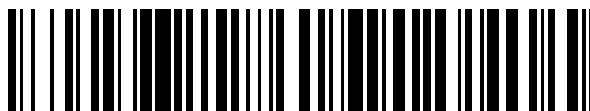


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 281**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/08 (2009.01)
A61K 31/275 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2010** **PCT/US2010/038226**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010** **WO10144742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2010** **E 10786870 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019** **EP 2440231**

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

30 Prioridad:

10.06.2009 US 185943 P

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

08.06.2020

73 Titular/es:

**NONO INC. (100.0%)
479A Wellington St. W
Toronto, ON M5V 1E7, CA**

72 Inventor/es:

**TYMIANSKI, MICHAEL;
GARMAN, JONATHAN DAVID y
CUI, HONG**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 765 281 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

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

Esta solicitud reivindica prioridad de la Sol. Provisional de EE. UU. Nº 61/185,943, presentada el 10 de junio de 2009, y es una continuación en parte de la Sol. de EE. UU. Nº 12/323,915 presentada el 26 de noviembre de 2008, la cual reivindica prioridad de la Sol. Provisional de EE.UU. Nº 60/992.678 presentada el 5 de diciembre de 2007.

Antecedentes de la invención

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

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

Keller et al, Circulation Research, 63: 1044-1052 (1988) analiza el uso de lodoxamida para reducir la desgranulación de mastocitos.

El documento W02009076105 describe el uso de Tat-NR2B9c coadministrado con un fármaco antiinflamatorio para el tratamiento de pacientes con ictus o sometidos a cirugía endovascular en el que el fármaco antiinflamatorio es el péptido "azelastina" antihistamínico.

Hong-Shuo Sun et al. Stroke, Lippincott -Williams & Wilkins, 39;2544-2553, describe que Tat-NR2B9c administrado 3 h después del ictus reduce los volúmenes de infartos y mejora las funciones neuroconductuales a largo plazo en una amplia ventana terapéutica (Resumen).

El documento W02008109010 describe el efecto positivo de Tat-NR2B9c en el tratamiento del ictus (P.20, L.22).

El documento W02008014917 analiza la neuroprotección con una forma de D-aminoácido de Tat-NR2B9c

Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones 1-14 y proporciona un agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad en el que el agente farmacológico se administra con un inhibidor de la desgranulación de mastocitos para inhibir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido tat; y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es lodoxamina, tranilast, bepotastina, clorzoxazona, epinastina, isoproterenol, olapatadina, pemirolast, pimecrolimus o pirbuterol.

La invención proporciona además un agente farmacológico para el uso anterior en el que el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se coformula con el agente farmacológico y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es lodoxamina y el agente farmacológico es Tat-NR2B9c.

La invención proporciona además un agente farmacológico unido a un péptido tat administrado con un inhibidor de la desgranulación de mastocitos que inhibe una respuesta antiinflamatoria inducida por el péptido tat para el uso en el tratamiento o la profilaxis del ictus, epilepsia, hipoxia, lesión traumática al CNS no asociada con el ictus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, o un paciente que se somete a cirugía que afecta o puede afectar el suministro de los vasos sanguíneos o la extracción de sangre del cerebro, en el que el agente inhibe las interacciones entre PSD-95 y NMDAR2B y es un péptido que comprende la SEQ ID Nº:38 en el extremo C-terminal y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es lodoxamida, tranilast, bepotastina, clorzoxazona, epinastina, isoproterenol, olapatadina, pemirolast, o pimecrolimus o pirbuterol.

Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra al mismo tiempo o hasta 15 minutos antes que el agente farmacológico. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se coformula con el agente farmacológico. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra mediante una ruta periférica. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos y el agente farmacológico se

