R= YGRKKRRQRRR)

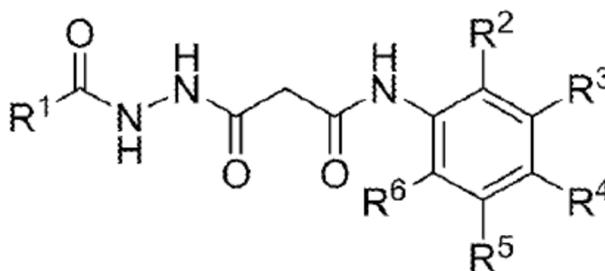
Dímero ReTat-N (R= rrrqrkkkr)

Al IETAV se le asigna la SEQ ID NO:74, a YGRKKRRQRRR la SEQ ID NO:2 y a rrrqrkkkr la SEQ ID NO:75, las letras minúsculas indicaban D-aminoácidos.

La actividad farmacológica apropiada de péptidos, peptidomiméticos u otros agentes puede confirmarse si se desea, usando modelos de rata descritos anteriormente de apoplejía antes de ensayar en los ensayos de primates y clínicos descritos en la presente solicitud. En los péptidos o peptidomiméticos pueden cribarse también la capacidad de inhibir interacciones entre PSD-95 y NMDAR 2B usando ensayos descritos, p. ej., en el documento US 20050059597, que se incorpora como referencia. Los péptidos útiles tienen típicamente valores de CI50 de menos de 50 μM , 25 μM , 10 μM , 0,1 μM o 0,01 μM en tal ensayo. Los péptidos preferidos tienen típicamente un valor de CI50 de entre 0,001-1 μM , y más preferiblemente de 0,001-0,05, 0,05-0,5 o 0,05 a 0,1 μM . Cuando un péptido u otro agente se caracteriza por inhibir la unión de una interacción, p. ej. la interacción de PSD-95 con NMDAR2B, tal descripción no excluye que el péptido o agente inhiba también otra interacción, por ejemplo la inhibición de la unión de PSD-95 a nNOS.

Los péptidos tales como los recién descritos pueden opcionalmente derivatizarse (p. ej., acetilarse, fosforilarse, miristoilarse, geranilarse y/o glicosilarse) para mejorar la afinidad de unión del inhibidor, para mejorar la capacidad del inhibidor de ser transportado a través de una membrana celular o para mejorar la estabilidad. Como ejemplo específico de inhibidores en que el tercer residuo desde el extremo C es S o T, este residuo puede fosforilarse antes del uso del péptido.

Los agentes farmacológicos incluyen también moléculas pequeñas que inhiben interacciones entre PSD-95 y NMDAR 2B, y/u otras interacciones descritas anteriormente. Se describen inhibidores de molécula pequeña adecuados, p. ej., en el documento WO/2009/006611. Son una clase ejemplar de compuestos adecuados los de fórmula



en la que R¹ es un miembro seleccionado del grupo consistente en ciclohexilo sustituido con 0-4 R⁷, fenilo sustituido con 0-4 R⁷, -(CH₂)_u-(CHR⁸R⁹), un alquilo C₁₋₆ ramificado (isopropilo, isobutilo, 1-isopropil-2-metilbutilo, 1-etilpropilo) y -NH-C(O)-(CR¹⁰R¹¹)_vH;

cada R⁷ es independientemente un miembro seleccionado del grupo consistente en alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, -C(O)R¹², OH, COOH, -NO, indolina N-sustituida y un péptido de translocación de membrana celular;

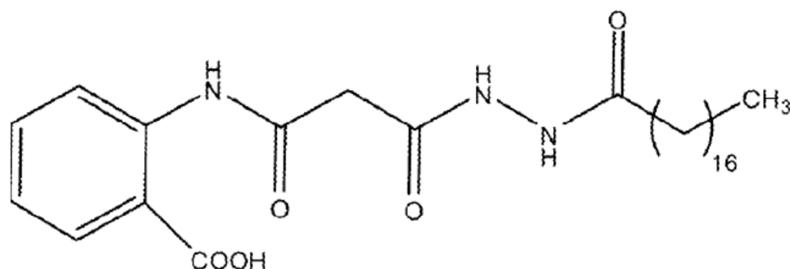
cada R⁸ y R⁹ se selecciona independientemente del grupo consistente en H, OH, ciclohexano, ciclopentano, fenilo, fenilo sustituido y ciclopentadieno;

cada R¹⁰ y R¹¹ se selecciona independientemente del grupo consistente en H, ciclohexano, fenilo y un péptido de translocación de membrana celular;

R¹² es un miembro seleccionado del grupo consistente en alquilo y arilo C₁₋₆; y cada uno de u y v son independientemente de 0 a 20;

en la que uno de R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ es -COOH, y en la que el resto de R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan cada uno independientemente del grupo consistente en F, H, OCH₃ y CH₃.

Es uno de tales compuestos 0620-0057, cuya estructura es:



0620-0057

Un agente farmacológico puede ligarse con un péptido de internalización para facilitar la captación en células y/o a

través de la barrera hematoencefálica. Los péptidos de internalización son una clase bien conocida de péptidos relativamente cortos que permiten a muchas proteínas celulares o víricas atravesar membranas. Los péptidos de internalización, también conocidos como péptidos de transducción de membrana celular o péptidos de penetración celular, pueden tener p. ej. 5-30 aminoácidos. Tales péptidos tienen típicamente una carga catiónica por una representación por encima de lo normal (relativa a las proteínas en general) de residuos de arginina y/o lisina que se cree que facilitan su paso a través de las membranas. Algunos de tales péptidos tienen al menos 5, 6, 7 u 8 residuos de arginina y/o lisina. Los ejemplos incluyen la proteína de Antennapedia (Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997)) (y variantes de la misma), la proteína tat de virus de inmunodeficiencia humana, la proteína VP22, el producto del gen UL49 de herpesvirus simple de tipo 1, penetratina, SynB1 y 3, transportano, anfipática, gp41NLS, poliArg y varias toxinas proteicas de plantas y bacterias tales como ricina, abrina, modicina, toxina de la difteria, toxina del cólera, toxina de ántrax, toxinas termolábiles y exotoxina de Pseudomonas aeruginosa A (ETA). Se describen otros ejemplos en las siguientes referencias (Temsamani, Drug Discovery Today, 9(23): 1012-1019, 2004; De Coupade, Biochem J., 390: 407-418, 2005; Saalik Bioconjugate Chem. 15: 1246-1253, 2004; Zhao, Medicinal Research Reviews 24(1): 1-12, 2004; Deshayes, Cellular and Molecular Life Sciences 62: 1839-49, 2005); Gao, ACS Chem. Biol. 2011, 6, 484-491, SG3 (RLSGMNEVLSFRWL) (SEQ ID NO: 77) (todos incorporados como referencia).

Es un péptido de internalización preferido tat del virus VIH. Un péptido tat reseñado en trabajos anteriores comprende o consiste en la secuencia aminoacídica estándar YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2) encontrada en la proteína Tat de VIH. Si están presentes residuos adicionales flanqueantes de tal motivo tat (además del agente farmacológico), los residuos pueden ser por ejemplo aminoácidos naturales que flanquean este segmento de una proteína tat, aminoácidos espaciadores o ligadores de una clase usada típicamente para unir dos dominios peptídicos, p. ej., gly(ser)₄ (SEQ ID NO:44), TGEKP (SEQ ID NO:45), GRRGGGS (SEQ ID NO:46) o LRQRDGERP (SEQ ID NO:47) (véanse, p. ej., Tang et al. (1996), J. Biol. Chem. 271, 15682-15686; Hennecke et al. (1998), Protein Eng. 11, 405-410)), o puede ser cualquier otro aminoácido que no reduzca significativamente la capacidad de conferir captación de la variante sin los residuos flanqueantes. Preferiblemente, el número de aminoácidos flanqueantes distintos del péptido activo no supera diez en cada lado de YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2). Es un péptido tat adecuado que comprende residuos aminoacídicos adicionales flanqueantes del extremo C de YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2) el YGRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO:48). Sin embargo, preferiblemente no están presentes aminoácidos flanqueantes. Otros péptidos tat que pueden usarse incluyen GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO:4) y GRKKRRQRRRP (SEQ ID NO:72).

Se describen variantes del péptido tat anterior que tienen una capacidad reducida de unirse a canales de calcio de tipo N en el documento WO/2008/109010. Tales variantes pueden comprender o consistir en una secuencia aminoacídica XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:49), en que X es un aminoácido distinto de Y o ninguno (en cuyo caso G es un residuo N-terminal libre). Un péptido tat preferido tiene el residuo Y N-terminal sustituido por F. Por tanto, se prefiere un péptido tat que comprende o consiste en FGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:3). Otro péptido tat variante preferido consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID NO:1). Otro péptido tat preferido comprende o consiste en RRRQRRKKRG (SEQ ID NO: 10) o RRRQRRKKRGY (SEQ ID NO: 26) (aminoácidos 1-10 o 1-11 de la SEQ ID NO:70). Otros péptidos derivados de tat que facilitan la captación de un agente farmacológico sin inhibir los canales de calcio de tipo N incluyen aquellos presentados en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2:

X-FGRKKRRQRRR (F-Tat) (SEQ ID NO:69)
X-GKKKKKQKKK (SEQ ID NO:50)
X-RKKRRQRRR (SEQ ID NO:51)
X-GAKKRRQRRR (SEQ ID NO:52)
X-AKKRRQRRR (SEQ ID NO:53)
X-GRKARRQRRR (SEQ ID NO:54)
X-RKARRQRRR (SEQ ID NO:55)
X-GRKKARQRRR (SEQ ID NO:56)
X-RKKARQRRR (SEQ ID NO:57)
X-GRKKRRQARR (SEQ ID NO:58)
X-RKKRRQARR (SEQ ID NO:59)
X-GRKKRRQARR (SEQ ID NO:60)
X-RKKRRQARR (SEQ ID NO:61)
X-RRPRRRPRR (SEQ ID NO:62)
X-RRARRARRR (SEQ ID NO:63)
X-RRRARRRARR (SEQ ID NO:64)

X-RRRPRRRPRR (SEQ ID NO:65)
X-RRPRRPRR (SEQ ID NO:66)
X-RRARRARR (SEQ ID NO:67)

X puede representar un extremo amino libre, uno o más aminoácidos o un resto conjugado. Los péptidos de internalización pueden usarse en forma inversa o retro o inversorretro estando o no el péptido o peptidomimético ligado en tal forma. Por ejemplo, un péptido quimérico preferido tiene una secuencia aminoacídica que comprende o consiste en RRRQRRKRGYKLSSIESDV (SEQ ID NO:70, también conocido como NA-1 o Tat-NR2B9c) o tiene una secuencia aminoacídica que comprende o consiste en RRRQRRKRGY-KLSSIEDV (SEQ ID NO:37).

Los péptidos de internalización pueden enlazarse con agentes farmacológicos por métodos convencionales. Por ejemplo, los agentes pueden unirse a péptidos de internalización por enlazamiento químico, por ejemplo mediante un agente de acoplamiento o conjugación. Están comercialmente disponibles numerosos tales agentes y se revisan por S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991). Algunos ejemplos de reactivos de reticulación incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de J-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenilen)bismaleimida; N,N'-etilenbis(yodoacetamida) u otros de tales reactivos que tienen puentes de metileno de 6 a 11 carbonos (relativamente específicos de grupos sulfhidrilo) y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno (que forma grupos de enlace irreversibles con grupos amino y tirosina). Otros reactivos de reticulación incluyen p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona (que forma reticulaciones irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimidato de dimetilo (que es específico de grupos amino); cloruro de fenol-1,4-disulfonilo (que reacciona principalmente con grupos amino); hexametilendiisocianato o diisotiocianato o azofenil-p-diisocianato (que reacciona principalmente con grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobenzidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

Para agentes farmacológicos que son péptidos, el enlazamiento con un péptido de internalización puede conseguirse generando una proteína de fusión que comprende la secuencia peptídica fusionada, preferiblemente en su extremo N, con un péptido de internalización.

En lugar o además de ligar un péptido (u otro agente) que inhibe PSD-95 a un péptido de internalización, puede ligarse tal péptido a un lípido (lipidación) para aumentar la hidrofobicidad del conjugado respecto al péptido solo y facilitar así el paso del péptido ligado a través de membranas celulares y/o a través de la barrera encefálica. La lipidación se efectúa preferiblemente en el aminoácido N-terminal, pero puede efectuarse también en aminoácidos internos, a condición de que la capacidad del péptido de inhibir la interacción entre PSD-95 y NMDAR 2B no se reduzca más de un 50 %. Preferiblemente, se efectúa la lipidación en un aminoácido distinto de uno de los cuatro aminoácidos más C-terminales. Los lípidos son moléculas orgánicas más solubles en éter que en agua e incluyen ácidos grasos, glicéridos y esteroides. Las formas adecuadas de lipidación incluyen miristoilación, palmitoilación o enlazamiento de otros ácidos grasos, preferiblemente con una longitud de cadena de 10-20 carbonos, tales como ácido láurico y ácido esteárico, así como geranilación, geranilgeranilación e isoprenilación. Se prefieren las lipidaciones de un tipo que aparece en modificación postraduccional de proteínas naturales. Se prefiere también la lipidación con un ácido graso mediante formación de un enlace amida con el grupo alfa-amino del aminoácido N-terminal del péptido. La lipidación puede ser por síntesis peptídica, incluyendo un aminoácido prelipidado, efectuarse enzimáticamente *in vitro* o por expresión recombinante, por reticulación química o derivatización química del péptido. Los aminoácidos modificados por miristoilación y otras modificaciones lipídicas están comercialmente disponibles.

La lipidación facilita preferiblemente el paso de un péptido ligado (p. ej., KLSSIESDV (SEQ ID NO:5), o KLSSIEDV (SEQ ID NO:43)) a través de una membrana celular y/o la barrera hematoencefálica sin causar una reducción transitoria de la presión sanguínea como se ha encontrado cuando se administra un péptido tat estándar a alta dosificación (p. ej., a 3 mg/kg o mayor), o al menos con una reducción menor que el mismo péptido ligado a un péptido tat estándar.

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

III. Agentes y métodos para reperusión

Las placas y coágulos sanguíneos (también conocidos como émbolos) que causan isquemia pueden disolverse, retirarse o eludirse por medios tanto farmacológicos como físicos. Se hace referencia a la disolución o retirada de placas y coágulos sanguíneos y la consiguiente restauración del flujo sanguíneo como reperusión. Una clase de agentes actúa por trombólisis. Estos agentes funcionan estimulando la fibrinólisis por plasmina mediante infusión de activadores de plasminógeno de tejido (tPA). La plasmina aclara la malla de fibrina reticulada (el esqueleto de un coágulo), haciendo el coágulo soluble y sujeto a proteólisis adicional por otras enzimas, y restaura el flujo sanguíneo

en vasos sanguíneos ocluidos. Los ejemplos de agentes trombolíticos incluyen activador de plasminógeno de tejido tPA, alteplasa (Activase), reteplasa (Retavase), tenecteplasa (TNKase), anistreplasa (Eminase), estreptocinasa (Kabikinase, Streptase) y urocinasa (Abbokinase).

5 Otra clase de fármacos que pueden usarse para reperfusión son los vasodilatadores. Estos fármacos actúan relajando y abriendo vasos sanguíneos, permitiendo así a la sangre fluir alrededor de una obstrucción. Son algunos ejemplos de tipos de vasodilatadores los antagonistas de alfa-adrenoceptores (alfa-bloqueantes), bloqueantes de receptor de angiotensina (ARB), agonistas de beta₂-adrenoceptores (agonistas β₂), bloqueantes de canal de calcio (CCB), simpatolíticos de acción central, vasodilatadores de acción directa, antagonistas de receptor de endotelina, bloqueantes ganglionares, nitrodilatadores, inhibidores de fosfodiesterasa, abridores de canal de potasio e inhibidores de renina.

Otra clase de fármacos que pueden usarse para reperfusión son los fármacos hipertensivos (concretamente, fármacos que elevan la presión sanguínea), tales como epinefrina, fenilefrina, seudoefedrina, norepinefrina, norefedrina, terbutalina, salbutamol y metilefedrina. La presión de perfusión aumentada puede aumentar el flujo de sangre alrededor de una obstrucción.