- administran por vía intravenosa. Opcionalmente, el sujeto padece de un episodio de una enfermedad y el agente farmacológico y el Opcionalmente, la administración del inhibidor de la desgranulación de mastocitos no conlleva un régimen recurrente de administración del inhibidor de la desgranulación de mastocitos al paciente sin el agente farmacológico. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat. Opcionalmente el péptido tat tiene una
- 5 secuencia de aminoácidos que comprende RKKRRQRRR (SEQ ID N°:51) o GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:1). Opcionalmente, el péptido tat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2), o FGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:3), o GRKKRRQRRRP (SEQ ID N°:4). Opcionalmente, el agente farmacológico es un péptido, tal como KLSSIESDV (SEQ ID N°:5).
- 10 Se describe tratar o efectuar la profilaxis de una enfermedad mediada por excitotoxicidad que comprende administrar a un sujeto que tiene o tiene riesgo de la enfermedad y un régimen eficaz de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en o comprende (RRRQRKKRGYKLSSIESDV SEQ ID N°: 70) para tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad. Opcionalmente, el tratamiento comprende además administrar un inhibidor de la desgranulación de mastocitos y/o un antihistamínico.
- 15 Se describe un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en o comprende (RRRQRKKRGYKLSSIESDV SEQ ID N°:70) para el uso en el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad.
- 20 Se describe un método para administrar un agente farmacológico a un sujeto, el método comprende: administrar el agente farmacológico unido a un péptido tat al sujeto; y administrar un inhibidor de la desgranulación de mastocitos al sujeto, por lo que la lodoxamida puede inhibir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización; y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es ranitidina, lodoxamida, azelastina, bepotastina, clorazoxona, epinastina, isoproterenol, olopatadina, pemirolast, pimecrolimus o pirbuterol.
- 25 Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra al mismo tiempo o hasta 15 minutos antes que el agente farmacológico. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se coformula con el agente farmacológico. Opcionalmente, el método es para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad mediada por excitotoxicidad en el sujeto. Opcionalmente, el agente farmacológico es un péptido PL de un receptor NMDAR. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat, por ejemplo que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende RKKRRQRRR (SEQ ID N°:51), GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:3) o GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID N°:4).
- 30 Opcionalmente, la enfermedad es ictus o el sujeto tiene riesgo de ataque isquémico cerebral transitorio como resultado de la cirugía. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra por una ruta periférica. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de una ventana de 30 minutos antes a 15 después de la administración del agente farmacológico. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de una ventana de 15 minutos antes o al mismo tiempo que la administración del agente farmacológico. Opcionalmente, el sujeto padece de un episodio de una enfermedad y el agente farmacológico y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administran una vez durante el episodio
- 35 de la enfermedad. Opcionalmente, la administración del inhibidor de la desgranulación de mastocitos no conlleva un régimen recurrente de administración del inhibidor de la desgranulación de mastocitos al paciente sin el agente farmacológico. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos y el agente farmacológico unido al péptido de interiorización se coformulan. Opcionalmente, la coformulación se administra por vía intravenosa.
- 40 La invención proporciona además un kit que comprende un agente farmacológico unido a un péptido tat y lodoxamida. Se describe lodoxamida para su uso en la inhibición de una respuesta de desgranulación de mastocitos inducible por un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización. La invención proporciona además un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización para su uso en el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad en combinación con lodoxamida para suprimir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización. La invención proporciona además un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD95 a NDMAR
- 45 2B unido a un péptido de interiorización en un régimen eficaz para tratar o efectuar la profilaxis de enfermedad mediadas por excitotoxicidad en combinación con lodoxamida para inhibir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización. La invención proporciona además lodoxamida para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad mediada por excitotoxicidad en combinación con un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD95 a NDMAR 2B unido a un péptido de interiorización, en el que la lodoxamida inhibe una respuesta inflamatoria
- 50 inducible por el péptido de interiorización. La invención proporciona además la coformulación que comprende lodoxamida y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:6 (YGRKKRRQRRRLSSIESDV) y agua. Opcionalmente, menos del 5% en peso de la lodoxamida y menos del 5% en peso del péptido está en forma de partículas. Opcionalmente, la coformulación comprende además cloruro de sodio a una concentración de 50-200 mM. Opcionalmente, la concentración de lodoxamida es 0,5-1 mg/ml y la concentración del péptido es 5-20 mg/ml
- 55 Se describe un método para administrar un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización a una población de sujetos que tienen o están en riesgo de una enfermedad tratable por el agente farmacológico, que comprende administrar el agente farmacológico unido al péptido de interiorización a los sujetos, en el que a algunos de los sujetos se les administra un inhibidor de la desgranulación de mastocitos para reducir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización y algunos sujetos no dependen de la dosis del agente

farmacológico unido al péptido de interiorización con pacientes que reciben una dosis más alta recibiendo el inhibidor de la desgranulación de mastocitos.

- Se describe un método para tratar o efectuar la profilaxis de una enfermedad mediada por excitotoxicidad que comprende administrar a un sujeto humano que tiene o está en riesgo de la enfermedad un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:6 (YGRKKRRQRRRLSSIESDV) a una dosis mayor o igual a 2,0 mg/kg; y administrar al sujeto un inhibidor de la desgranulación de mastocitos, por lo que el inhibidor de la desgranulación de mastocitos puede inhibir la desgranulación de mastocitos inducible por el péptido de interiorización y/o el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de un período de 30 minutos antes a 15 minutos después del agente farmacológico. Opcionalmente, la dosis es de 2,6 mg/kg.
- Se describe un método para administrar un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización a un sujeto que tiene o está en riesgo de una enfermedad tratable por el agente farmacológico, que comprende administrar el agente farmacológico unido al péptido de interiorización al sujeto, administrar un inhibidor de la desgranulación de mastocitos y un antihistamínico para reducir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización.
- Se describen métodos para administrar un agente farmacológico a un sujeto. Los métodos implican administrar el agente farmacológico unido a un péptido de interiorización al sujeto; y administrar un inhibidor de la desgranulación de mastocitos al sujeto, por lo que el inhibidor de la desgranulación de mastocitos puede inhibir una desgranulación de mastocitos inducible por el péptido de interiorización y/o el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de un período de 30 minutos antes a 15 minutos después del agente farmacológico. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos inhibe una disminución de la presión arterial o erupción cutánea inducida por el péptido de interiorización. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es la cromolina. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra por una ruta periférica. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de una ventana de 30 minutos antes a 15 minutos después de la administración del agente farmacológico. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de una ventana de 15 minutos antes al mismo tiempo que la administración del agente farmacológico. En algunos métodos, el sujeto padece de un episodio de una enfermedad y el agente farmacológico y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administran una vez durante el episodio de la enfermedad. En algunos métodos, la administración del inhibidor de la desgranulación de mastocitos no conlleva un régimen recurrente de administración del inhibidor de la desgranulación de mastocitos al paciente sin el agente farmacológico. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos no atraviesa la barrera hematoencefálica en cantidades suficientes para ejercer un efecto farmacológico detectable en el cerebro cuando se administra por vía oral o intravenosa. En algunos métodos, el péptido de interiorización es un péptido tat. En algunos métodos, el péptido tat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende RKKRRQRRR (SEQ ID N°:51), GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:3) o GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:72). En algunos métodos, el agente farmacológico es un péptido, opcionalmente, KLSSIESDV (SEQ ID N°:5).
- Se describe un inhibidor de la desgranulación de mastocitos para su uso en la inhibición de la desgranulación de mastocitos inducible por un péptido de interiorización unido a un agente farmacológico y/o para su uso en la inhibición de una reducción de la presión arterial inducible por el péptido de interiorización, y/o para su uso en la inhibición de una erupción cutánea inducible por el péptido de interiorización. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de un período de 15 minutos antes de la administración del agente farmacológico o el inhibidor de la desgranulación de mastocitos y el agente farmacológico se administran por infusión intravenosa al mismo tiempo. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra por vía nasal. Opcionalmente, en donde la dosis del agente farmacológico unido al péptido de interiorización es mayor que 2,6 mg/kg, opcionalmente mayor que 3 mg/kg o 5 mg/kg. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos y el agente farmacológico se administran una vez por episodio de la enfermedad. En algunos usos, la enfermedad se caracteriza por isquemia cerebral. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es la cromolina y el agente farmacológico tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRRLSSIESDV (SEQ ID N°:6).
- Se describe un kit que comprende un agente farmacológico unido a un péptido tat y un inhibidor de la desgranulación de mastocitos.
- Se describe tratar o efectuar la profilaxis de una enfermedad mediada por excitotoxicidad. El tratamiento implica administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de la enfermedad un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD95 a NMDAR 2B unido a un péptido de interiorización en un régimen eficaz para tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad; y administrar al sujeto un inhibidor de la desgranulación de mastocitos, por lo que el inhibidor de la desgranulación de mastocitos puede inhibir la desgranulación de mastocitos inducible por el péptido de interiorización y/o el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de un período de 30 minutos antes a 15 minutos después del agente farmacológico. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos inhibe una disminución de la presión arterial inducida por el péptido de interiorización. En algunos métodos, la desgranulación de mastocitos inhibe una disminución de la presión arterial inducida por el péptido de interiorización. Opcionalmente, el agente farmacológico es un péptido PL de un receptor NMDAR. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat. Opcionalmente, el péptido de interiorización tiene una secuencia de

aminoácidos que comprende RKKRRQRRR (SEQ ID N°:51), GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:3) o GRKKRRQRRRQQ ID NO:4). En algunos métodos, la enfermedad es ictus. En algunos métodos, el sujeto está en riesgo de un ataque isquémico cerebral transitorio como resultado de la cirugía. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es la cromolina. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra por una ruta periférica. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de una ventana de 30 minutos antes a 15 minutos después de la administración del agente farmacológico. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de una ventana de 15 minutos antes o al mismo tiempo que la administración del agente farmacológico. En algunos métodos, el sujeto padece de un episodio de una enfermedad y el agente farmacológico y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administran una vez durante el episodio de la enfermedad. En algunos métodos, la administración del inhibidor de la desgranulación de mastocitos no conlleva un régimen recurrente de administración del inhibidor de la desgranulación de mastocitos al paciente sin el agente farmacológico. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos no atraviesa la barrera hematoencefálica en cantidades suficientes para ejercer un efecto farmacológico en el cerebro cuando se administra por vía oral o intravenosa. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra por vía nasal, oral o intravenosa.

Se describe un método para administrar un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización a un sujeto, la mejora en la que el péptido de interiorización se administra con un inhibidor de la desgranulación de mastocitos que puede inhibir la desgranulación de mastocitos inducible por el péptido de interiorización y/o el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de un período de 30 minutos antes a 15 minutos después del agente farmacológico. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat.

Se describe un método para inhibir la desgranulación de mastocitos. El método implica administrar un inhibidor de la desgranulación de mastocitos a un sujeto al que se le ha administrado o se le administrará un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización; por lo que el agente antiinflamatorio puede inhibir la desgranulación de mastocitos inducible por el péptido de interiorización y/o el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de un período de 30 minutos antes a 15 minutos después del agente farmacológico. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos inhibe una disminución de la presión arterial inducida por el péptido de interiorización. Opcionalmente, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos inhibe el desarrollo de una erupción cutánea inducida por el péptido de interiorización.

Se describen métodos para administrar un agente farmacológico a un sujeto. El método implica administrar el agente farmacológico unido a un péptido de interiorización a un sujeto, en el que al sujeto se le ha administrado o se le administrará un inhibidor de la desgranulación de mastocitos, por lo que el inhibidor de la desgranulación de mastocitos inhibe la desgranulación de mastocitos inducida por el péptido de interiorización y/o el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra dentro de un período de 30 minutos antes a 15 minutos después del agente farmacológico. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos inhibe una disminución de la presión arterial inducida por el péptido de interiorización.

Se describen métodos para inhibir la inflamación inducible por un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización, que comprende administrar un inhibidor de la desgranulación de mastocitos al mismo tiempo o hasta 15 minutos antes del agente farmacológico. En algunos métodos, el agente farmacológico y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administran al mismo tiempo por infusión intravenosa. En algunos métodos, el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administra antes que el agente farmacológico.

Se describe un método para administrar un agente farmacológico a un sujeto. El método comprende administrar el agente farmacológico unido a un péptido de interiorización al sujeto; y administrar un agente antiinflamatorio al sujeto, por lo cual el agente antiinflamatorio inhibe una respuesta inflamatoria inducida por el péptido de interiorización. Opcionalmente, el agente antiinflamatorio es un antihistamínico o un corticosteroide. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat. Opcionalmente, el péptido tat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:3), o GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID N°:4). Opcionalmente, el agente farmacológico es un péptido. Opcionalmente, el agente farmacológico es KLSSIESDV (SEQ ID N°:5).

Se describe un agente antiinflamatorio en la fabricación de un medicamento para inhibir una respuesta inflamatoria inducida por un péptido de interiorización unido a un agente farmacológico.

Se describe un equipo que comprende un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización, y un agente antiinflamatorio que inhibe una respuesta inflamatoria inducida por el péptido de interiorización.

Se describe un péptido de interiorización unido a biotina que tiene una capacidad reducida de inducir una respuesta inflamatoria en comparación con el péptido de interiorización sin la biotina.

Se describe un método de administración de un agente farmacológico a un sujeto, y el método comprende administrar el agente farmacológico unido a un péptido de interiorización al sujeto; en el que el péptido de

interiorización está biotinilado, y la biotinilación reduce la capacidad del péptido de interiorización de inducir una respuesta inflamatoria respecto del péptido de interiorización sin la biotina.