15 Los métodos mecánicos de reperfusión incluyen angioplastia, cateterización y cirugía de injerto de derivación arterial, implantación de endoprótesis vascular, embolectomía o endarterectomía. Tales procedimientos restauran el flujo de placa por retirada mecánica de una placa, manteniendo abierto un vaso sanguíneo, de modo que la sangre pueda fluir alrededor de una placa o eludir una placa.

20 Otros métodos mecánicos de reperfusión incluyen el uso de un dispositivo que desvía el flujo de sangre de otras áreas del cuerpo al cerebro. Es un ejemplo un catéter que obstruye parcialmente la aorta, tal como el dispositivo de catéter CoAxia NeuroFlo™, que se ha sometido recientemente a un ensayo aleatorizado y puede conseguir la aprobación de la FDA para el tratamiento de apoplejía. Este dispositivo se ha usado en sujetos que presentan apoplejía hasta 14 horas después del inicio de la isquemia.

25 El uso de un agente no trombolítico o método mecánico de reperfusión no somete un péptido inhibidor de PSD-95 a escisión proteolítica, por lo tanto, lo que puede ser una ventaja si el inhibidor de PSD-95 y la reperfusión se administran simultáneamente o próximos en el tiempo.

IV. Apoplejía

Una apoplejía es una afección resultante de flujo sanguíneo deficiente en el SNC independientemente de la causa. Las causas potenciales incluyen embolia, hemorragia y trombosis. Algunas células neuronales mueren inmediatamente como resultado de un flujo sanguíneo deficiente. Estas células liberan sus moléculas componentes incluyendo glutamato, que a su vez activa los receptores de NMDA que elevan los niveles de calcio intracelular y los niveles de enzimas intracelulares, conduciendo a muerte de células neuronales adicional (la cascada de excitotoxicidad). Se hace referencia a la muerte de tejido del SNC como infarto. El volumen de infarto (concretamente, el volumen de células neuronales muertas resultantes de apoplejía en el cerebro) puede usarse como indicador de la extensión del daño patológico resultante de la apoplejía. El efecto sintomático depende tanto del volumen del infarto como de dónde está localizado en el cerebro. El índice de discapacidad puede usarse como una medida de daño sintomático, tal como la escala de resultado clínico de apoplejía de Rankin (Rankin, Scott Med J; 2: 200-15 (1957)) y el índice de Barthel. La escala de Rankin está basada en valorar directamente las condiciones globales de un sujeto como sigue.

40 Tabla 3

0	Sin síntomas en absoluto
1	Sin discapacidad significativa a pesar de los síntomas; capaz de llevar a cabo las tareas y actividades habituales
2	Ligera discapacidad; incapaz de llevar a cabo todas las actividades anteriores pero capaz de ocuparse de sus asuntos sin asistencia
3	Discapacidad moderada que requiere cierta ayuda, pero capaz de caminar sin asistencia
4	Discapacidad moderada a grave; incapaz de caminar sin asistencia e incapaz de ocuparse de las necesidades corporales propias sin asistencia
5	Discapacidad grave; postración; incontinencia y requiere cuidados y atenciones de enfermería constantes

El índice de Barthel está basado en una serie de preguntas sobre la capacidad de un sujeto de llevar a cabo 10 actividades básicas de la vida diaria, dando como resultado una puntuación entre 0 y 100, indicando una puntuación menor más discapacidad (Mahoney et al., Maryland State Medical Journal 14:56-61 (1965)).

Como alternativa, la gravedad/resultado clínico de la apoplejía puede medirse usando la escala de apoplejía del NIH, disponible en www.mnnds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_Scale_Booklet.pdf.

La escala está basada en la capacidad de un sujeto de llevar a cabo 11 grupos de funciones que incluyen la valoración del nivel de consciencia, funciones motores, sensoriales y de lenguaje del sujeto.

5 Una apoplejía isquémica hace referencia más específicamente a un tipo de apoplejía que está causada por el bloqueo del flujo sanguíneo al cerebro. La afección subyacente para este tipo de bloqueo es lo más comúnmente el desarrollo de depósitos grasos que revisten las paredes del vaso. Esta afección se llama aterosclerosis. Estos depósitos grasos pueden causar dos tipos de obstrucción. La trombosis cerebral hace referencia a un trombo (coágulo sanguíneo) que se desarrolla en la parte coagulada del vaso. “Embolia cerebral” hace referencia generalmente a un coágulo sanguíneo o ateroma que se forma en otra localización del sistema circulatorio, habitualmente el corazón y arterias grandes del tórax superior y cuello. Se desprende entonces una porción del coágulo sanguíneo y/o ateroma, entra en la corriente sanguínea y viaja por los vasos sanguíneos del cerebro hasta que alcanza vasos demasiado pequeños para pasar. Una segunda causa importante de embolia es un ritmo cardíaco irregular, conocido como fibrilación arterial. Crea las condiciones en que pueden formarse coágulos en el corazón, expulsarse y viajar al cerebro. Son causas potenciales adicionales de apoplejía isquémica hemorragia, trombosis, disección de una arteria o vena, parada cardíaca, choque por cualquier causa incluyendo hemorragia y causas yatrogénicas tales como lesión quirúrgica directa en los vasos sanguíneos cerebrales o vasos que conducen al cerebro o cirugía cardíaca. La apoplejía isquémica da cuenta de aproximadamente el 83 % de todos los casos de apoplejía.

20 Los ataques isquémicos transitorios (AIT) son apoplejías menores o de advertencia. En un AIT, están presentes las condiciones indicativas de una apoplejía isquémica y se desarrollan los signos de advertencia típicos de apoplejía. Sin embargo, la obstrucción (coágulo sanguíneo) aparece durante un tiempo corto y tiende a resolverse por sí misma mediante mecanismos normales. Los sujetos que experimentan cirugía cardíaca están en riesgo particular de ataques isquémicos cerebrales transitorios.

25 La apoplejía hemorrágica da cuenta de aproximadamente el 17 % de los casos de apoplejía. Es el resultado de un vaso debilitado que se rompe y sangra en el cerebro circundante. La sangre se acumula y comprime el tejido cerebral circundante. Los dos tipos generales de apoplejía hemorrágica son hemorragia intracerebral y hemorragia subaracnoidea. La apoplejía hemorrágica es el resultado de la ruptura de un vaso sanguíneo debilitado. Las causas potenciales de ruptura de un vaso sanguíneo debilitado incluyen una hemorragia hipertensiva, en que una alta presión sanguínea causa una ruptura de un vaso sanguíneo, u otra causa subyacente de vasos sanguíneos debilitados tales como malformación vascular cerebral con ruptura, incluyendo aneurisma cerebral, malformación arteriovenosa (MAV) o malformación cavernosa. Las apoplejías hemorrágicas pueden surgir también por una transformación hemorrágica de una apoplejía isquémica que debilita los vasos sanguíneos en el infarto, o una hemorragia de tumores primarios o metastásicos en el SNC que contiene vasos sanguíneos anormalmente débiles. La apoplejía hemorrágica también puede surgir por causas yatrogénicas tales como lesión quirúrgica directa en un vaso sanguíneo cerebral. Un aneurisma es un abombamiento de una región debilitada de un vaso sanguíneo. Si se deja sin tratar, el aneurisma puede continuar debilitándose hasta que se rompe y sangra en el cerebro. Una malformación arteriovenosa (MAV) es un grupo de vasos sanguíneos formados anormalmente. Una malformación cavernosa es una anomalía venosa que puede causar una hemorragia por estructuras venosas debilitadas. Puede romperse uno cualquiera de estos vasos, causando también sangrado en el cerebro. La apoplejía hemorrágica puede ser también el resultado de traumatismo físico. La apoplejía hemorrágica en una parte del cerebro puede conducir a apoplejía isquémica en otra por la falta de sangre perdida en la apoplejía hemorrágica.

V. Sujetos susceptibles de tratamiento

45 Los sujetos susceptibles de tratamiento incluyen sujetos que presentan un signo o signos y/o un síntoma o síntomas de isquemia en el SNC u otro lugar del cuerpo pero que afectan a un vaso sanguíneo cuya obstrucción puede impedir el flujo sanguíneo a través del cerebro. Estos sujetos incluyen sujetos que presentan un signo o signos y/o un síntoma o síntomas de apoplejía, isquemia de miocardio, embolia pulmonar, isquemia de miembro, isquemia renal o retiniana. Tales sujetos incluyen sujetos en que se sospecha tal afección, pero no pueden excluirse otras afecciones, así como sujetos a los que se ha diagnosticado según criterios generalmente reconocidos, p. ej., DSM IV TR.

50 Los sujetos susceptibles de tratamiento incluyen también sujetos con riesgo de isquemia pero en que el inicio de la isquemia no ha aparecido todavía. Un sujeto está en riesgo si él o ella tiene un riesgo mayor de desarrollar isquemia que una población de control. La población de control puede incluir uno o más individuos seleccionados al azar de la población general (p. ej., de edad, género, raza y/o etnia coincidentes) que no se hayan diagnosticado ni tengan un historial familiar del trastorno. Un sujeto puede considerarse en riesgo de un trastorno si se encuentra asociado a ese sujeto un “factor de riesgo” asociado a ese trastorno. Un factor de riesgo puede incluir cualquier actividad, rasgo, evento o propiedad asociado a un trastorno dado, por ejemplo mediante estudios estadísticos o epidemiológicos en una población de sujetos. Un sujeto puede clasificarse por tanto como en riesgo de un trastorno incluso si los estudios que identifican los factores de riesgo subyacentes no incluían al sujeto específicamente. Por ejemplo, un sujeto que experimenta cirugía cardíaca está en riesgo de ataque isquémico cerebral transitorio debido a que la frecuencia del ataque isquémico cerebral transitorio aumenta en una población de sujetos que han experimentado cirugía cardíaca en comparación con una población de sujetos que no.

Los sujetos con riesgo de isquemia que afecta al cerebro incluyen aquellos que experimentan un procedimiento quirúrgico en el cerebro o el SNC, tal como cirugía endovascular, clipaje, implantación de endoprótesis vascular o microcateterización. Tales sujetos incluyen también aquellos que experimentan cirugía en otro lugar del cuerpo que afecta a un vaso sanguíneo que suministra al cerebro (es decir, que conecta el cerebro con el corazón, por ejemplo las arterias carótidas y venas yugulares) o en una arteria que suministra sangre a la retina, riñón, médula espinal o miembros. Son una clase preferida de sujetos aquellos que experimentan cirugía endovascular para tratar un aneurisma cerebral. Los sujetos que experimentan estos tipos de cirugía están en riesgo potenciado de que la isquemia afecte al SNC. Los sujetos en riesgo de apoplejía incluyen también sujetos que son fumadores, hipertensos, diabéticos o hipercolesterolémicos. Los sujetos en riesgo especial son aquellos que hayan tenido una apoplejía anterior, apoplejía menor o ataque isquémico transitorio.

VI. Métodos combinados de tratamiento

Los métodos combinados implicaban administrar un inhibidor de PSD-95 y una forma de terapia de reperfusión a un sujeto susceptible de tratamiento. El inhibidor de PSD-95 y la reperfusión pueden administrarse en cualquier orden o al mismo tiempo. Habitualmente, el inhibidor de PSD-95 y la reperfusión se administran a la vez, en momentos superpuestos o próximos (concretamente, dentro de un intervalo de 15 minutos) o el inhibidor de PSD-95 se administra primero.

Para el tratamiento de isquemias que no pueden predecirse por adelantado, el inhibidor de PSD-95 puede administrarse lo antes posible o en cuanto sea factible después del inicio de la isquemia. Por ejemplo, el inhibidor de PSD-95 puede administrarse dentro de un periodo de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 o 24 horas después del inicio de la isquemia. Para isquemias que pueden predecirse por adelantado, el inhibidor de PSD-95 puede administrarse antes, simultáneamente o después de inicio de la isquemia. Por ejemplo, para una isquemia resultante de cirugía, el inhibidor de PSD-95 se administra a veces rutinariamente en un periodo que empieza 30 minutos antes de comenzar la cirugía y termina 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 o 24 horas después de la cirugía independientemente de si la isquemia se ha desarrollado o no. Debido a que el inhibidor de PSD-95 está libre de efectos secundarios graves, puede administrarse cuando se sospechan apoplejía u otras afecciones isquémicas sin un diagnóstico según los criterios reconocidos en la materia que se han elaborado. Por ejemplo, el inhibidor de PSD-95 puede administrarse en la localización donde ha aparecido la apoplejía (p. ej., en la casa de los pacientes) o en una ambulancia que transporta el sujeto al hospital. El inhibidor de PSD-95 puede administrarse también de forma segura a un sujeto en riesgo de apoplejía u otras afecciones isquémicas antes del inicio que pueden o no desarrollar realmente la afección.

Después, o a veces antes, de la administración del inhibidor de PSD-95, un sujeto que presenta un signo o signos y/o un síntoma o síntomas de isquemia puede someterse a valoración de diagnóstico adicional para determinar si el sujeto tiene isquemia en el SNC o lo afecta de otro modo y determinar si el sujeto tiene o es susceptible de hemorragia. Lo más particularmente en sujetos que presentan síntomas de apoplejía, los ensayos intentan distinguir si la apoplejía es el resultado de hemorragia o isquemia, dando cuenta la hemorragia de aproximadamente el 17 % de las apoplejías. Las pruebas de diagnóstico pueden incluir el examen de uno o más órganos, tal como un TAC, toma de imágenes por IRM o TEP o prueba sanguínea de un biomarcador que sugiera que ha aparecido una apoplejía. Son conocidos varios biomarcadores asociados a apoplejía, incluyendo factor neurotrófico de tipo B, factor de von Willebrand, metaloproteínasa de matriz 9 y proteína 1 quimiotáctica de monocitos (véase Reynolds et al., Clinical Chemistry 49: 1733-1739 (2003)). El órgano u órganos examinados incluyen cualquier sospechoso de ser el sitio de isquemia (p. ej., cerebro, corazón, miembros, médula, pulmones, riñón, retina) así como cualquier otro sospechoso de ser la fuente de hemorragia. Un examen del cerebro es el procedimiento habitual para distinguir entre apoplejía isquémica y hemorrágica. La valoración de diagnóstico puede incluir también tomar o revisar el historial médico del sujeto y efectuar otras pruebas. Puede usarse la presencia de cualquiera de los siguientes factores solos o en combinación en la valoración de si la terapia de reperfusión presenta un riesgo inaceptable: los síntomas del sujeto son menores o mejoran rápidamente, el sujeto tenía convulsiones al inicio de la apoplejía, el sujeto ha experimentado otra apoplejía o traumatismo craneal grave en los últimos 3 meses, el sujeto experimentó cirugía mayor en los últimos 14 días, el sujeto tiene un historial conocido de hemorragia intracraneal, el sujeto tiene una presión sanguínea sistólica mantenida >185 mm Hg, el sujeto tiene una presión sanguínea diastólica mantenida >110 mm Hg, es necesario un tratamiento agresivo para rebajar la presión sanguínea del sujeto, el sujeto tiene síntomas que sugieren hemorragia subaracnoidea, el sujeto ha experimentado hemorragia del tracto gastrointestinal o urinario en los últimos 21 días, el sujeto ha experimentado punción arterial en sitio no compresible en los últimos 7 días, el sujeto ha recibido heparina en las últimas 48 horas y tiene un PTT elevado, el tiempo de protrombina (PT) del sujeto es >15 segundos, el recuento de plaquetas del sujeto es <100.000/μl, la glucosa sérica del sujeto es <50 mg/dl o >400 mg/dl, el sujeto es hemofílico o tiene otras deficiencias de coagulación.