Se describe un método para tratar o efectuar la profilaxis de una enfermedad mediada por la excitotoxicidad, que comprende administrar a un sujeto, que tiene o que corre el riesgo de tener la enfermedad, un agente farmacológico que inhibe la unión de PSD95 a NDMAR 2B unido a un péptido de interiorización en un régimen eficaz para tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad; y administrar al sujeto un agente antiinflamatorio, por lo cual el agente antiinflamatorio inhibe una respuesta inflamatoria inducida por el péptido de interiorización. Opcionalmente, el agente farmacológico es un péptido PL de un receptor NMDAR. Opcionalmente, el péptido de interiorización es un péptido tat. Opcionalmente, el péptido de interiorización tiene una secuencia de aminoácidos que comprende GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:3), o GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID N°:4). Opcionalmente, el sujeto es de sexo femenino. Opcionalmente, la enfermedad es ictus. En ciertos métodos, el sujeto corre el riesgo de ataque isquémico cerebral transitorio como resultado de haberse sometido a cirugía cardíaca.

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

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

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

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

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

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Diferencia por sexo del tamaño del infarto en el modelo P3VO de ictus en ratas. Machos con solución salina: ratas macho con ictus tratadas con solución salina (control). Machos con Tat-NR2B9c: Ratitas macho con ictus tratadas con Tat-NR2B9c, es decir, el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID N°:6), que contiene la secuencia Tat y los 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. Hembras con solución salina: ratas hembra con ictus tratadas con solución salina (control). Hembras con Tat-NR2B9c: Ratitas hembra con ictus tratadas con Tat-NR2B9c, es decir, el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID N°:6), que contiene la secuencia Tat y 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. Eje Y: Tamaño del infarto, medido (en porcentaje) respecto del tamaño de infarto en las ratas macho tratadas con solución salina solamente)

Figura 2: Los péptidos que contienen la secuencia Tat provocan la desgranulación de los mastocitos. IC: Ionóforo de Calcio (control positivo). NA-1: Tat-NR2B9c, es decir, el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID N°:6), que contiene la secuencia Tat y los 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. NR2B9c: péptido KLSSIESDV (SEQ ID N°:5), secuencia de unión a PSD-95 de la subunidad NR2B de NMDA, desprovista de la secuencia Tat. AA: péptido YGRKKRRQRRRKLSSIEADA (SEQ ID N°:7), idéntico a Tat-NR2B9c, pero con 2 mutaciones puntuales en el dominio de unión a PSD-95 que le hacen incapaz de unirse a PSD-95. La desgranulación se midió mediante la actividad relativa de triptasa (% respecto del control). Las barras indican las medias $\pm$ D.E. de 3-6 duplicados independientes.

Figura 3: La desgranulación de mastocitos por péptidos que contienen la secuencia Tat depende de la dosis. IC: Ionóforo de Calcio (control positivo). NA-1: Tat-NR2B9c, es decir, el péptido YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID N°:6), que contiene la secuencia Tat y los 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. AA: péptido YGRKKRRQRRRKLSSIEADA (SEQ ID N°:7), idéntico a Tat-NR2B9c, pero con 2 mutaciones puntuales en el dominio de unión a PSD-95 que le hacen incapaz de unirse a PSD-95.

Figura 4: Desgranulación de mastocitos por péptidos que contienen variantes de la secuencia Tat. IC: Ionóforo de Calcio (control positivo). Tat-NR2B9c: el péptido YGRKKRRQRRRLSSIESDV (SEQ ID N°:6), que contiene la secuencia Tat y los 9 aminoácidos carboxi-terminales de la subunidad NR2B. TAT: Secuencia del péptido tat YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2). 2B9c: péptido KLSSIESDV (SEQ ID N°:5), secuencia de unión a PSD-95 de la subunidad NR2B de NMDA desprovista de la secuencia Tat. AA: péptido YGRKKRRQRRRLSSIEADA (SEQ ID N°:7), idéntico a Tat-NR2B9c, pero con 2 mutaciones puntuales en el dominio de unión a PSD-95 que le hacen incapaz de unirse a PSD-95. F-Tat-NR2B9c: péptido FGRKKRRQRRRLSSIESDV (SEQ ID N°:8). Tat-NR2B9c K>A: YGRKKRRQRRRLSSIESDV (SEQ ID N°:9). F-Tat-NR2B9c K>A: FGRKKRRQRRRLSSIESDV (SEQ ID N°:10).

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

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

La Figura 7 muestra la reducción de la presión arterial después de la administración de Tat-NR2B9c o Rv-Tat-NR2B9c a ratas.

Las Figuras 8A-D muestran los cambios en la presión arterial media (MAP) después de la administración de cromolina y Tat-NR2B9c. La Figura 8A muestra un transcurso de tiempo, la Figura 8B muestra el cambio porcentual en el área bajo la curva (AUC), la Figura 8C muestra los valores de MAP después del tratamiento con el dominio de transducción de péptidos en presencia y ausencia de Cromolina, la Figura 8D muestra el porcentaje de MAP después del tratamiento en relación con MAP antes del tratamiento. Las Figuras 8E (transcurso de tiempo) y 8F (gráfico de barras) muestran que la cromolina tiene un efecto similar con Rv-Tat-NR2B9c.

Las Figuras 9A-D proporcionan datos similares a las Figuras 8A-D excepto que la cromolina se reemplaza con difenhidramina.

Las Figuras 10A-D proporcionan datos similares a las Figuras 8A-D excepto que la cromolina se reemplaza con pirilamina.

Las Figuras 11A-D proporcionan datos similares a las Figuras 8A-D excepto que la cromolina se reemplaza con una combinación de difenhidramina y Ranitidina.

La Figura 12 es un esquema que muestra un péptido catiónico, tal como tat, que induce la desgranulación de mastocitos y la consiguiente liberación de histamina y otros factores, que provocan diversos efectos que incluyen una disminución de la presión arterial. Los inhibidores de la granulación de mastocitos (también conocidos como estabilizadores de mastocitos) inhiben la desgranulación de mastocitos y la consiguiente liberación de histamina y otras moléculas por los mastocitos.