La investigación de diagnóstico adicional determina según criterios reconocidos, o al menos con mayor probabilidad que anteriormente, la investigación de si el sujeto tiene una afección isquémica, y si el sujeto tiene una hemorragia, un riesgo inaceptable de hemorragia o está excluido de otro modo de recibir terapia de reperfusión debido a un riesgo inaceptable de efectos secundarios. Los sujetos en que se confirma un diagnóstico de una afección isquémica en el SNC o de otro modo que lo afecte probablemente que estén en riesgo inaceptable de efectos secundarios pueden someterse entonces a terapia de reperfusión. Preferiblemente, la terapia de reperfusión se efectúa en cuanto sea factible después de la terminación de cualquier procedimiento de diagnóstico. En algunos sujetos, la terapia de reperfusión comienza más de 0, 1, 2, 3, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 18 o 24 h después del inicio de la isquemia. En

apoplejías que aparecen en un entorno médico (p. ej., durante procedimientos endovasculares), el tratamiento puede empezar menos de 1 hora después del inicio. En algunos sujetos, se comienza la terapia de reperfusión 0,5-6, 0,5-12, 0,5-18 o 0,5-24 h después del inicio de la isquemia. En algunos sujetos, se comienza la terapia de reperfusión fuera de la ventana habitual de 3-4,5 h en que hasta ahora se ha considerado eficaz la terapia de reperfusión. Por ejemplo, en algunos sujetos se comienza la terapia de reperfusión más de 3 horas o más de 4,5 horas después del inicio de la isquemia y hasta 24 o 48 horas después del inicio de la isquemia. En algunos sujetos, se comienza la terapia de reperfusión después de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 horas y hasta 24 o 48 horas después del inicio de la isquemia. En algunos sujetos, se comienza la terapia de reperfusión 275-390 minutos después del inicio de la isquemia. En algunos sujetos, se comienza la terapia de reperfusión independientemente del momento de inicio de la isquemia, a condición de que reúnan los requisitos para reperfusión basándose en criterios de diagnóstico específicos tales como la ausencia de un infarto completo en un TAC, la evidencia de una penumbra isquémica por criterios de toma de imágenes de tomografía computerizada (TAC), toma de imágenes por resonancia magnética (IRM) o tomografía de emisión de positrones (TEP) y la ausencia de hemorragia cerebral.

El tiempo de reperfusión puede medirse también desde la administración del inhibidor de PSD-95. El intervalo puede ser, por ejemplo, de 5 minutos a 24 o 48 horas (e intervalo entre la administración de PSD-95 y la reperfusión, aquí como en otros lugares de esta solicitud, se mide desde el inicio de la administración de inhibidor de PSD-95 al inicio de la administración de reperfusión). El intervalo puede ser, por ejemplo, de 15 min a 6 h, de 15 min a 4,5 h, de 15 min a 3 h, de 15 min a 1 h, de 30 minutos a 6 horas, o de 30 min a 3 horas, o de 30 min a 4,5 horas, o 1-3 horas, o 1-4,5 horas. Puede ser ventajoso un intervalo más largo para inhibidores de PSD-95 peptídicos, tales como Tat-NR2B9c, usados en combinación con agentes para la reperfusión que actúan mediante proteólisis (p. ej., tPA), porque da al inhibidor un periodo más largo para ejercer su efecto antes de someter a degradación proteolítica por la plasmina resultante.

A los sujetos en que no se confirma una afección isquémica o se considera improbable no se les administra habitualmente terapia de reperfusión. Tales sujetos pueden no haber recibido ningún beneficio del inhibidor de PSD-95, pero tampoco están peor que de no haber sido tratados. Los sujetos en que se confirma una afección isquémica, o se considera probable pero se consideran con un nivel inaceptable de efectos secundarios por terapia de reperfusión, no se les administra terapia de reperfusión. Tales sujetos pueden haber obtenido beneficios del inhibidor de PSD-95 pero se les ahorra el riesgo de efectos secundarios inaceptables por la terapia de reperfusión.

Tanto el tratamiento con un inhibidor de PSD-95 como la terapia de reperfusión tienen independientemente la capacidad de reducir el tamaño de infarto y los déficits funcionales debidos a la isquemia. Cuando se usan en combinación según los presentes métodos, la reducción del tamaño de infarto y/o los déficits funcionales es preferiblemente mayor que la del uso de cualquier agente solo administrado en un régimen comparable distinto de la combinación (concretamente, cooperativo). Más preferiblemente, la reducción del tamaño de infarto y/o déficit funcionales es al menos aditiva o preferiblemente más que aditiva (concretamente sinérgica) de las reducciones conseguidas por los agentes solos en un régimen comparable, excepto por la combinación. En algunos regímenes, la terapia de reperfusión es eficaz para reducir el tamaño de infarto y/o tiempos funcionales en un momento después del inicio de la isquemia (p. ej., más de 4,5 h) cuando sería ineficaz menos por la administración simultánea o anterior del inhibidor de PSD-95. Dicho de otro modo, cuando se administra a un sujeto un inhibidor de PSD-95 y terapia de reperfusión, la terapia de reperfusión es preferiblemente al menos tan eficaz como lo sería si se administrara en un momento anterior sin el inhibidor de PSD-95. Por tanto, el inhibidor de PSD-95 aumenta eficazmente la eficacia de la terapia de reperfusión al reducir uno o más efectos dañinos de la isquemia antes o a medida que tiene efecto la terapia de reperfusión. El inhibidor de PSD-95 puede compensar por tanto el retardo en la administración de terapia de reperfusión tanto si el retardo es retardo en el reconocimiento del sujeto del peligro de sus síntomas iniciales, retardos en el transporte del sujeto a un hospital u otra institución médica o retardos en la práctica de los procedimientos de diagnóstico para establecer la presencia de isquemia y/o la ausencia de hemorragia o un riesgo inaceptable de la misma. Pueden demostrarse los efectos combinados estadísticamente significativos de inhibidor de PSD-95 y terapia de reperfusión, que incluyen efectos aditivos o sinérgicos, entre poblaciones en un ensayo clínico o entre poblaciones de modelos animales en trabajo preclínico.

VI. Regímenes eficaces de administración

Se administra un inhibidor de PSD-95 a una cantidad, frecuencia y vía de administración eficaces para reducir, inhibir o retardar uno o más efectos dañinos de la isquemia sobre el SNC. A menos que se indique otra cosa, las dosificaciones de inhibidores que son agentes quiméricos que incluyen un agente farmacológico ligado a un péptido de internalización hacen referencia al agente entero en lugar de solo al componente de agente farmacológico del agente quimérico. Una cantidad eficaz significa una cantidad de agente suficientemente significativa para reducir, inhibir o retardar uno o más efectos dañinos de la isquemia en una población de sujetos (en modelos animales) que padecen la enfermedad tratados con un agente de la invención respecto al daño en una población de control de sujetos (o modelos animales) que padecen esa enfermedad o afección que no se han tratado con el agente. La cantidad se considera también eficaz si un sujeto tratado individualmente consigue un resultado clínico más favorable que el resultado clínico medio en una población de control de sujetos comparables no tratados mediante los métodos de la invención. Un régimen eficaz implica la administración de una dosis eficaz a la frecuencia y vía de administración necesarias para conseguir el fin pretendido.

5 Cuando la afección que requiere tratamiento es apoplejía, el resultado clínico puede determinarse mediante el volumen de infarto o el índice de discapacidad, y una dosificación puede reconocerse como eficaz si un sujeto tratado individualmente muestra una discapacidad de dos o menos en la escala de Rankin y de 75 más en la escala de Barthel, véase Lees et al., J N Engl J Med 2006; 354: 588-600 o si una población de sujetos tratados muestra una distribución significativamente mejorada (concretamente, menos discapacidad) de puntuaciones en cualquier escala de discapacidad (p. ej., Barthel, Rankin o escala de apoplejía del NIH) que una población no tratada comparable, o si una población de sujetos tratados muestra un tamaño o número de infartos significativamente reducidos en comparación con una población no tratada comparable. Una única dosis de agente es habitualmente suficiente para el tratamiento de apoplejía. Sin embargo, pueden administrarse múltiples dosificaciones a intervalos de, p. ej., 1, 2, 3, 6, 12, 18 o 24 horas hasta detectar la presencia de un infarto completo en un TAC o hasta que no se observe beneficio adicional.

10 Dependiendo del agente, la administración puede ser parenteral, intravenosa, nasal, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. La administración intravenosa se prefiere para agentes peptídicos.

15 Para agentes quiméricos que incluyen un péptido de internalización, particularmente un péptido tat de VIH que comprende la secuencia aminoacídica YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2), la administración del agente puede combinarse o no con un agente antiinflamatorio para reducir la liberación de histamina y sus efectos posteriores asociados a altos niveles de péptido de internalización. Son agentes preferidos para coadministración los inhibidores de la degradación de mastocitos, tales como cromolina o yodoxamida o cualquier otro enumerado en la presente memoria. Pueden usarse también antihistamínicos o corticosteroides, particularmente en combinaciones o altas dosificaciones (véanse los documentos WO2009/076105 y WO2010/144742).

20 Para administración a seres humanos, es una dosis preferida del agente quimérico Tat-NR2B9c de 2-3 mg/kg y más, preferiblemente de 2,6 mg/kg. Debería entenderse que las dosificaciones indicadas incluyen el margen de error inherente en la precisión con que pueden medirse las dosificaciones en un entorno hospitalario típico. La dosis se prefiere porque es la dosis máxima con que el agente puede administrarse sin liberación de cantidades significativas de histamina y las secuelas consiguientes en la mayoría de sujetos. Aunque la liberación de histamina a altas dosificaciones puede controlarse mediante la coadministración de un antiinflamatorio como se discute anteriormente, y en cualquier caso habitualmente se resuelve espontáneamente sin efectos adversos, puede evitarse mejor manteniendo la dosis por debajo de 3 mg/kg y preferiblemente a 2-3 mg/kg, más preferiblemente a 2,6 mg/kg. Tales cantidades son para administración de dosis única, concretamente una dosis por episodio patológico. Tales dosis pueden administrarse también diariamente o más frecuentemente. Pueden usarse dosis menores, opcionalmente de 1-2 mg/kg, o 0,5-1 mg/kg, 0,1-0,5 mg/kg o menos de 0,1 mg/kg. Para regímenes de dosis repetidas, pueden usarse dosificaciones aún menores.

25 Las dosificaciones indicadas anteriormente son para el agente quimérico Tat-NR2B9c (YGRKKRRQRRRKLSSIESDV; SEQ ID NO:6). Pueden determinarse dosificaciones equivalentes de otros agentes que consigan el mismo efecto mediante varios enfoques. Para variantes cercanas de ese agente en que se sustituyen, insertan o eliminan uno o unos pocos aminoácidos y el peso molecular permanece igual dentro de aproximadamente $\pm 25\%$, las dosificaciones anteriores son aún una buena guía. Sin embargo, en general para otros agentes, las dosificaciones equivalentes pueden variar dependiendo del peso molecular del agente con y sin péptido de internalización si está presente, su Kd por su diana y sus parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos. Para algunos agentes, pueden calcularse dosificaciones equivalentes de modo que suministren una cantidad equimolar del agente farmacológico. Para otro agente, puede hacerse un ajuste adicional para dar cuenta de las diferencias en Kd o parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos. Para algunos agentes, se determinan empíricamente las dosificaciones equivalentes a partir de la dosis conseguida para alcanzar el mismo criterio de valoración en un modelo animal o un ensayo clínico.

35 Los agentes peptídicos, tales como Tat-NR2B9c, se suministran preferiblemente por infusión en un vaso sanguíneo, más preferiblemente por infusión intravenosa. Para el agente quimérico Tat-NR2B9c, es un tiempo de infusión preferido que proporciona un equilibrio entre estas consideraciones de 5-15 minutos, y más preferiblemente 10 minutos. Debería entenderse que los tiempos indicados incluyen un margen de error de $\pm 10\%$. Los tiempos de infusión no incluyen cualquier tiempo extra para difusión por lavado de cualquier gotita restante de una difusión inicial que haya continuado de otro modo hasta su terminación. Los tiempos de infusión de Tat-NR2B9c pueden servir también como guía para otros agentes farmacológicos, opcionalmente ligados a péptidos de internalización, particularmente variantes cercanas de Tat-NR2B9c, como se discute anteriormente.

45 El inhibidor de PSD-95 puede administrarse en forma de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se fabrican típicamente en condiciones de BPF. Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferentemente estériles (p. ej., esterilización por filtración del péptido) y libres de pirógenos. Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de dosificación unitaria (concretamente, la dosificación para una única administración). Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que faciliten el procesamiento de agentes quiméricos en preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

60 Una formulación ejemplar del agente quimérico Tat-NR2B9c contiene el péptido en solución salina normal (solución

salina al 0,8-1,0 % y preferiblemente al 0,9 %) o solución salina tamponada con fosfato a una concentración de 10-30 mg/ml, por ejemplo 16-20 o 18 mg/ml o 20 mg/ml. Cuando se almacena congelada, tal composición es estable (degradación o agregación insignificante del péptido) durante un periodo de cuatro años o más. Aunque pueden añadirse excipientes adicionales, la solución salina normal o solución salina tamponada con fosfato sin tales excipientes es suficiente para obtener esta estabilidad. Para uso, se descongela tal composición y se diluye en un mayor volumen de solución salina normal para infusión a un vaso sanguíneo.

Son de uso clínico muchos ejemplos de agente farmacológico para reperfusión. Tales agentes pueden usarse en los presentes métodos de combinación de acuerdo con sus formulaciones, dosis, vías de administración y frecuencia de administración convencionales (véase Physician's Desk Reference y los prospectos aplicables). Por ejemplo, pueden administrarse tPA u otros agentes trombolíticos por vía intravenosa a una dosis de, p. ej., 0,5-1,5 mg/kg, preferiblemente de 0,9 mg/kg en seres humanos. Pueden procurarse también tPA y otros agentes trombolíticos por vía intraarterial preferiblemente a una dosis de 0,02-0,1 mg/kg/hora en pacientes humanos durante hasta 36 horas. Pueden administrarse también tPA y otros agentes trombolíticos directamente a un sitio de flujo sanguíneo deficiente, p. ej. un émbolo en el cerebro, para el que la dosis preferida es de 2 mg en pacientes humanos (o menos en un paciente con un peso menor de 30 kg). La administración localizada es preferiblemente mediante un catéter. La administración directa al sitio de infarto reduce la exposición potencial de los inhibidores de PSD-95 peptídicos a la degradación proteolítica. Igualmente, pueden emplearse métodos mecánicos de reperfusión de acuerdo con la práctica convencional.

Ejemplos

20 **Ejemplo 1:**

Neuroprotección después de apoplejía en primates cercopitécidos girencefálicos.

Introducción

Se usaron primates no humanos girencefálicos de orden superior (PNH) que portan similitudes genéticas, anatómicas y de comportamiento con los seres humanos y se ensayó la neuroprotección por inhibidores de PSD-95, compuestos que desacoplan la proteína de densidad posináptica PSD-95 de las rutas de señalización neurotóxicas. Aquí se muestra que el daño por apoplejía puede prevenirse en PNH en que se administra un inhibidor de PSD-95 después del inicio de la apoplejía. Este tratamiento reducía los volúmenes de infarto como se calibró por toma de imágenes por resonancia magnética (IRM) e histología, conservaba la capacidad de las células isquémicas de mantener la transcripción génica en cribados de todo el genoma de tejido cerebral isquémico y conservaba significativamente la función neurológica en ensayos de neurocomportamiento. El grado de neuroprotección de tejido por IRM correspondía fuertemente con la conservación de la función neurológica, apoyando el dictado no probado de que la integridad del tejido cerebral puede reflejar el resultado clínico funcional. Los hallazgos establecen que son inequívocamente conseguibles la neuroprotección de tejido y el resultado clínico funcional mejorado en PNH girencefálicos usando inhibidores de PSD-95.

35 *Flujo y valoraciones experimentales generales*

Se realizaron todos los experimentos con ocultación de la asignación y valoración con anonimato de todos los resultados clínicos. La medida de resultado clínico primario era el volumen de infarto a los 30 días medida por un estudio de IRM potenciado en T2. Los resultados clínicos secundarios anatómicos eran los volúmenes de infarto a las 4 h y 24 h por IRM de toma de imágenes potenciada en difusión (IPD), a las 24 h por MRI a T2 y a los 30 días por IRM a T2 e histología. Se midieron los resultados clínicos de neurocomportamiento a lo largo del periodo de observación de 30 días usando la escala de apoplejía de primates no humanos (NHPSS) y una batería sensorimotora de tareas que comprenden la tarea de Hill y Valley, la tarea de dos tubos y la tarea de 6 pocillos. Se presenta en la Figura 1A un esquema para los tratamientos y valoraciones, y sigue una descripción después. Los tiempos de oclusión de la arteria cerebral media variaron entre experimentos como se describe a continuación.

45 Se aleatorizaron los macacos para recibir 10 ml de una infusión intravenosa de Tat-NR2B9c (2,6 mg/kg) o placebo (solución salina al 0,9 %) empezando 1 h o 3 h después del inicio de una OACM de 90 min. La dosis seleccionada para PNH se aproximó a partir de cálculos de una "dosis equivalente de primate" extrapolada de dosis anteriores usadas en estudios de rata y estaba basada en la normalización de las diferencias interespecie en el área superficial corporal.

50 Se transfirieron los animales al escáner de IRM a los 15 min de la OACM y en todos se tomaron imágenes de perfusión para cuantificar el volumen cerebral desprovisto de flujo de sangre durante la OACM (tejido en riesgo). Adicionalmente, se realizó una angiografía de RM (ARM) para confirmar la OACM. Se efectuó una segunda ARM 90 minutos después de terminar la OACM para confirmar la reperfusión de la ACM, seguido de toma de imágenes de difusión a las 4 h. Se despertaron entonces los animales y se dejaron recuperar. Se volvieron a anestesiarse y se volvieron a tomar imágenes a las 24 h y 30 días. Se asignaron las puntuaciones de NHPSS a las 8 h de la OACM y hasta 30 días, y se realizaron las pruebas neurológicas restantes los días 7 y 14 o 30.

No había diferencias significativas en los parámetros fisiológicos entre los grupos de los experimentos, o en el volumen

de tejido en riesgo entre los grupos de fármaco y placebo, como se determina por toma de imágenes de reperfusión al cabo de 15 min de OACM.

5 Se realizaron las valoraciones neurológicas a lo largo de los periodos de observación de 14 a 30 días usando la escala de apoplejía de primates no humanos (NHPSS) y, en algunos casos, una batería sensorimotora de tareas que incluyen la tarea de Hill y Valley, la tarea de dos tubos y la tarea de seis pocillos. La NHPSS es un compuesto de calificaciones análogas a la escala de apoplejía del NIH usada en ensayos de apoplejía humana. Una puntuación de 41 puntos representa una deficiencia neurológica bilateral grave y 0 es normal. Las pruebas restantes miden una combinación de fuerza global de la extremidad, función motora fina y la influencia de una negligencia unilateral o defecto de campo visual.

10 *El tratamiento con Tat-NR2B9c reduce la isquemia cerebral y puede alargar la ventana de tiempo para terapia de reperfusión más allá de la ventana de 4,5 horas útil actual para el uso de tPA.*

15 Actualmente, el único tratamiento ampliamente aprobado para apoplejía isquémica aguda es la reperfusión de arterias cerebrales ocluidas usando infusión intravenosa del agente fibrinolítico rt-PA (activador de plasminógeno de tejido recombinante). La reperfusión convencional con rt-PA intravenoso es la más beneficiosa para mejorar los resultados clínicos cuando se administra al cabo de 90 min después del inicio de la apoplejía, y el beneficio disminuye después de ello hasta que es marginal o nulo a las 4,5 h. Esta estrecha ventana para la utilidad de la reperfusión limita el número de pacientes que podrían beneficiarse. Por tanto, es una aplicación potencial del tratamiento temprano con un neuroprotector alargar el intervalo durante el cual puede ser obtenible beneficio clínico de la terapia de reperfusión. Los neurocirujanos y neurointervencionistas pueden usar la terapia de reperfusión fuera de la ventana estándar si la condición del cerebro indica que hay aún cerebro útil para salvar y sería seguro hacerlo sin arriesgar una hemorragia. Para examinar esto, se evaluó en PNH si la administración de Tat-NR2B9c 60 min después del inicio de la OACM podría mejorar el resultado clínico de la apoplejía cuando se retarda la reperfusión hasta el punto temporal de 4,5 h, al que el rt-PA ya no es de beneficio significativo en seres humanos (véase también Cook et al., Nature. 483, 213-7 2012).

25 Se sometieron 6 macacos a OACM permanente y se trataron con Tat-NR2B9c o con placebo empezando a los 5 minutos después del inicio de la isquemia. Se colocaron los animales en el escáner de IRM y se obtuvieron IRM de IPD cada 15 min (Figura 2A). El volumen de cerebro en que la hiperintensidad de IPD era detectable aumentaba con el tiempo en ambos grupos. Sin embargo, el tratamiento con Tat-NR2B9c atenuaba la tasa de este aumento en aproximadamente dos veces (Fig. 2A; constantes temporales= $2,20 \pm 0,28$ h y $4,50 \pm 0,54$ para control y Tat-NR2B9c, respectivamente; $p= 0,019$). Incluso después de una OACM de 4,5 horas, los animales tratados con Tat-NR2B9c mostraban una reducción significativa del tamaño de infarto por IRM y examen de T2 a las 48 horas y 7 días (Figura 1B-D). Además, dentro del volumen isquémico, la intensidad de IPD en los cerebros de animales tratados con Tat-NR2B9c permanecía menor que la de los controles no tratados, sugiriendo que el tejido dentro del volumen de infarto mantenía una mejor integridad (Figura 2B). Estos datos proporcionan evidencias de que permanece cerebro que puede salvarse y que la administración de fármacos o terapia de reperfusión mejoraría probablemente la reperfusión y supervivencia de los tejidos cerebrales a tiempos en que normalmente no se considerarían debido a estar fuera de la ventana de tiempo eficaz. Proporcionan también evidencias de que el Tat-NR2B9c puede alargar el tiempo útil de reperfusión del cerebro para salvar el tejido restante.

40 *El Tat-NR2B9c reduce significativamente los volúmenes de infarto y los déficits neurológicos en primates no humanos sometidos a una apoplejía de 90 minutos*

45 Se ensayó en este modelo un estudio posterior que observa el efecto de Tat-NR2B9c cuando se procura después de 1 h después de una apoplejía isquémica. Se aleatorizaron 20 macacos para recibir una infusión intravenosa de 10 min de Tat-NR2B9c (2,6 mg/kg) o placebo (solución salina al 0,9 %) empezando 1 hora después del inicio de una OACM de 90 min. La dosis seleccionada para PNH se aproximó a partir de cálculos de una “dosis equivalente de primate” extrapolada a partir de dosis anteriores usadas en estudios de rata y estaba basada en la normalización de las diferencias interespecie en el área superficial corporal.

50 Se transfirieron los animales al escáner de IRM al cabo de 15 min de OACM y en todos se tomaron imágenes de perfusión para cuantificar el volumen de cerebro desprovisto de flujo sanguíneo durante la OACM (tejido en riesgo). Adicionalmente, se realizó una angiografía de RM (ARM) para confirmar la OACM. Se efectuó una segunda ARM para confirmar la reperfusión después de 90 min de OACM, seguido de toma de imágenes de difusión a las 4 h. Se despertaron entonces los animales y se dejaron recuperar. Se volvieron a anestesiarse y se volvieron a tomar imágenes a las 24 h y 30 días. Se asignaron puntuaciones de NHPSS al cabo de 8 h de OACM y hasta 30 días, y se realizaron las pruebas neurológicas restantes los días 7 y 30.

55 4 de los 10 animales que recibieron placebo murieron al cabo de 48 h de sus apoplejías debido a edema cerebral y herniación uncal. Tres animales tratados con Tat-NR2B9c murieron como resultado de complicaciones quirúrgicas/anestésicas no relacionadas con la apoplejía o el fármaco. Ninguno se excluyó del análisis de “intención de tratar” (ITT). Todos los datos faltantes debido a las mortalidades tempranas se atribuyeron a reflejar los volúmenes de infarto mayores posibles y las peores puntuaciones neurológicas. Aunque este enfoque sesga contra la detección de un efecto de tratamiento significativo, es el más conservador y el que más refleja el empleado en ensayos clínicos

humanos.

No había diferencias entre los grupos de fármaco y placebo en los parámetros fisiológicos o en el volumen de tejido en riesgo como se determinó por toma de imágenes de perfusión al cabo de 15 min de OACM (Fig. 6A). Sin embargo, a las 24 h, los animales tratados con Tat-NR2B9c exhibían una reducción significativa del volumen de infarto en comparación con el placebo por toma de imágenes IPD (44,0 % de reducción; $p=0,039$; Fig. 6B) y por toma de imágenes potenciada en T2 (37,4 % de reducción, $p=0,010$; Fig. 6B, C). Esta reducción en el volumen de infarto persistía, como se reflejaba por las IRM potenciadas en T2 de 30 días (38,7 % de reducción, $p=0,013$; Fig. 6C) y por la evaluación histológica a los 30 días (Fig. 6D; 59,3 % y 73,6 % de reducción del volumen de infarto cuando se evalúa por ITT y con cada mortalidad retirada, respectivamente; $p<0,001$). Debido a que los PNH, como los seres humanos, pueden tener infartos variables después de la OACM, se normalizó el volumen de infarto de cada animal a su defecto de perfusión de IRM medido al cabo de 15 min de OACM. Esta normalización revelaba que el tratamiento con Tat-NR2B9c reducía los infartos a un 55 % del volumen en riesgo a las 24 h como se calibra por toma de imágenes IPD, y a un 70 % a los 30 días como se mide por IRM potenciada en T2 (Fig. 6E). Los volúmenes de infarto calculados a partir de la IRM de IPD a las 24 h se correlacionaban bien con aquellos obtenidos del análisis histológico a los 30 días ($R=0,691$, $p<0,01$).

Se realizaron valoraciones neurológicas a lo largo del periodo de observación de 30 días usando la escala de apoplejía de primates no humanos (NHPSS) y una batería sensorimotora de tareas que incluyen la tarea de Hill y Valley, la tarea de elección de dos tubos y la tarea de seis pocillos. La NHPSS es un compuesto de calificaciones análogas a la escala de apoplejía del NIH usada en ensayos de apoplejía humana. Una puntuación de 41 puntos representa una deficiencia neurológica bilateral grave y 0 es normal. Las pruebas restantes miden una combinación de fuerza global de la extremidad, función motora fina y la influencia de una negligencia unilateral o defecto de campo visual.

Los animales tratados con Tat-NR2B9c exhibían puntuaciones de NHPSS mejoradas desde la valoración más temprana a las 8 h después del inicio de la isquemia y a lo largo del periodo de observación de 30 días ($P=0,018$, ANOVA de medidas repetidas de dos factores; Fig. 6F). El desempeño en la tarea de elección de 2 tubos volvió a los niveles antes de la apoplejía en animales tratados con Tat-NR2B9c, pero permaneció completamente deficiente en el grupo de placebo, sugiriendo que el salvamiento del cerebro prevenía la "extinción", la tendencia de la atención por artículos en el hemiespacio ipsilesional de eclipsar la atención por artículos en el hemiespacio contralesional. El tratamiento con Tat-NR2B9c mejoraba significativamente también el desempeño de animales en las tareas de 6 pocillos y escalera de Hill y Valley en la extremidad superior izquierda. El desempeño de la extremidad superior derecha mostraba también mejoras, sugiriendo una atención y capacidad de percepción globales mejoradas.

El Tat-NR2B9c es eficaz para reducir el tamaño de infarto y los déficits neurológicos en apoplejías graves

Se demostró a continuación la eficacia de Tat-NR2B9c en apoplejías que duraban más del límite de la eficacia de reperfusión con tPA intravenoso, 4,5 horas. Se aleatorizaron 12 macacos para recibir una infusión intravenosa de 10 min de Tat-NR2B9c (2,6 mg/kg) o placebo (solución salina al 0,9 %) empezando 1 h después del inicio de una OACM de 4,5 h. Por lo demás, los métodos eran similares al primer estudio excepto por el momento de las IRM y porque las valoraciones de toma de imágenes y neurológicas finales se realizaron a los 7 días.

No había mortalidades ni diferencias entre los grupos de fármaco y placebo en los parámetros fisiológicos o en el volumen de tejido en riesgo tras OACM (Fig. 7A). Sin embargo, a pesar del intervalo isquémico prolongado, los animales tratados con Tat-NR2B9c exhibían una reducción significativa de los volúmenes de infarto en comparación con el placebo cuando se evaluaban por toma de imágenes a T2 e IPD a las 48 h y por toma de imágenes potenciada en T2 a los 7 días (Fig. 7B-E). Además, los animales tratados con Tat-NR2B9c exhibían puntuaciones de NHPSS mejoradas desde la valoración más temprana a las 12 h después del inicio de la isquemia y a lo largo del periodo de observación de 7 días ($P<0,001$; ANOVA de medidas repetidas de dos factores; Fig. 7F), y tendían a un mejor desempeño en las tareas de 6 pocillos y escalera de Valley. Estos resultados sugieren que el tratamiento temprano con Tat-NR2B9c puede aumentar la ventana durante la que la reperfusión puede tener beneficios funcionales, incluso en el modelo de OACM grave en que se limita la circulación colateral y la penumbra es pequeña. El tamaño del beneficio de tratamiento a las 4,5 h después de la apoplejía como se calibra por IRM y por evaluaciones neurológicas sugiere una utilidad potencial de la neuroprotección temprana para alargar los beneficios de la terapia de reperfusión incluso más allá de la ventana de 4,5 h.

El Tat-NR2B9c es eficaz para reducir la isquemia y los déficit neurológicos después de apoplejía cuando se procura 3 horas después del inicio de la apoplejía

Aunque el tratamiento con un neuroprotector al cabo de 60 min del inicio de la apoplejía es factible en un pequeño subconjunto de pacientes, alargar la ventana terapéutica de administración beneficiaría una proporción mucho mayor de víctimas de apoplejía. Por tanto, se determinó si la administración de Tat-NR2B9c a las 3 h después de la apoplejía es beneficiosa en el entorno de una OACM prolongada. En seres humanos, la reperfusión con rtPA i.v. administrado 3 h después del inicio de la apoplejía es beneficiosa incluso en ausencia de neuroprotección. Esto certifica la existencia de una penumbra salvable en ese momento en muchos pacientes. Se reprodujo este escenario clínico experimentalmente usando el modelo de OACM en que los PNH exhiben una discordancia de IPP/IPD significativa (penumbra) a las 3 h. Como en seres humanos, tal discordancia avanza a infarto en ausencia de tratamiento.

Se aleatorizaron 24 macacos para recibir una infusión intravenosa de 10 min de Tat-NR2B9c (2,6 mg/kg) o placebo (solución salina al 0,9 %) empezando 3 h después del inicio de una OACM de 3,5 h. Los otros métodos no se cambiaron, excepto porque las valoraciones de toma de imágenes y neurológicas finales se realizaron a los 14 días. No hubo mortalidades ni diferencias en los parámetros fisiológicos o el volumen de tejido en riesgo tras OACM entre los grupos (Fig. 8A). Sin embargo, a pesar tanto del intervalo isquémico prolongado como del tratamiento retardado con Tat-NR2B9c, los animales tratados con fármaco exhibían reducciones significativas de los volúmenes de infarto en comparación con placebo como se evaluó por criterios anatómicos (IRM) a las 48 h y los 14 días (Fig. 8B-E). Los PNH tratados con Tat-NR2B9c exhibían también puntuaciones de NHPSS mejoradas a lo largo del periodo de observación de 14 días ($P=0,004$ ANOVA de medidas repetidas de dos factores; Fig. 8F), y tendían a un mejor desempeño en las tareas de 6 pocillos y la escalera de Valley. Por tanto, el tratamiento con Tat-NR2B9c 3 h después del inicio de la apoplejía es eficaz para reducir el daño por apoplejía en PNH. Como esta ventana terapéutica es práctica en las víctimas de apoplejía, el tratamiento con un inhibidor de PSD-95 puede constituir una estrategia terapéutica clínicamente practicable y ser más eficaz que el uso de reperfusión sola.

Conclusiones

El Tat-NR2B9c puede reducir eficazmente la gravedad del daño después de apoplejía en cerebros de orden superior como monos y seres humanos. Examinar las imágenes de IRM de IPD y T2 en puntos temporales después de la apoplejía demuestra que las áreas de isquemia están significativamente menos dañadas que aquellas en animales no tratados. Además de la reducción de los volúmenes de las lesiones, esto se sugiere por imágenes menos intensas por IRM-IPD y una intensidad de señal reducida en las imágenes de T2. Estos datos proporcionan evidencias de que queda aún cerebro por salvar y que la terapia de reperfusión puede seguir permitiendo penetrar a la sangre y actuar sobre una mayor porción del cerebro de lo que sería capaz de otro modo sin el tratamiento con Tat-NR2B9c. Por tanto, la terapia de reperfusión, especialmente con fármacos tales como tPA, es capaz de penetrar mejor y ser eficaz aumentando adicionalmente el flujo sanguíneo a las áreas afectadas del cerebro.