Las Figuras 13A y 13B muestran una coformulación de Iodoxamida con Tat-NR2B9c y cromolina administrada inmediatamente antes de que Tat-NR2B9c anule completamente una caída en MAP debido a Tat-NR2B9c.

La Figura 14 muestra que Rv-NR2B9c es eficaz en la reducción de infartos en un modelo animal de isquemia cerebral.

La Figura 15 muestra que Tat-NR2B9c en combinación con Iodoxamida dio como resultado una reducción estadísticamente significativa en relación con Tat-NR2B9c solo.

Descripción detallada

Definiciones

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

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

La expresión "dominio PDZ" se refiere a un dominio de proteína modular de alrededor de 90 aminoácidos, caracterizado por una identidad de secuencia significativa (p.ej., al menos un 60%) respecto de la proteína sináptica cerebral PSD-95, la proteína de unión septada de Drosophila Discs-Large (DLG), y la proteína de unión estrecha epitelial ZO1 (ZO1). Los dominios PDZ también se conocen como repeticiones de homología Discs-Large ("DHRs") y repeticiones GLGF. Los dominios PDZ en general parecen mantener una secuencia consenso central (Doyle, D. A., 1996, Cell 85: 1067-76). Las proteínas que contienen dominios PDZ ejemplares y las secuencias del dominio PDZ se describen en la Solicitud de EE.UU. N° 10/714.537, la cual se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

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

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

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

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

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

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

Los residuos peptidomiméticos individuales pueden unirse mediante enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, tales como, p.ej., glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidas bifuncionales, N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos de enlace que pueden ser una alternativa a los enlaces amida tradicionales ("enlace peptídico") incluyen, por ejemplo, cetometileno (p.ej., -C(=O)-CH₂- para -C(=O)-NH-), aminometileno (CH₂-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄-), tiazol, retroamida, tioamida o éster (ver, p.ej., Spatola (1983) en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp. 267-357, A Peptide Backbone Modifications, Marcell Dekker, NY).

Pueden generarse moléculas miméticas de aminoácidos aromáticos al remplazarlos, p. ej, con D- o L-nafilalanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2-tiencilalanina; D- o L-1-, -2,3- o 4-piencilalanina; D- o L-3-tiencilalanina; D- o L-(2-piridinil)-alanina; D- o L-(3-piridinil)-alanina; D- o L-(2-pirazinil)-alanina; D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluorofenilalanina; D- o L-p-bifenilfenilalanina; K- o L-p-metoxibifenilfenilalanina; D- o L-2-indol(alquil)alaninas; y, D- o L-alquilaininas, donde alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, iso-butilo, sec-isotilo, iso-pentilo sustituido o no sustituido, o un aminoácido no ácido. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, p.ej., anillos aromáticos tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo y piridilo.

Las moléculas miméticas de aminoácidos ácidos pueden generarse mediante sustitución con, p.ej., aminoácidos no carboxilatos mientras que mantienen una carga negativa; (fosfono)alanina; treonina sulfatada. Los grupos laterales carboxilo (por ejemplo, aspartilo o glutamilo) también pueden modificarse selectivamente mediante la reacción con

carbodiimidias (R-N-C-N-R=) tal como, p.ej., 1-ciclohexil-3(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida o 1-etil-3(4-azonia-4,4-dimetolpentil) carbodiimida. El aspartilo o glutamilo también puede convertirse en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

5 Las moléculas miméticas de aminoácidos básicos pueden generarse mediante sustitución con, p.ej., (además de lisina y arginina) los aminoácidos ornitina, citrulina o (guanidino)-ácido acético o (guanidino)alquil-ácido acético, donde alquilo se definió anteriormente. El derivado de nitrilo (p.ej., que contiene el resto CN en lugar de COOH) puede sustituirse con asparagina o glutamina. Los residuos de asparaginilo y glutaminilo pueden desaminarse a los residuos de aspartilo o glutamilo correspondientes.

10 Las moléculas miméticas de residuos de arginina pueden generarse haciendo reaccionar arginilo con, p.ej., uno o más reactivos convencionales, que incluyen, por ejemplo, fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona o ninhidrina, preferiblemente en condiciones alcalinas.

Las moléculas miméticas de residuos de tirosina pueden generarse haciendo reaccionar tirosilo con, p.ej., compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. N-acetilimidazol y tetranitrometano pueden usarse para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.

15 Las moléculas miméticas de residuos de cisteína pueden generarse haciendo reaccionar residuos de cisteinilo con, p.ej., alfa-haloacetatos tales como ácido 2-cloroacético o cloroacetamida y las aminas correspondientes; para producir derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Las moléculas miméticas de residuos de cisteína también pueden generarse haciendo reaccionar residuos de cisteinilo con, p.ej., bromo-trifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidozoi)l propiónico; fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo; disulfuro de metil 2-piridilo; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4 nitrofenol; o cloro-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol.

20 Pueden generarse moléculas miméticas de lisina (y pueden alterarse los residuos amino terminales) haciendo reaccionar lisinilo con, p.ej., anhídridos de ácido succínico o carboxílico. La lisina y otras moléculas miméticas de residuos que contienen alfa-amino también pueden generarse mediante la reacción con imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4, pentanodiona y reacciones catalizadas por transamidasa con glioxilato.

25 Las moléculas miméticas de metionina pueden generarse haciendo reaccionar con, por ejemplo, sulfóxido de metionina. Las moléculas miméticas de la prolina incluyen, por ejemplo, ácido pipecólico, ácido tiazolidina carboxílico, 3- o 4-hidroxiprolina, deshidroprolina, 3- o 4-metilprolina, o 3,3, -dimetilprolina. Las moléculas miméticas de residuos de histidina pueden generarse haciendo reaccionar histidilo con, p.ej., dietilprocarbonato o bromuro de para-bromofenacilo.