Métodos de primates no humanos

Modelo de apoplejía: Se anestesiaron los animales (isoflurano al 1,0-2,5 %), se intubaron y se ventilaron. La monitorización no invasiva incluía PS por manguito de pata, CO₂ espiratorio final, saturación de O₂, ECG y temperatura por sonda rectal. Se mantuvo la temperatura ($37 \pm 0,5$ °C) por manta calefactora. Se usó una línea en la arteria femoral para monitorizar la PS y los gases sanguíneos. Se efectuó la OACM en macacos cangrejeros (3,0-4,0 kg) usando una craneotomía pterional derecha y taponando la ACM derecha en la fisura silviana con un clip de aneurisma de titanio de 5 mm distal a la rama orbitofrontal y al origen de las arterias lenticuloestriadas.

Definición del tejido de penumbra isquémico: Se definió operativamente el tejido de penumbra como tejido que no está todavía infartado en el momento de recolección de tejido, pero que progresa consistentemente hacia un infarto posterior. Debido a que la penumbra podría ser variable en macacos, se tomaron 8 biopsias de 2x2 mm 1 h o 6 h después de la OACM de la corteza a lo largo de la distribución vascular de la ACM completa ipsilateral a la apoplejía y también contralateral a la apoplejía de sitios que replican los tomados de la corteza isquémica. Se fotografiaron las posiciones biopsiadas. Para determinar cuál de las 8 biopsias representa tejido de penumbra, se transfirieron los animales a un escáner de IRM 7T y se tomaron imágenes potenciadas en difusión (IPD), a T2 y de perfusión al cabo de 15 minutos después de la biopsia y a las 5,75 h. El tejido de penumbra a 1 h se definió como tejido desprovisto de infarto que avanza hacia infarto a las 5,75 h por IPD. El tejido de penumbra a las 6 h se definió como tejido dentro de los límites del defecto de perfusión de RM, pero sin IPD ni hiperintensidad a T2 demostrada. El uso de IRM para definir la penumbra de los PNH es esencial ya que la cantidad de tejido salvable se contrae a las 6 h.

Procedimientos de IRM generales: Se efectuó la toma de imágenes en un sistema Bruker BioSpec de 7 Tesla que funciona con el software Paravision 4.0 y usa una espiral de gradiente B-GA20S. Se usó una espiral de volumen de transmisión/recepción por cuadratura de 15,5 cm de diámetro interno para los exámenes de PNH. Se intubaron los PNH, se ventilaron y se tomaron imágenes boca abajo. Se mantuvo la monitorización fisiológica de principio a fin. El protocolo proporciona apilamientos de imágenes potenciadas en T2, de perfusión y potenciadas en difusión bidimensionales en un plano axial. La toma de imágenes potenciada en T2 usa el método RARE, también denominado eco de espín rápido (TE/TR= 84/5000 ms, factor rare= 14, matriz de 225x225 sobre un campo de visión de 9 cm para una resolución de 400x400x1500 micrómetros). La toma de imágenes potenciada en difusión usa una técnica de toma de imágenes ecoplanar de múltiples disparos de eco de espín (TE/TR= 32/10000 ms, 9 disparos de EPI, 250 kHz de ancho de banda, 3 direcciones de difusión ortogonal a $b=1000$ s/mm², 10 medias con una matriz de 180x180 sobre un campo de visión de 9 cm para resolución de 500x500x1500 micrómetros). Se efectuó la toma de imágenes de perfusión usando un método de perfusión potenciado en susceptibilidad de contraste potenciado dinámico (T2*EPI, TE= 18 ms, 2 disparos de EPI, resolución temporal de 2 s y 90 repeticiones, matriz de 180x180 sobre un campo de visión de 9 cm para una resolución de 700x700x1500 micrómetros sobre 5 cortes contiguos). Para exámenes de perfusión, se inyectó por vía intravenosa un bolo de gadolinio (0,1 mmol/kg), empezando en la tercera repetición con un tiempo de inyección total de 7 s por inyección intravenosa periférica. Se posprocesan las imágenes de difusión en MATLAB (Natick, MA, EE. UU.), generando una imagen media a partir de tres imágenes de $b=1000$ s/mm² para calcular un mapa del coeficiente de difusión aparente (CDA). Se calcularon los volúmenes de apoplejía usando software de contorno ITK-Snap (Pittsburgh, PA, EE. UU.) con apilamientos de imágenes de difusión media reconstruidas en tres dimensiones. Se procesó la toma de imágenes de perfusión usando el software PerfTool para

producir mapas de flujo sanguíneo cerebral.

Diseño experimental y análisis estadístico: Se efectuaron los experimentos de apoplejía en cumplimiento de las “recomendaciones para asegurar una buena investigación científica” del comité de Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Se basó un tamaño de muestra de 10 animales/grupo en el deseo de detectar un 40 % de diferencia en los volúmenes infartados entre fármaco y placebo basándose en IRM potenciada en T2 de 30 días a una potencia de 0,8, $\alpha=0,05$ y una desviación estándar asumida del 30 % de las medias del grupo. El análisis primario se basó en un enfoque de intento de tratar, sin exclusiones de ningún animal inscrito. Se aleatorizaron en bloques 20 macacos cangrejeros a tratamiento con fármaco o placebo (solo vehículo). Los investigadores responsables de la inducción, mantenimiento y reversión de la isquemia, para decisiones respecto al cuidado (incluyendo el sacrificio temprano) de los animales experimentales y la valoración de todos los resultados clínicos, desconocían el grupo experimental al que pertenecía un animal. Se midieron las diferencias entre grupos usando la prueba de t de Student, o ANOVA de medidas repetidas, según fuera necesario. Los valores faltantes debidos a muerte prematura o incapacidad de completar una tarea se atribuyeron a reflejar la peor puntuación conseguible en la tarea o el máximo volumen de apoplejía posible, como se define por el mayor volumen de infarto conseguido en todos los animales.

Valoraciones neurológicas: Se realizaron estas usando la escala de apoplejía de primates no humanos (NHPSS) validada anteriormente y una batería sensorimotora de tareas que incluyen la tarea de Hill y Valley, la tarea de dos tubos y la tarea de 6 pocillos. La puntuación de NHPSS es un compuesto de calificaciones de estado de consciencia, reacción de defensa, reflejo de agarre, movimiento de extremidades, marcha, giros, bradicinesia, equilibrio, negligencia, corte del campo visual/hemianopsia y debilidad facial, muchas de las cuales se incorporan también en el sistema de puntuación de apoplejía del NIH en seres humanos. De un total de 41 puntos, 0 corresponde al comportamiento normal y 41 a deficiencia neurológica bilateral grave. Las pruebas restantes se modificaron a partir de ensayos desarrollados para tití común (*Callithrix jacchus*) como se describen en otro lugar. Además de evaluar las funciones sensorimotoras más finas, ensayamos también la extinción y deficiencia/negligencia espacial de percepción. En experimentos piloto en 5 macacos sometidos a una OACM de 90 min, los resultados de NHPSS demostraron un pico inicial en la puntuación (media 36,3, EEM= 5,7) que persistía durante las primeras 36 horas y caía entonces gradualmente a una meseta entre los 14 y 30 días (media= 14,36, EEM= 3,2). El ensayo sensorimotor reveló que los animales tenían negligencia espaciotemporal izquierda grave y hemiparesis izquierda que mostraba una pequeña recuperación con el tiempo a los 7 y 30 días después de la apoplejía. Estos déficits eran evidentes como retardos significativos en la terminación de las tareas de 6 pocillos (retardo medio de 7,8x y 5,33x del valor basal) y de Hill y Valley para el brazo izquierdo (retardo medio de 8,2x y 6,4x del valor basal en el segmento Valley y retardo medio de 7,6x y 5,8x del valor basal en el segmento Hill).

Ejemplo 2: Los inhibidores de PSD-95 congelan la evolución de la penumbra isquémica en IRM potenciada en perfusión/difusión

El fin de este ejemplo era demostrar que la neuroprotección usando un inhibidor de PSD-95 es factible sin aumento del flujo sanguíneo cerebral (reperfusión) en una OACM permanente experimental.

Métodos: Se sometieron ratas a OACMp y se trataron 1 h después de ello con una infusión intravenosa de 5 minutos del inhibidor de PSD-95 Tat-NR2B9c (7,5 mg/kg) o solución salina. Se obtuvieron las IRM de perfusión (IPP) e IRM de difusión (IPD) con un sistema Bruker de 4,7 T a 30, 45, 70, 70, 120, 150 y 180 minutos después de la OACMp para determinar el flujo sanguíneo cerebral (FSC) y los mapas de coeficiente de difusión aparente (CDA). A las 24 horas, se puntuaron neurológicamente los animales, se sacrificaron y se seccionaron los cerebros y se tiñeron con CTT para establecer los volúmenes de infarto correctos para edema. Se midió el efecto de Tat-NR2B9c sobre los niveles de ATP in vitro en neuronas sometidas a POG como se describe (Aarts et al. (2002), anteriormente) y se valoraron los niveles de ATP usando un ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo según las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI).

Resultados: Gases sanguíneos, electrolitos y glucosa sanguínea no diferían entre los dos grupos. Las neuropuntuaciones a las 24 horas mostraron que el grupo de Tat-NR2B9c tenía una neuropuntuación significativamente mejorada en comparación con placebo. La Figura 3 indica la discordancia absoluta entre los volúmenes de lesión derivados de FSC y CDA. Respecto a los animales con placebo, los volúmenes de lesión discordantes de CDA/FSC eran significativamente mayores a partir de 90 minutos después de la oclusión en el grupo de Tat-NR2B9C. El análisis de la región de interés de los valores de FSC relativa en las regiones de núcleo y penumbra cortical no mostraron un cambio significativo en el FSC relativo entre puntos temporales en cualquier grupo de tratamiento, indicando un efecto nulo del tratamiento con Tat-NR2B9c sobre el FSC.

La evaluación espaciotemporal de la apoplejía isquémica descrita por los volúmenes de lesión por CDA y FSC derivados de umbral se correlacionaba bien con los volúmenes de lesión derivados de CTT en animales tratados con placebo. En animales tratados con Tat-NR2B9c, el volumen de lesión por CDA aumentaba de 25 minutos a 45 minutos después de OACM como en el grupo de placebo. Sin embargo, en el punto temporal de 70 minutos, justo antes del inicio del fármaco Tat-NR2B9c, se atenuaba el aumento. A los 120 minutos y más allá, la lesión por CDA en animales tratados con Tat-NR2B9c permanecía significativamente menor que en ratas tratadas con placebo. Los volúmenes derivados de FSC y volúmenes de infarto de CTT eran significativamente menores en animales con Tat-NR2B9c. La Figura 5 indica la discordancia absoluta entre los volúmenes de lesión derivados de FSC y CDA. Respecto a los

animales con placebo, los volúmenes de lesión de discordancia CDA/FSC eran significativamente mayores a partir de 90 minutos después de la inclusión en el grupo de Tat-NR2B9c. Estos resultados sugieren que el Tat-NR2B9c no reduce el tamaño de infarto ni mejora el resultado médico contrayendo el tamaño de la penumbra isquémica, como aparecería si el flujo de sangre perinfarto aumentara con el tratamiento. En lugar de ello, se sugiere que Tat-NR2B9c funciona como un neuroprotector que potencia la resiliencia del tejido isquémico ante la isquemia existente.

Los cultivos neuronales primarios tratados con Tat-NR2B9c 100 nM no demostraron muerte celular ni niveles de ATP significativos en comparación con controles salinos en condiciones normotóxicas. Sin embargo, el pretratamiento con Tat-NR2B9c 100 nM dio como resultado una reducción de 26 % de la muerte celular en comparación con controles salinos 20 horas después de POG (Figura 4A). Los niveles de ATP eran un 34 % mayores en los cultivos tratados con Tat-NR2B9c 1 hora después de POG en comparación con cultivos tratados con solución salina (Figura 4B).

Discusión: La administración de Tat-NR2B9c 60 minutos después de OACM en ratas o ratones daba como resultado una reducción significativa del volumen de hipointensidad de CDA y se correlacionaba con una reducción del volumen de infarto por CTT. La reducción del volumen de apoplejía estaba asociada con una mejora significativa de las puntuaciones neurológicas 24 horas después de OACM. Estas mejoras anatómicas y neurológicas en el resultado clínico de la apoplejía después de OACM se consiguieron sin afectar al flujo sanguíneo cerebral, estableciendo que la terapia de apoplejía es conseguible por neuroprotección incluso sin aumento del flujo sanguíneo. Por tanto, se espera que acoplar el tratamiento con inhibidores de PSD-95 con estrategias de reperfusión, físicas o terapéuticas, es probable que potencie adicionalmente el salvamento de tejidos neuronales o el cerebro después de apoplejía.

Después del inicio de la isquemia, hay una rápida caída de los niveles de ATP intracelular en neuronas y glía que está asociado a la desestabilización de los mecanismos homeostáticos, insuficiencia de función celular y muerte celular. Con el tratamiento con inhibidor de PSD-95, se daba como resultado un agotamiento de ATP reducido. Estos resultados suponen que el tratamiento con inhibidor de PSD-95 conserva la penumbra isquémica, proporcionando un enfoque viable para alargar la ventana terapéutica o temporal de terapias de reperfusión.

Ejemplo 3: Una infusión única de 4-5 minutos de Tat-NR2B9c es suficiente para desestabilizar el complejo NMDAR:PSD-95 en cerebros de roedor sometidos a apoplejía.

Compendio de métodos:

Inhibidores de densidad posináptica 95. Tat-NR2B9c es un péptido sintético compuesto por los 9 aminoácidos C-terminales de la subunidad NR2B (KLSSIESDV) fusionados con el dominio de transducción de proteína de membrana celular de la proteína Tat de VIH-1 (YGRKKRRQRRR; Tat). Un control incapaz de unirse a PSD95 es un péptido similar en que los 3 aminoácidos terminales de la secuencia del extremo C de NR2B se cambiaron de SDV a ADA; este control se denomina péptido "ADA". Se administraron los péptidos por vía intravenosa en solución salina durante 4 a 5 minutos por un individuo desconocedor de la identidad del compuesto y su dosis.

Animales. Se usaron ratas Sprague-Dawley macho adultas (250 a 300 g; Charles River Laboratories, Sherbrooke, Quebec, Canadá) según los procedimientos aprobados por los comités de cuidado animal institucional. Todos los experimentos se efectuaron en animales no en ayunas.

Preparación quirúrgica: Para la oclusión de vasos piales permanente (3PVO), se anestesiaron ratas con ketamina 100 mg/kg, acepromazina 2 mg/kg y xilazina 50 mg/kg. Se intubaron las ratas y se ventilaron (60 ventilaciones/min, volumen corriente de 30 a 35 ml). Se monitorizaron presión sanguínea arterial media, gases sanguíneos, pH y glucosa con un catéter arterial femoral izquierdo. El suministro de fármaco fue a través de la vena de la cola.

Procedimiento experimental. Se sometieron los animales a isquemia de 3PVO. Una hora después de ello, se les inyectó solución salina, 3 nmol/g de Tat-KLSSIEADA (SEQ ID NO:76) o 0,3 nmol/g, 3 nmol/g y 10 nmol/g de Tat-NR2B9c (Tat-KLSSIESDV). Después de una hora más, se recolectó rápidamente la corteza cerebral del lado ipsilateral (apoplejía) y del lado contralateral a la apoplejía. Los animales tratados ficticiamente padecieron solo la craneotomía, pero no apoplejía ni infusión de fármaco. Se realizaron entonces experimentos de Co-IP en el tejido recolectado usando métodos rutinarios. Después de Co-IP con anticuerpos anti-NR2B o anti-PSD95, se sondearon las transferencias con los anticuerpos indicados (anti NR2B, PSD95 y Src). Se efectuaron análisis densitométricos de bandas usando el software Image J. Para medir los efectos de un tratamiento sobre la CoIP de proteínas asociadas, se normalizaron en primer lugar los niveles de cada proteína en la transferencia a los niveles de la proteína que se inmunoprecipitaba (PSD95 o NR2B), y se normalizaron entonces los niveles del lado ipsilateral (apoplejía) a los niveles en el lado contralateral.

Resultados: Se realizó el experimento con 5 duplicados. Se obtuvo tejido de cada duplicado a partir de 6 ratas separadas (una por afección). En cada duplicado, se obtuvo tejido tanto del lado de apoplejía (ipsilateral) como del hemisferio contralateral. No había efecto del tratamiento ficticio (sin apoplejía y sin infusión de fármaco) sobre la coimmunoprecipitación de PSD95 y NR2B como se evaluó por IP efectuadas con anticuerpos de cualquier proteína (Fig. 9A-B mostradas como ejemplo). De forma similar, el tratamiento con el péptido de control Tat-KLSSIEADA no tenía efecto sobre la Co-IP de PSD95 y NR2B. Sin embargo, el tratamiento con Tat-KLSSIESDV inhibía la Co-IP de PSD95 con NR2B de manera dependiente de la dosis (Fig. 9A-B). El grado de inhibición de la Co-IP de PSD95 con NR2B igualaba la potencia de Tat-NR2B9c en la inhibición de apoplejías, en que 0,3 nmol/g es ineficaz para reducir

el tamaño del infarto en este modelo de apoplejía y dosis de 3 o 10 nmol/g eran eficaces. Específicamente, el tratamiento con una dosis de Tat-NR2B9c de 0 nM/g o 0,3 nM/g, que era ineficaz en la reducción del tamaño de apoplejía, no inhibía significativamente la asociación de PSD95 y NR2B. En contraposición, el tratamiento con Tat-NR2B9c a una dosis de 3 nM/g o 10 nM/g, que son eficaces en la inhibición del daño por apoplejía, inhibía significativamente también la asociación de NR2B con PSD95. Como control adicional, se sondeó tejido que se inmunoprecipitó con PSD95 o con NR2B con anticuerpos contra la proteína cinasa asociada a NMDAR Src, una proteína reguladora importante en el complejo de señalización NMDAR25. El tratamiento con Tat-NR2B9c 10nM/g, que disocia NR2B de PSD95 (Fig. 9A-B) no tenía efecto sobre la asociación de PSD95 o de NR2B con Src (no mostrado). Esto indica que las acciones de Tat-NR2B9c en la inhibición de las interacciones de NR2B/PSD95 son específicas, ya que el Tat-NR2B9c no tenía efecto sobre una interacción similar de cualquier proteína con Src.

Conclusiones: En primer lugar, el Tat-NR2B9c entra en el cerebro por el lado de la apoplejía y es capaz de disociar complejos de NR2B/PSD95 preformados en el cerebro isquémico cuando se administra después de una apoplejía. En segundo lugar, el Tat-NR2B9 es capaz de conseguir esto de manera dependiente de la dosis. En tercer lugar, las dosis a las que Tat-NR2B9c consigue una disociación significativa de los complejos de NR2B/PSD95 preformados en el cerebro corresponden a dosis a las que Tat-NR2B9c es neuroprotector en el mismo modelo de apoplejía animal. En cuarto lugar, las dosis a las que Tat-NR2B9c es incapaz de conseguir una disociación significativa de complejos de NR2B/PSD95 preformados en el cerebro son también dosis a las que Tat-NR2B9c no es neuroprotector en el mismo modelo de apoplejía animal. En quinto lugar, el Tat-NR2B9c consigue sus efectos sobre los complejos de NR2B/PSD95 selectivamente (concretamente, este no es un efecto no específico sobre las moléculas de complejo de señalización de NMDAR).

Se efectuó un segundo estudio con el mismo modelo y condiciones de tratamiento para explorar el curso temporal de la desestabilización del complejo de PSD95-NMDAR en neuronas localizadas en regiones del cerebro sometidas a una apoplejía. Como con el estudio anterior, se recolectaron cerebros de rata a las 2, 4, 8, 24 o 48 horas después de oclusión de vaso pial para inducir una apoplejía. La Figura 10 demuestra que el complejo de NMDAR:PSD-95 se desestabiliza durante al menos 8 horas después de una única infusión intravenosa de Tat-NR2B9c y potencialmente 24-48 horas. Por tanto, hay una amplia ventana temporal entre cuando podría administrarse Tat-NR2B9c a un paciente y cuando el paciente puede beneficiarse de la terapia de reperfusión, sea terapéutica o mecánica.

Materiales y métodos detallados

Materiales. NA1 (GMP lote 16511107) y TAT-ADA (YGRKKRRQRRRKLSSIEADA) (SEQ ID NO: 9) se sintetizaron químicamente por Bachem y GeneScript, respectivamente. Todos los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución a > 95 %. Se prepararon soluciones madre de péptido (3 mM o 10 mM) en solución salina estéril y se almacenaron a 4 °C.

Anticuerpos. Inmunoprecipitaciones y Western: anti-NMDA2B de ratón (ab28373; Abcam), anti-PSD95 de conejo (2507; Cell Signaling), anti-NMDA2B de conejo (4212, Cell Signaling), anti-PSD95 monoclonal de ratón (MA1-046, Thermo), anti-Src monoclonal de ratón (ab16885-100) (Abcam). Se usó el kit de inmunoprecipitación de proteína G Dynabeads para las inmunoprecipitaciones (100.07D, Invitrogen). Los anticuerpos secundarios para transferencias Western eran el fragmento F(ab')₂ de anticuerpo IgG de cabra anticonejo de AffiniPure (111-036-047) conjugado con peroxidasa y el fragmento F(ab')₂ de IgG de cabra antirratón de AffiniPure (115-036-006) conjugado con peroxidasa de Jackson ImmunoResearch Lab Inc. Se usaron para este estudio de entre 250 y 300 g de peso. Para oclusión de 3 vasos piales permanente (3PVO), se efectuó como se describe anteriormente 4,26. Brevemente, se anestesiaron ratas con una inyección intramuscular de 0,5 ml/kg de ketamina (100 mg/kg), acepromazina (2 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg), suplementada con un tercio de la dosis inicial según se requiera. Se insertó una sonda de temperatura anal y se colocó el animal sobre una almohadilla de calentamiento mantenida a 37 °C. Se expuso el cráneo mediante una incisión de línea media y se raspó el tejido. Usando un microscopio de disección y un taladro dental neumático, se realizó una ventana craneal de 6 a 8 mm sobre la corteza somatosensorial derecha (2 mm caudal y 5 mm lateral al bregma) perforando un rectángulo a través del cráneo y levantando el trozo de cráneo mientras se mantiene la dura intacta. Las 3 ramas de la arteria cerebral media arteriolar pial alrededor de la corteza de barril se cauterizaron eléctricamente en 2 puntos por arteria a través de la dura. Después de las cauterizaciones, se suturó el cuero cabelludo. Una hora después de la isquemia de 3PVO, se administró a las ratas el fármaco de tratamiento en un total de ~300 ul de solución salina durante 3 min a través de la vena femoral (el volumen exacto para conseguir la dosis de mg/kg diana al animal se determinó por el peso del animal). 1 hora después de la administración del fármaco de tratamiento (2 horas después de la apoplejía) se sacrificaron las ratas usando isoflurano al 3 % mezclado con oxígeno.

Preparación de lisados cerebrales. Se retiraron los cerebros del cráneo y se recolectaron rápidamente tanto el área isquémica de la corteza como una muestra equivalente en el lado contralateral. Se colocó cada muestra de cerebro en 350 ul de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, SDS al 0,1 %, ácido desoxicólico al 0,5 %, NP-40 a 1 % más cóctel inhibidor de proteasa completo (cóctel inhibidor de fosfatasa PhosSTOP, Roche)), se homogeneizó y se colocó en hielo.

Coinmunoprecipitación de NMDAR y sus proteínas asociadas de corteza de rata. Se incubaron lisados de corteza de rata en hielo durante 1 hora y se centrifugaron entonces 20 min a 4 °C (12.000 rpm). Se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos, se incubaron durante una noche a 4 °C con 30 ul de Dynabeads de proteína G (Invitrogen) que se

precargaron con 5 ug de anticuerpos anti-PSD95 o anti-NMDAR (según el protocolo del fabricante, usando los tampones de lavado proporcionados). Se lavaron los complejos de Dynabead-anticuerpo-antígeno cuatro veces y se resuspendieron en 30 ul de tampón RIPA + 10 ul de tampón de carga de PAGE-SDS (2,4 ml de Tris 1 M pH 6,8, 0,8 g de SDS, 4 ml de glicerol al 100 %, azul de bromofenol al 0,1 %, 1 ml de beta-mercaptoetanol, c.s. hasta 10 ml con H₂O). Se calentaron las muestras durante 10 minutos a 75 °C, se colocaron en un imán para retener las perlas y se cargaron entonces los sobrenadantes sobre gel PAGE-SDS para análisis.

PAGE-SDS y transferencia Western. Se resolvieron los inmunoprecipitados aislados usando PAGE-SDS al 10 % y se transfirieron posteriormente a membranas de nitrocelulosa. Se sondearon las membranas con anti-PSD95 a 1:1000, se lavaron entonces y se revelaron usando un kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham/GE Healthcare). Se capturaron imágenes usando un analizador de imagen luminiscente LAS-3000 (Fujifilm) con exposiciones de 30 s a 2 min. Se deshidrataron posteriormente las membranas durante 10 minutos a temperatura ambiente (1,5 % de glicina, 0,1 % de SDS, 1 % de Tween 20 pH 2,2) y se volvieron a bloquear. Se volvieron a sondear entonces las membranas con anticuerpos anti-NMDAR2B (1:1000) y anti-Src (1:500), se lavaron, se revelaron y se capturaron imágenes como anteriormente.

Análisis de imagen. Se analizaron las intensidades de banda en imágenes usando Image J (NIH). Se normalizaron en primer lugar las bandas ipsilateral y contralateral a los niveles de PSD-95 o NR2B inmunoprecipitadas antes de generar relaciones de densidades de banda entre los inmunoprecipitados ipsilateral y contralateral del mismo animal.

Ejemplo 4: Tat-NR2B9c y tPA pueden procurarse simultáneamente o en momentos separados para mejorar los resultados clínicos de la apoplejía.

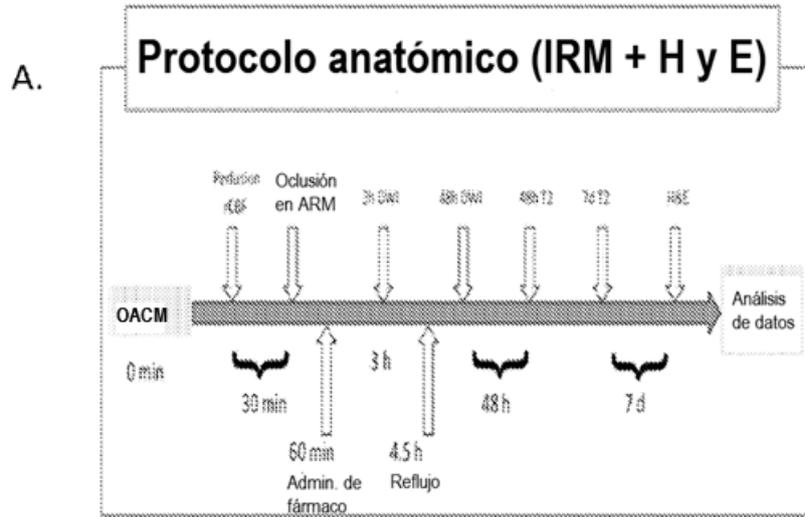
En primer lugar, se efectuó un estudio in vitro para demostrar que Tat-NR2B9c no tiene efecto sobre la lisis de coágulos y que Tat-NR2B9c no afecta a la capacidad o la tasa de tPA de liberar fibrina de los coágulos. Brevemente, se incubó plasma humano que contenía fibrinógeno marcado con ¹²⁵I con diversas concentraciones de Tat-NR2B9c, Tat-NR2B9c + tPA 1500 ng/ml o tPA solo en un tampón que contiene NaCl 100 nM, Na₂HPO₄ 30 nM, NaH₂PO₄ 3 mM, pH7,4 durante 2 horas a 37 °C. Se midió la cuantificación de la liberación de fibrina de coágulos mediante recuento de centelleo de material soluble. El Tat-NR2B9c no lisaba coágulos ni afectaba a la capacidad de tPA de liberar fibrinógeno de coágulos.

Para demostrar que Tat-NR2B9c y tPA podían procurarse simultáneamente en modelos animales de apoplejía, se usó de nuevo el modelo de oclusión PIAL de apoplejía en ratas como anteriormente. Se procuró Tat-NR2B9c como una infusión intravenosa de 4-5 minutos 1 hora después de la apoplejía, y se procuró tPA como se prescribe en seres humanos (10 % de la dosis en peso en forma de bolo seguido del 90 % restante de la dosis procurado como una infusión durante 1 hora) pero con niveles de dosis apropiados para los estudios de roedores (10 veces la dosis humana en peso). Los grupos (n= 10) incluían también animales a los que se procuró tanto Tat-NR2B9c como tPA mediante estas estrategias de dosis simultáneamente, o con tPA iniciado 15 minutos después de la infusión de Tat-NR2B9c. La Figura 11 demuestra que Tat-NR2B9c más tPA es más eficaz que tPA solo cuando se procura simultáneamente o cuando la dosis de Tat-NR2B9c precede a la dosis de tPA. Aunque la eficacia del tratamiento combinado en ratas es similar a la de Tat-NR2B9c solo, la eficacia de los tratamientos combinados refleja probablemente las contribuciones tanto de tPA como de Tat-NR2B9c, porque parte del Tat-NR2B9c se somete a escisión como resultado de la conversión por tPA de plasminógeno en la proteasa plasmina, que es capaz de escindir Tat-NR2B9c en plasma. En otras palabras, los datos son consistentes con la compensación de la actividad perdida como resultado de la escisión de Tat-NR2B9c por plasmina mediante reperfusión mediada por tPA. La escisión de Tat-NR2B9c por plasmina se espera que aparezca en menor extensión en seres humanos que en ratas debido a que la dosis de tPA (en peso) para activación de plasminógeno es 10 veces menor en seres humanos que en ratas. Por tanto, estos datos proporcionan evidencias de que en seres humanos la contribución de tPA puede combinarse con la de Tat-NR2B9c para reducir los efectos dañinos de la apoplejía u otra isquemia del SNC con mayor efecto que cualquier agente solo.