30 Otras moléculas miméticas incluyen, p.ej., las generadas mediante la hidroxilación de prolina y lisina; la fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos serilo o treonilo; la metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina e histidina; la acetilación de la amina N-terminal; la metilación de residuos amida de la cadena principal o la sustitución con aminoácidos N-metilo; o amidación de grupos carboxilo C-terminales.

35 Las moléculas miméticas también pueden incluir composiciones que contienen un residuo mimético estructural, particularmente un residuo que induce o imita estructuras secundarias, tales como un giro beta, lámina beta, estructuras de hélice alfa, giros gamma y similares. Por ejemplo, la sustitución de residuos de aminoácidos naturales con D-aminoácidos; aminoácidos N-alfa-metilo; aminoácidos C-alfa-metilo; o los deshidroaminoácidos dentro de un péptido pueden inducir o estabilizar las conformaciones de giros beta, giros gamma, láminas beta o hélice alfa. Las estructuras miméticas de giro beta han sido descritas, p.ej., por Nagai (1985) Tet. Lett. 26:647-650; Feigl (1986) J. Amer. Chem. Soc. 108:181-182; Kahn (1988) J. Amer. Chem. Soc. 110:1638-1639; Kemp (1988) Tet. Lett. 29:5057-5060; Kahn (1988) J. Molec. Recognition 1:75-79. Las estructuras miméticas de láminas beta se han descrito, p.ej., por Smith (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114:10672-10674. Por ejemplo, Beusen (1995) Biopolymers 36:181-200 describe un giro beta de tipo VI inducido por un sustituto de amida cis, tetrazol 1,5-disustituido. Banerjee (1996) Biopolymers 39:769-777 describe la incorporación de residuos de omega-aminoácidos aquirales para generar unidades de polimetileno como una sustitución para los enlaces amida. Las estructuras secundarias de los polipéptidos pueden analizarse mediante, por ejemplo, espectroscopía ¹H NMR o 2D NMR de alto campo, véase, por ejemplo, Higgins (1997) J. Pept. Res. 50:421-435. Véase también, Hruby (1997) Biopolymers 43:219-266, Balaji, et al., Patente de EE: UU. N°. 5.612.895.

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

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

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

El término "agente" incluye cualquier elemento, compuesto, o entidad, que incluye, p.ej., producto farmacéutico, terapéutico, farmacológico, cosmeceútico, fármaco, toxina, producto natural, compuesto sintético, compuestos químicos. Los agentes pueden ser biológicos (p.ej., péptidos, moléculas peptidomiméticas, o anticuerpos) o moléculas pequeñas orgánicas (usualmente de menos de 500 Da) entre otros.

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

Un péptido tat significa un péptido que comprende o que consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:1), en el que se delecionan, sustituyen o insertan como máximo 5 residuos dentro de la secuencia, que conserva la capacidad de facilitar la absorción de un péptido unido u otro agente en las células. Preferiblemente, cualquier cambio de aminoácidos son sustituciones conservativas. Preferiblemente, cualquier sustitución, delección o inserción interna en el agregado deja el péptido con una carga neta catiónica, preferiblemente similar a la de la secuencia anterior. Los aminoácidos de un péptido tat se pueden derivatizar con biotina o una molécula similar para reducir una respuesta inflamatoria, como se describe adicionalmente más adelante.

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

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

I. General

En la presente memoria se describen métodos de administración de agentes farmacológicos unidos a un péptido de interiorización, en los que una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización se inhibe mediante la coadministración de un antiinflamatorio o mediante la unión del péptido de interiorización a biotina o una molécula similar. Tales métodos se basan en parte en los resultados descritos en los ejemplos, por lo cual la administración de un agente farmacológico unido a tat a dosis elevadas va seguida estrechamente por una respuesta inflamatoria, que incluye la desgranulación de mastocitos, la liberación de histamina y las secuelas típicas de la liberación de histamina, tales como enrojecimiento, calor, hinchazón, e hipotensión. Se cree que la desgranulación de los mastocitos se desencadena mediante la interacción directa entre el péptido tat catiónico y los mastocitos, en vez de desencadenarse mediante una respuesta de anticuerpos IgE. La respuesta inflamatoria se puede inhibir coadministrando un agente antiinflamatorio, particularmente un inhibidor de la desgranulación de mastocitos, tal como cromolina, con el agente farmacológico unido a tat u otro péptido de interiorización. Otros agentes antiinflamatorios que incluyen antihistamínicos y corticosteroides también pueden usarse. De manera alternativa, los inventores han descubierto que la capacidad de los péptidos de interiorización de inducir una respuesta inflamatoria se puede reducir uniéndolos a biotina o una molécula similar.

En la presente memoria se describen medios para tratar o efectuar la profilaxis de enfermedades caracterizadas por la excitotoxicidad, tales como ictus. Tales enfermedades se pueden tratar mediante el uso de un agente farmacológico que inhibe la interacción entre NMDARs con la proteína de densidad postsináptica 95 unido a un péptido de interiorización. Preferiblemente, en tales métodos, el agente farmacológico se coadministra con un agente antiinflamatorio, preferiblemente un inhibidor de la granulación de mastocitos, tal como la cromolina, para inhibir una respuesta inmunitaria inducible por el péptido de interiorización, o el péptido de interiorización se une a biotina o una molécula similar, por las razones discutidas anteriormente. Independientemente de si se usa un agente antiinflamatorio o péptido de interiorización biotinilado en tales métodos, el tratamiento o la profilaxis se puede administrar a sujetos de sexo masculino y femenino. La administración a sujetos de sexo femenino se basa en parte en los resultados descritos en el ejemplo, en el que se descubrió que el tratamiento en un modelo de ictus en ratas fue al menos tan eficaz en los sujetos de sexo femenino como en los de sexo masculino. La viabilidad de administrar un agente farmacológico que inhibe las interacciones entre PSD95 y NMDAR a un sujeto de sexo femenino contrasta con los resultados previos, en los que se descubrió que los inhibidores de nNOS son ineficaces para tratar la enfermedad excitotóxica en sujetos de sexo femenino. Se informó que la administración de los inhibidores de nNOS protege contra los efectos dañinos del ictus en ratas macho, pero incrementó la lesión celular en las ratas hembra en un modelo de MCAO. McCullough et al., Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 25: 502-512 (2005).