Aunque la invención se ha descrito con detalle con fines de claridad de comprensión, resultará obvio que pueden practicarse ciertas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En la medida de que una o más secuencias están asociadas con un número de acceso en diferentes momentos, se entienden las secuencias asociadas con el número acceso como las de la fecha de presentación eficaz de esta solicitud. La fecha de presentación eficaz es la fecha de la solicitud de prioridad más temprana que divulga el número de acceso en cuestión. A menos que sea evidente de otro modo a partir del contexto, cualquier elemento, realización, etapa, rasgo o aspecto de la invención puede efectuarse en combinación con cualquier otro.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de PSD-95 para uso en el tratamiento de un efecto dañino de isquemia sobre el sistema nervioso central en un sujeto humano que tiene o está en riesgo de isquemia, en el que se efectúa terapia de reperfusión en el sujeto y el inhibidor de PSD-95 y la terapia de reperfusión tratan un efecto dañino de la isquemia sobre el sistema nervioso central del sujeto, en el que el inhibidor de PSD-95 se administra antes de efectuar la terapia de reperfusión, en el que la terapia de reperfusión se efectúa después de determinar que el sujeto reúne los requisitos de reperfusión basándose en la penumbra isquémica y falta de hemorragia como se muestra por análisis de TAC, IRM o TEP, y en el que el inhibidor comprende un péptido que tiene una secuencia aminoacídica consistente en o que comprende KLSSIESDV (SEQ ID NO:5) o KLSSIETDV (SEQ ID NO:43), en el que el péptido está ligado a un péptido de internalización o lipidado, aumentando así el paso del péptido a través de una membrana o la barrera hematoencefálica.
2. El inhibidor de PSD-95 para uso según la reivindicación 1, en el que la isquemia es isquemia cerebral o en el que el sujeto tiene apoplejía o en el que la isquemia es isquemia cardiaca, pulmonar o de miembro importante que afecta al sistema nervioso central al inhibir el flujo sanguíneo a o desde el SNC.
3. El inhibidor de PSD-95 para uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el inhibidor de PSD-95 es tat-NR2B9c.
4. El inhibidor de PSD-95 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la reperfusión se efectúa administrando un agente trombolítico, opcionalmente en el que el agente trombolítico es un activador de plasminógeno, preferiblemente en el que el agente trombolítico es tPA.
5. El inhibidor de PSD-95 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el intervalo entre la administración de PSD-95 y la terapia de reperfusión es de 30 min a 6 h, o en el que la terapia de reperfusión se efectúa más de 3 horas después del inicio de la isquemia.
6. El inhibidor de PSD-95 para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente trombolítico se administra por administración localizada en un sitio de flujo sanguíneo defectuoso o, en el que la terapia de reperfusión es reperfusión mecánica.
7. El inhibidor de PSD-95 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la terapia de reperfusión se efectúa más de 3 horas después del inicio de la isquemia, opcionalmente en el que la terapia de reperfusión se efectúa más de 4,5 horas después del inicio de la isquemia, o en el que la terapia de reperfusión se efectúa más de 4,5 horas y menos de 24 horas después del inicio de la isquemia.
8. El inhibidor de PSD-95 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la terapia de reperfusión se efectúa al menos 12 o al menos 24 horas después del inicio de la isquemia o, en el que la terapia de reperfusión se efectúa 275-690 minutos después del inicio de la isquemia.
9. El inhibidor de PSD-95 para uso según la reivindicación 1, en el que el péptido tiene miristoilación en el extremo N del péptido.
10. Un agente para uso en terapia de reperfusión en un sujeto humano que recibe también un agente que inhibe la unión de PSD-95 a NMDAR 2B, 2A o nNOS, en el que la terapia de reperfusión y el agente tratan un efecto dañino de la isquemia sobre el sistema nervioso central, en el que el agente es un agente trombolítico, vasodilatador o hipertensivo, en el que el inhibidor de PSD-95 se administra antes de efectuar la terapia de reperfusión, en el que la terapia de reperfusión se efectúa después de determinar que el sujeto reúne los requisitos para reperfusión basándose en penumbra isquémica y falta de hemorragia, como se muestra por análisis de TAC, IRM o TEP, y en el que el inhibidor comprende un péptido que tiene una secuencia aminoacídica consistente en o que comprende KLSSIESDV (SEQ ID NO:5) o KLSSIETDV (SEQ ID NO:43), en el que el péptido se liga a un péptido de internalización o se lipida, aumentando así el paso del péptido a través de una membrana o la barrera hematoencefálica.