II. Agentes farmacológicos

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

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

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

Tabla 1

Agente farmacológico	Enfermedad	Aguda/crónica	Vía de admin.	Comentario	Referencia
Fenobarbital (luminal sódico)	Epilepsia		IV / oral	Dependencia, problemas de tolerancia, interacciones, efectos secundarios, defectos congénitos	Motamedi y Meador (2006) Curr Neurol Neurosci Rep, 6(4): 341-6. Drugs.com
Primidona (miidona, misolina)	Epilepsia		Oral	Efectos secundarios, interacciones	Koristkova, et al (2006) Int J Clin Pharmacol Ther, 44(9): 438-42. Drugs.com
Diazepam (valium)	Ansiedad		IP / oral	Dependencia, efectos secundarios, interacciones	Beard, et al (2003) Health Technol Assess, 7(40): iii, ix-x, 1-111. Drugs.com
Dopamina	Parkinson			No puede atravesar la BHE, efectos secundarios	Ahlskog (2001) Neurol Clin, 19(3): 579-605. Drugs.com
Levodopa	Parkinson			Degradado antes de la BHE, efectos secundarios, semivida = 1,5 hrs	Nyholm (2006) Clin Pharmacokinet, 45(2): 109-36. USPTO.gov (patente nº 7160913)

	Apomorfina			IP	Semivida corta	Nyholm (2006) Clin Pharmacokinet, 45(2): 109-36. Drugs.com
5	Mesilato de tirilazad (Freedox)	Ictus		IP	Eficacia baja, fase III detenida	Hickenbottom y Grotta (1998) Semin Neurol 18(4): 485-92. Strokecenter.org
	Ciclosporina (Gengraf)	Inmunosupresión		IP	Péptido, semivida de 5-18 hr	Kees, et al (2006) Ther Drug Monit, 28(3): 312-20. Drugs.com
10	Vancomicina	Antibiótico		IP	Péptido, absorción baja, semivida de 4-6 hr	de Hoog, et al (2004) Clin Pharmacokinet, 43(7): 417-40. Drugs.com
15	Lisinopril (Prinivil)	Hipertensión		IP / oral	Péptido, paso escaso a través de la BHE, semivida de 12 hr	Tan, et al (2005) Am J Hypertens, 18(2): 158-64. Drugs.com
20	Azidotimidina (AZT, zidoridina, combivir)	Antiviral		Oral	Paso escaso a través de la BHE, semivida de 05-3 hr, toxicología hematológica	Spitzenberger, et al (2006) J Cereb Blood Flow Metab, 25 de oct., publicación electrónica antes de impresión. Drugs.com
25	Piracetam	Dolor/ epilepsia			No puede atravesar la BHE	Loscher y Potschka (2002) J Pharmacol Exp Ther, 301(1): 7-14. USPTO.gov (patente nº 7157421)
	Natrecor (péptido BNP)	Síndrome de descompensación cardio-renal		IV	Eficacia desconocida	Feldman y Sun (2004) Heart Fail Rev, 9(3): 203-8. Clinicaltrials.gov
30	AVR-118 (péptido)	Tratamiento paliativo del cáncer		Subcutáneo	Eficacia desconocida, dosis desconocida	Clinicaltrials.gov
	Oxitocina (péptido)	Trastornos del estado de ánimo		IV/IM	Interacciones, dosis desconocida	Swaab, et al (2005) Ageing Res Rev, 4(2): 141-94. Drugs.com
35	Pravastatina (Pravachol)	MS		Oral	Eficacia desconocida, biodisponibilidad baja	Hatanaka (2000) Clin Pharmacokinet, 39(6): 397-412. Clinicaltrials.gov

5	Remifentanilo	Dolor, quemazón		IV	Semivida de 3,5 min, metabolizado por esterasa desconocida	Scott y Perry (2005) Drugs, 65(13): 1793-1823. Clinicaltrials.gov
	Neurotensina	Esquizofrenia, Parkinson, adicción			Péptido 13AA, fácilmente degradado, no puede atravesar la BHE	Boules, et al, (2006) Peptides, 27(10): 2523-33.
10	GDNF (factor neurotrófico derivado de glía)	Parkinson	Crónico	Intraparenquimal	Péptido, no puede atravesar la BHE	Grondin, et al (2003) Prog Drug Res, 61: 101-23.
	Inhibidores de proteasas - lopinavir - ritonavir - saquinavir - darunavir - atazanavir - amprenavir	VIH		Oral	Todos los inhibidores de proteasas de VIH sufren la capacidad intensa del VIH de mutar, lo que genera cepas de VIH resistentes a fármacos	-Oldfield y Plosker (2006) Drugs 66(9): 1275-99. -Porter y Charman (2001) Adv Drug Deliv Rev, 1 de oct.; 50 Supl. 1: S127-47. -Piacenti (2006) Pharmacotherapy 26(8): 1111-33.
15	Dihidroergotamina	Migraña		IV, IM, subc.	Las interacciones provocan isquemia periférica, semivida de 9 hr	Modi y Lowder (2006) Am Fam Physician 73(1): 72-8.
	Sporamax (itaconazol)	Antifúngico		Oral	Finalmente se desarrolla resistencia al fármaco, insuficiencia cardiaca congestiva en ciertas poblaciones	Wang y Remold (2006) Cardiol Rev 14(5): 223-6.
25	Inhibidores de la Proteína Quinasa C	Infarto agudo de miocardio, ictus, isquemia, lesión por perfusión				Publicaciones de pat. de EE.UU. 20050267030, 20060148702, 20060293237, 20050215483, 20040204364, 20040009922
	AII-7	Cáncer, cáncer de mama	Crónico		Molécula peptidomimética que bloquea el dominio intracelular de Erbb2 e incrementa la sensibilidad a taxol	Kunz et al, Mol Cancer Res 2006;4(12):983-98
30						
	Péptido CRAMP	infección por Salmonella			Péptido anti-microbiano intracelular que reduce la replicación de Salmonella	Rosenberger, CM. PEAS 24 de febrero, 2004 vol. 101 nº 8 2422-2427
35						