B. IPD 48h (volumen +/- EEM) **C. T2 48h (volumen +/- EEM)** **D. T2 7d (volumen +/- EEM)**

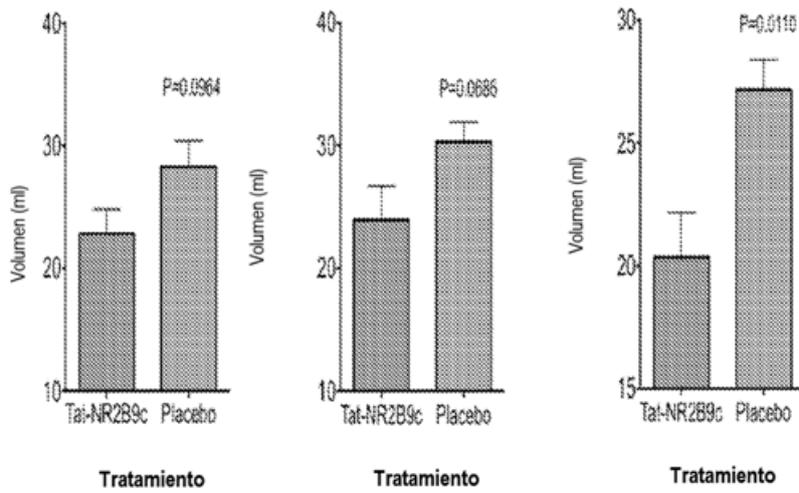


FIG 1A-D

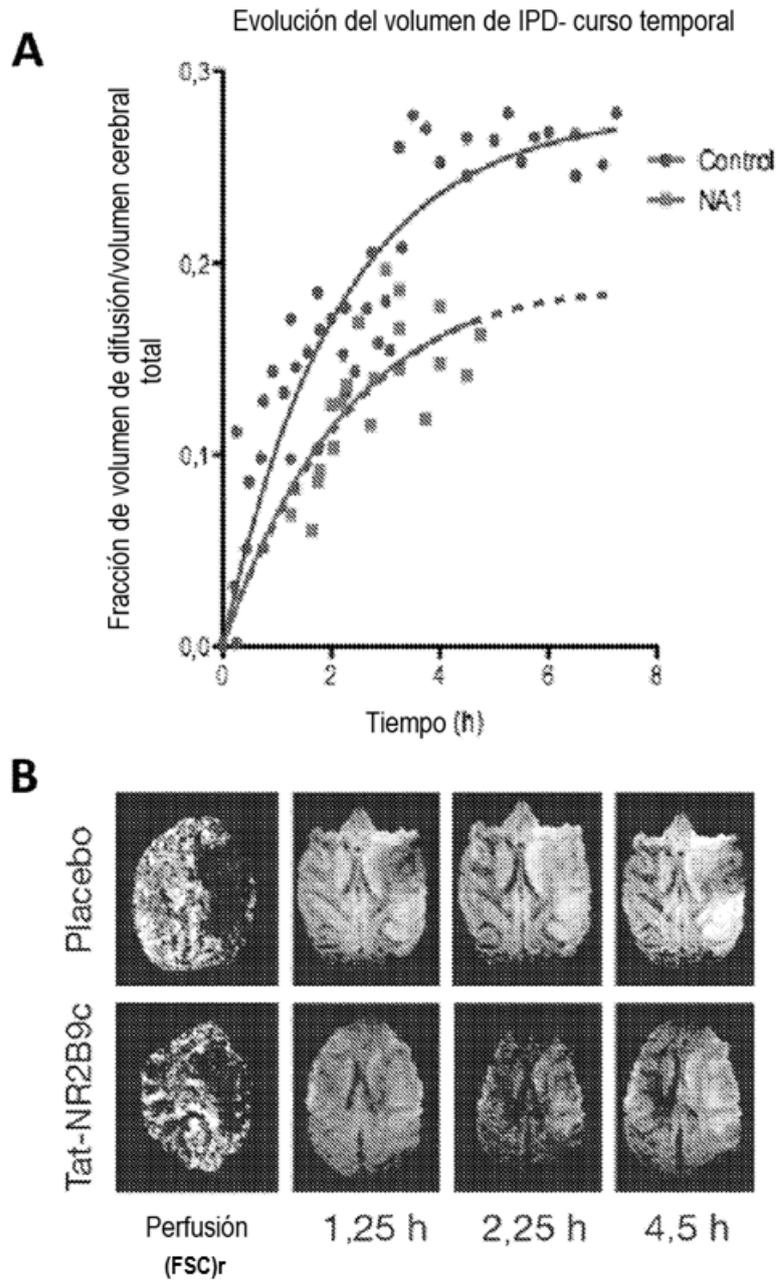


FIG 2A,B

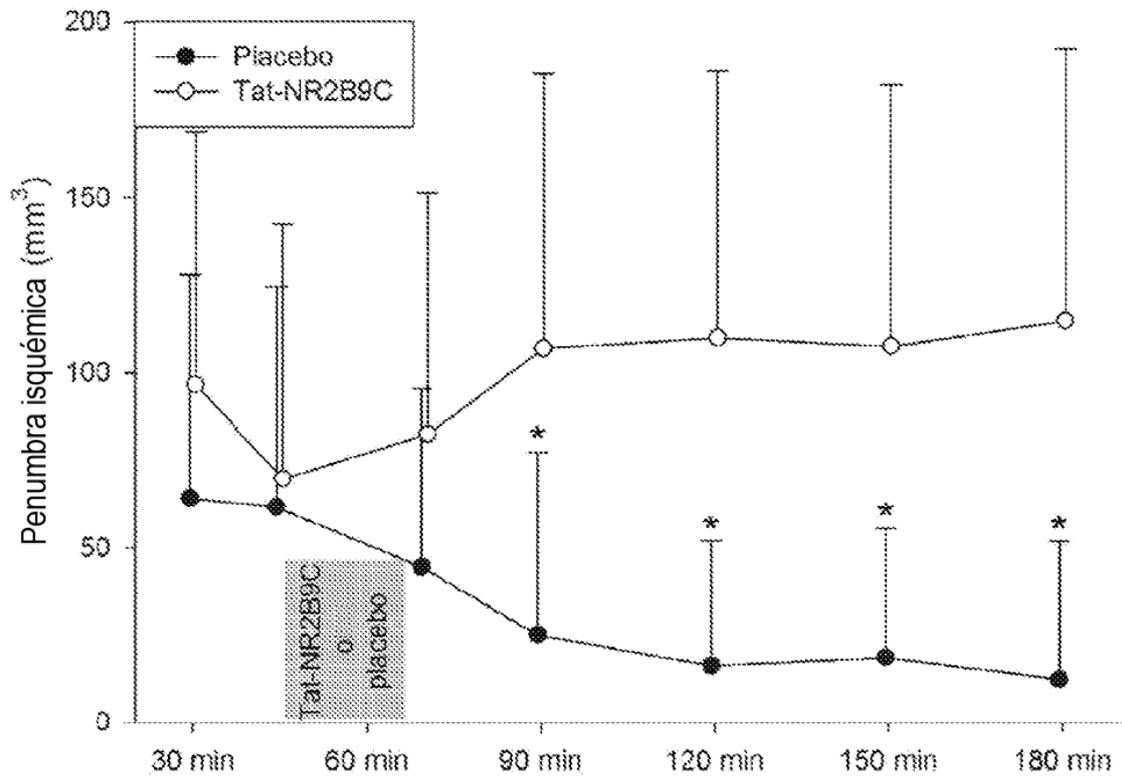


FIG 3

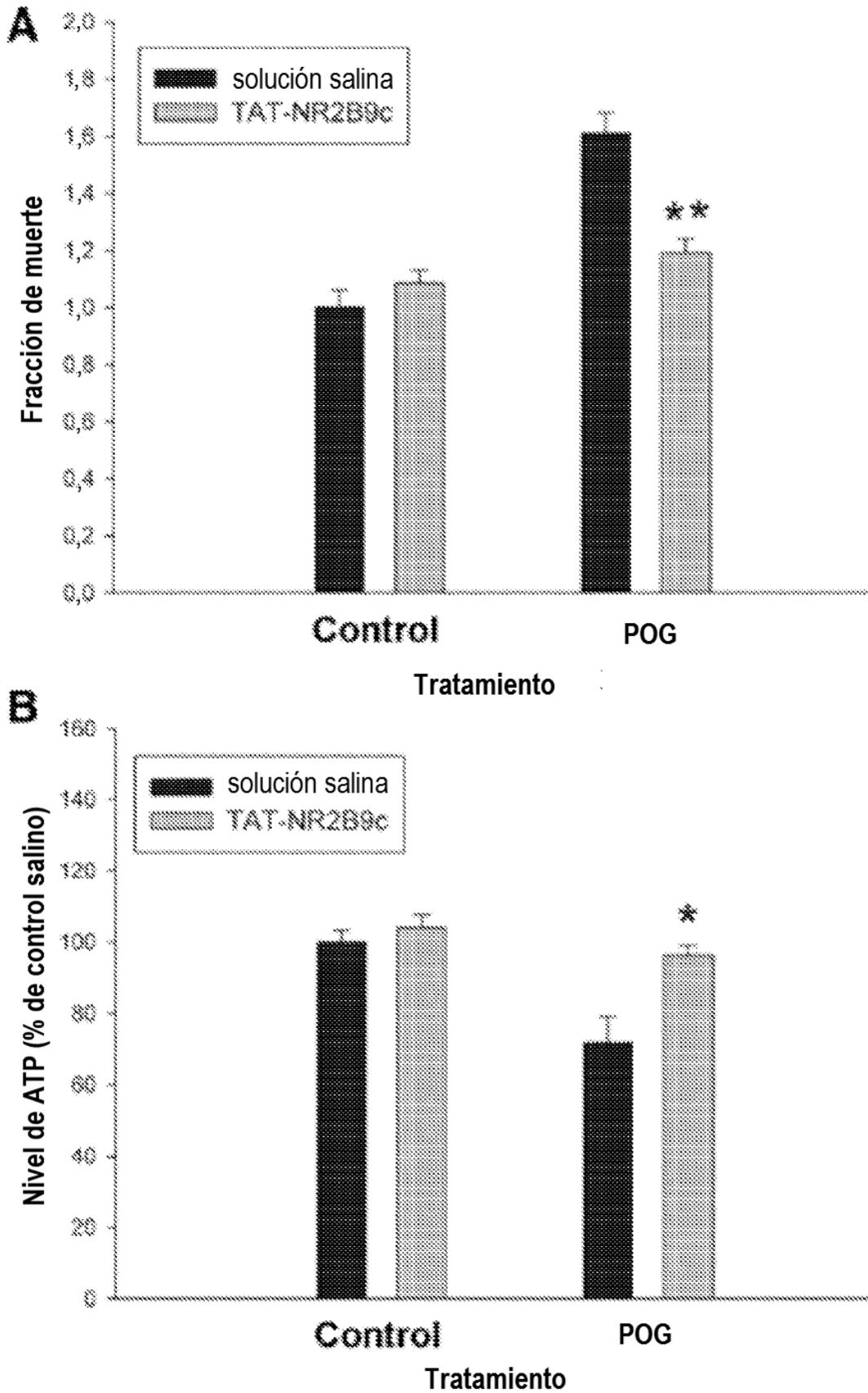


FIG 4A-B

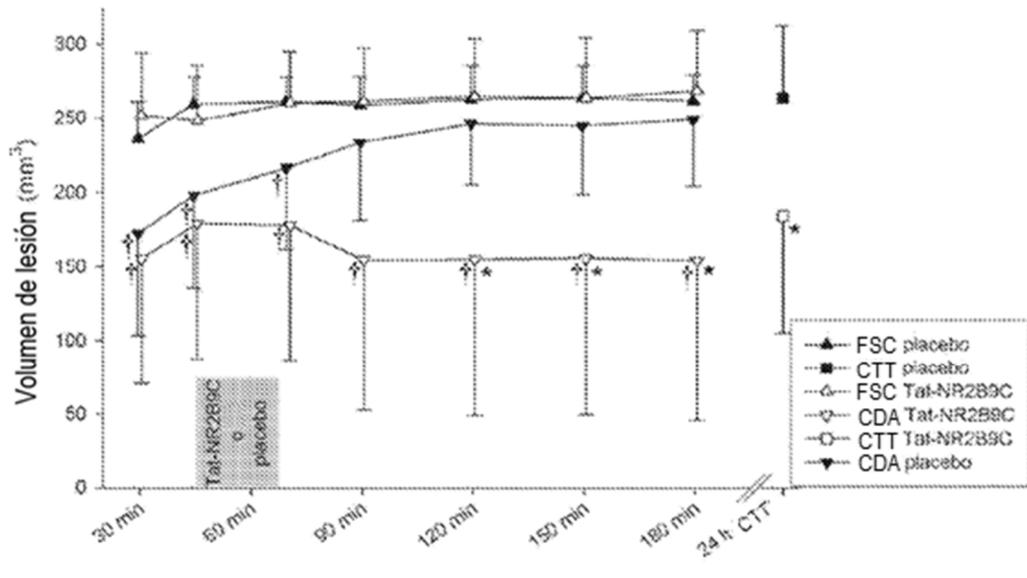


FIG 5

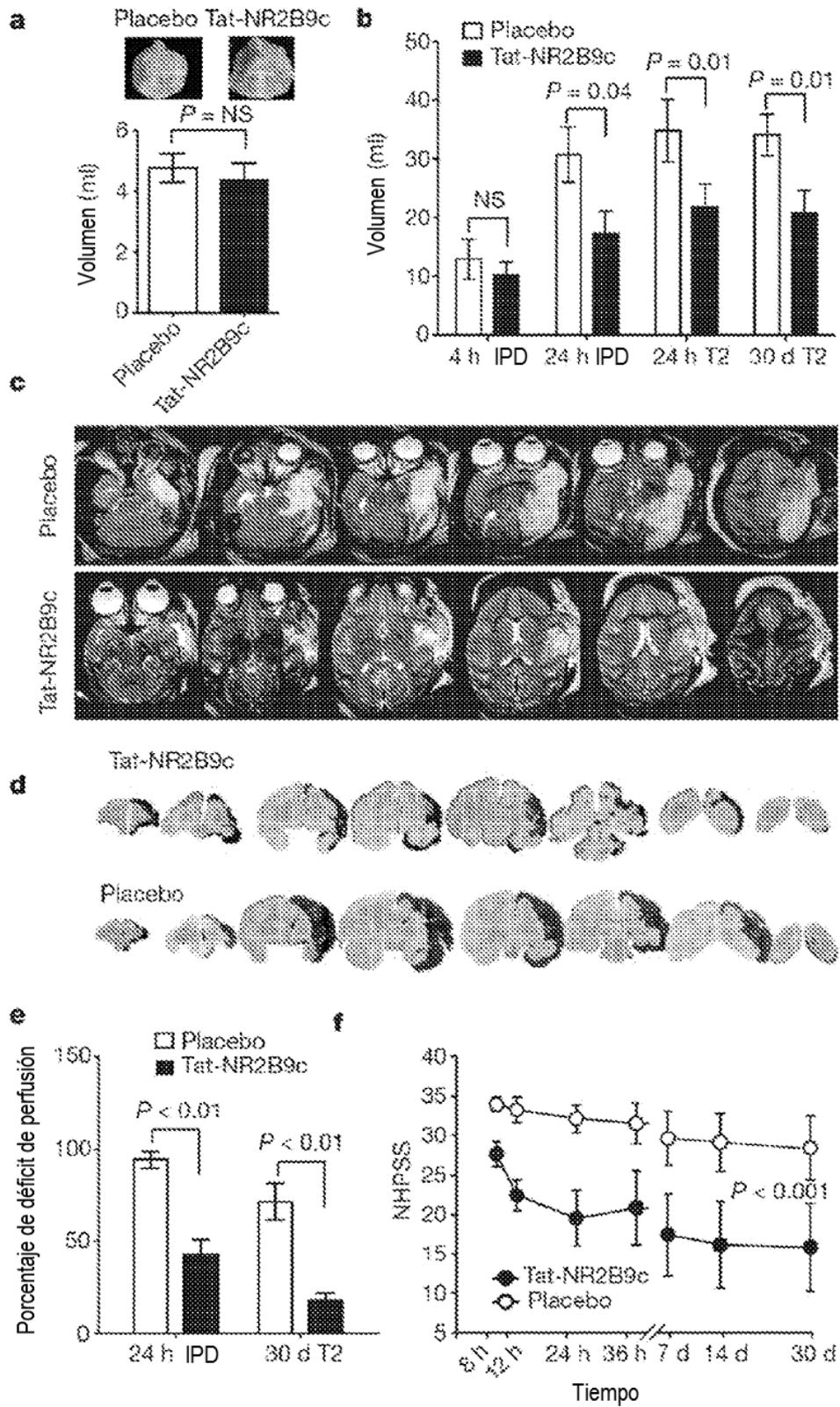


FIG 6A-F

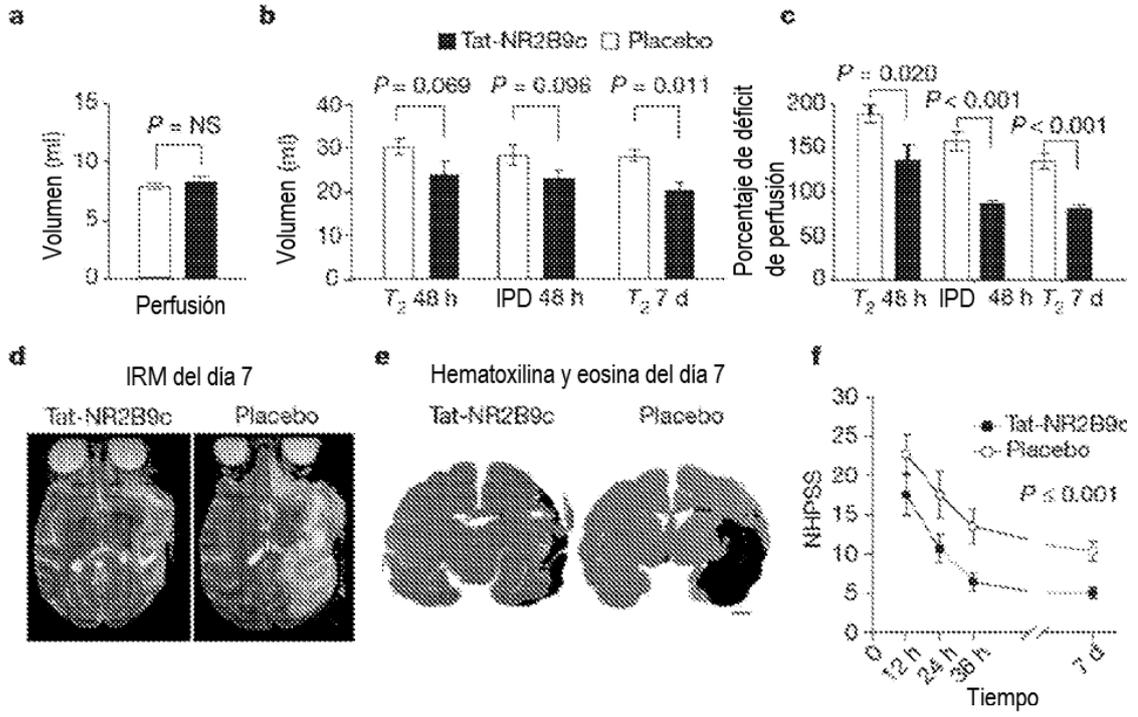


FIG 7A-F

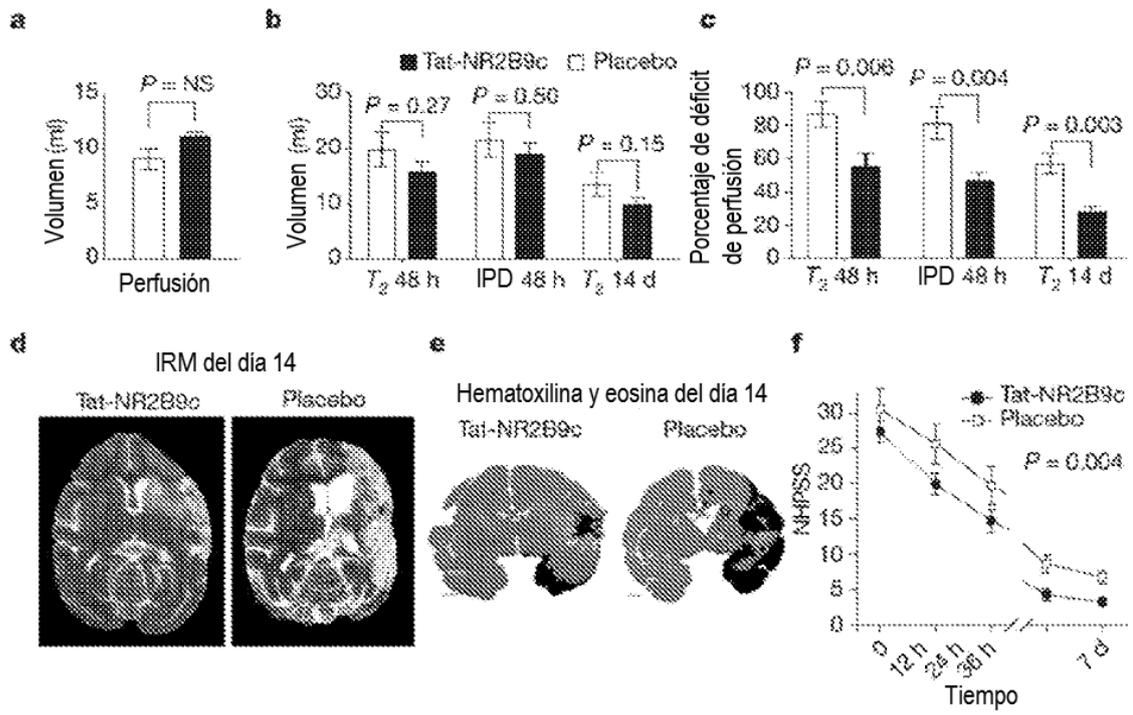


FIG 8A-F

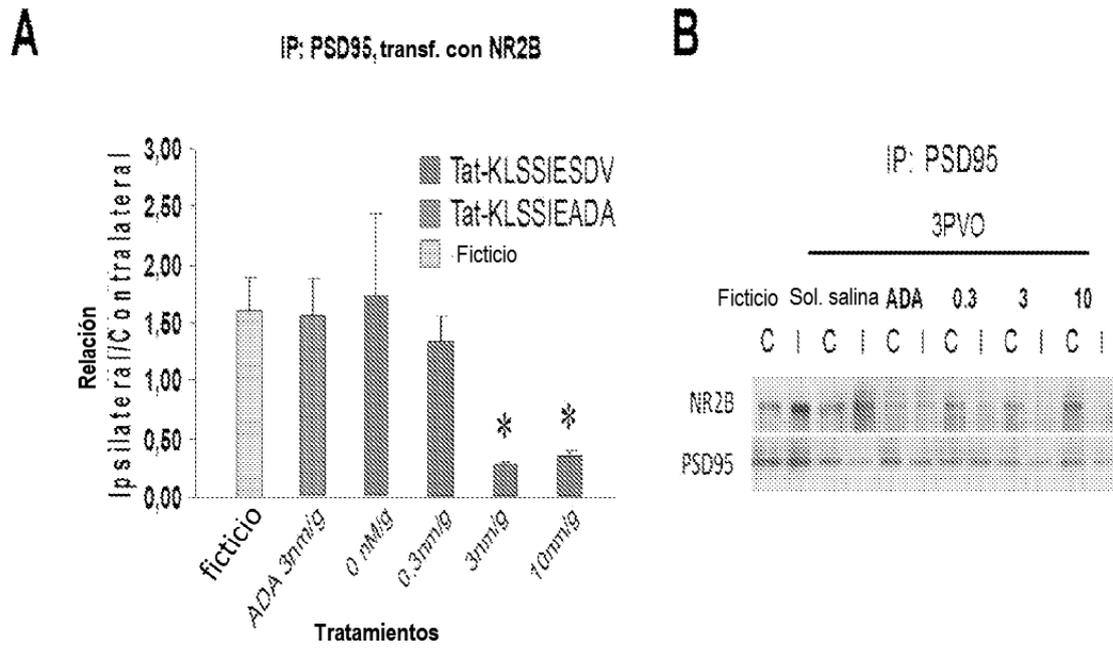


FIG 9A,B

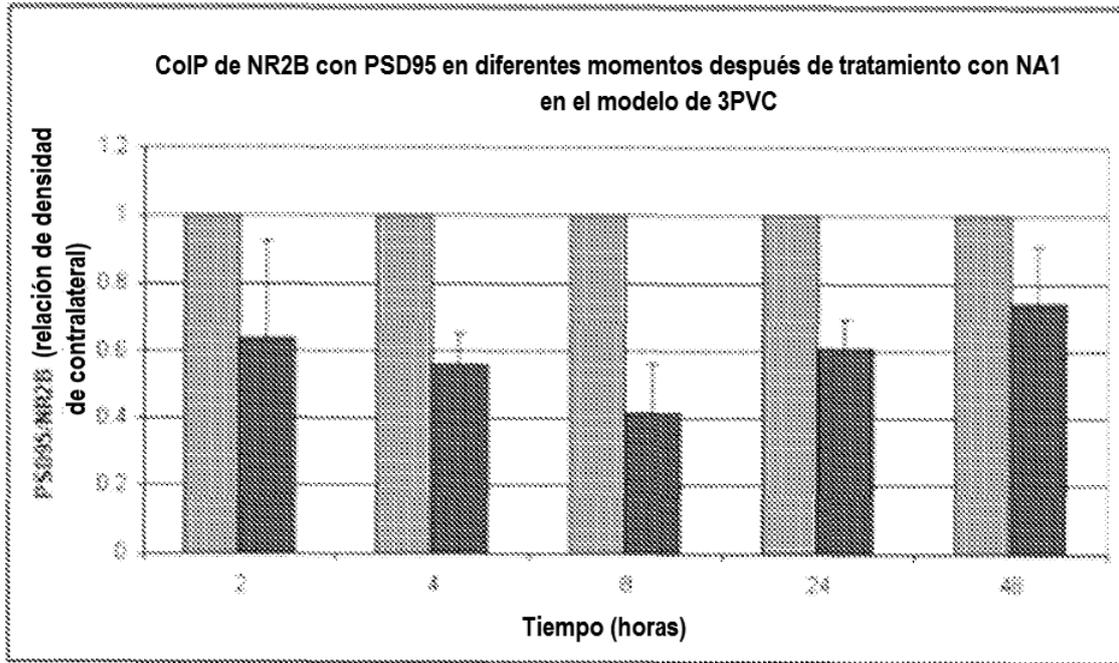


FIG 10

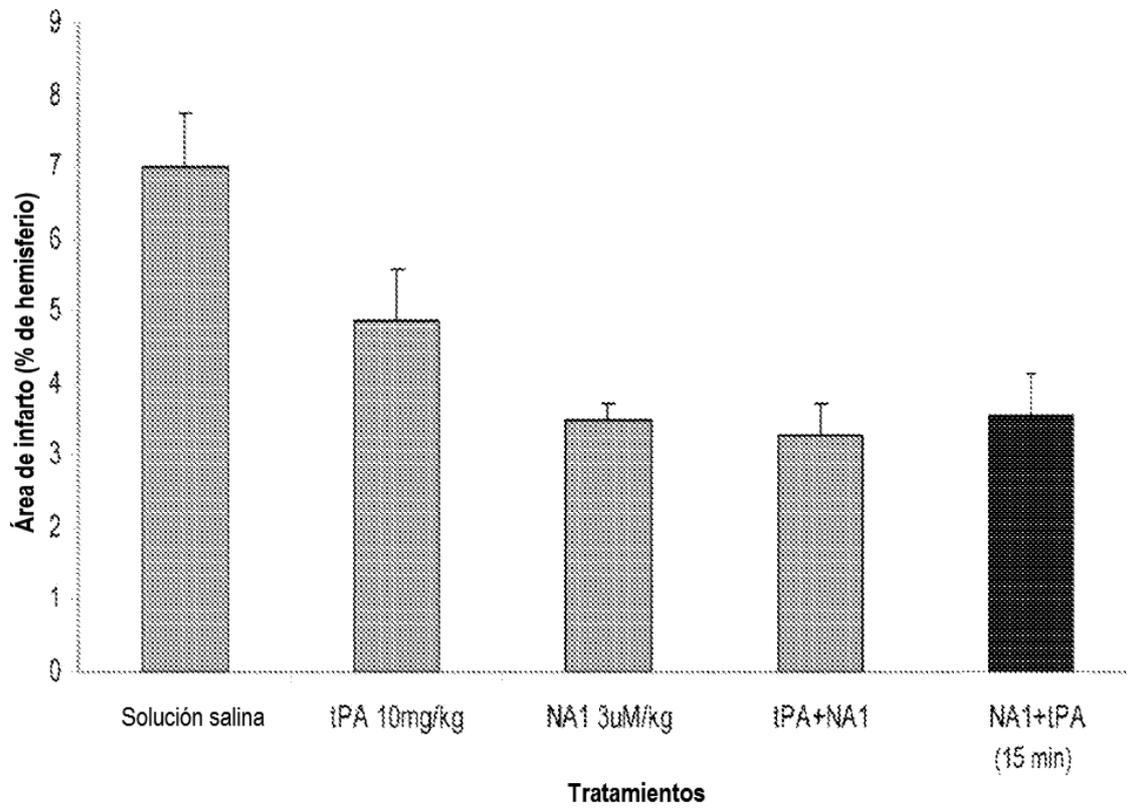


FIG 11