5	Péptido de canales de sodio	Puede reducir los espasmos musculares (epilepsia, piernas inquietas, Parkinson, etc.)			El péptido que corresponde al segmento intracelular corto entre los dominios transmembrana homólogos III y IV de la subunidad alfa del canal de sodio retrasó la inactivación	Vassilev, Science (1988) 241: 1658-6
10	Aptámero KDI1	Bloquea la señalización de EGF- posible anti-neoplásico				Buerger. J. Biol. Chem., Vol. 278, Ejemplar 39, 37610-37621, 26 de septiembre, 2003
15	ARN/terapia génica				Se pueden usar péptidos transportadores para introducir ARNs o siARN/ARNi para el tratamiento	Turner et al (2007) Blood Cells Mol Dis, 38(1): 1-7.

Una clase de agentes de interés particular inhibe las interacciones entre PSD-95 y uno o más NMDARs. Tales agentes son útiles para reducir los efectos dañinos del ictus y otras afecciones neurológicas mediadas al menos en parte por la excitotoxicidad de NMDAR. Tales agentes incluyen péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que incluye o basada en el motivo PL de un Receptor de NMDA o dominio PDZ de PSD95. Tales péptidos pueden inhibir también o alternativamente las interacciones entre PSD-95 y nNOS y otros receptores de glutamato (p.ej., receptores de kainato o receptores de AMPA). Los péptidos preferidos inhiben la interacción entre los dominios PDZ 1 y 2 de la proteína de densidad postsináptica-95 (PSD-95) (secuencia de aminoácidos humana proporcionada por Stathakism, Genomics 44(1):71-82 (1997)) y la secuencia PL C-terminal de una o más subunidades del Receptor de NMDA 2 que incluyen la subunidad NR2B del receptor de N-metil-D-aspartato neuronal (Mandich et al., Genomics 22, 216-8 (1994)). NMDAR2B tiene la identificación de GenBank 4099612, 20 aminoácidos C-terminales FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID N°:11) y un motivo PL ESDV (SEQ ID N°:12). Los péptidos preferidos inhiben las formas humanas de PSD-95 y los receptores NMDAR humanos. Sin embargo, la inhibición se puede demostrar también a partir de variantes de especie de las proteínas. A continuación se muestra una lista de receptores de NMDA y de glutamato que se pueden usar:

Tabla 2: Receptores de NMDA Con Secuencias PL

	Nombre	I.G. o nº de acc.	Secuencia 20mérica C-terminal	Secuencia 4mérica C-terminal	¿PL?	ID de PL interna
35	NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID N°:13)	STVV (SEQ ID N°:27)	X	AA216
	NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID N°:13)	STW (SEQ ID N°:27)	X	AA216
	NMDAR-4	472845	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID N°:13)	STW (SEQ ID N°:27)	X	AA216
	NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID N°:13)	STVV (SEQ ID N°:27)	X	AA216
40	NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLS DPSVST VV (SEQ ID N°:13)	STVV (SEQ ID N°:27)	X	AA216
	NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID N°:14)	HRES (SEQ ID N°:28)		

5	NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID N°:14)	HRES (SEQ ID N°:28)		
	NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISLES EV (SEQ ID N°:15)	ESEV (SEQ ID N°:29)	X	AA180
	NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID N°:11)	ESDV (SEQ ID N°:12)	X	AA34.1
	NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEYQRTSRT CES (SEQ ID N°:16)	TCES (SEQ ID N°:30)		
	NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID N°:11)	ESDV (SEQ ID N°:12)	X	
10	NMDAR2A	558748	LNSCSNRRVYKKMPSIE SDV (SEQ ID N°:17)	ESDV (SEQ ID N°:12)	X	AA34.2
	NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGS AHFSSLE SEV (SEQ ID N°:18)	ESEV (SEQ ID N°:29)	X	
	Receptor de glutamato delta 2	AF009014	QPTPTLGLNLGNDPDRGTSI (SEQ ID N°:19)	GTSI (SEQ ID N°:31)	X	
15	Receptor de glutamato 1	I28953	MQSIPCMSSHSGMPLGATGL (SEQ ID N°:20)	ATGL (SEQ ID N°:32)	X	
	Receptor de glutamato 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIESVKI (SEQ ID N°:21)	SVKI (SEQ ID N°:33)	X	
	Receptor de glutamato 3	AF167332	QNYATYREGYNVYGTESVKI (SEQ ID N°:22)	SVKI (SEQ ID N°:33)	X	
20	Receptor de glutamato 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASDLP (SEQ ID N°:23)	SDLP (SEQ ID N°:34)		
	Receptor de glutamato 5	U16125	SFTSILTCHQRRTQRKETVA (SEQ ID N°:24)	ETVA (SEQ ID N°:35)	X	
	Receptor de glutamato 6	U16126	EVINMHTFNDRLPGKETMA (SEQ ID N°:25)	ETMA (SEQ ID N°:36)	X	
	Receptor de glutamato 7	U16127	RRLPGKDSMACSTSLAPVFP (SEQ ID N°:26)	PVFP (SEQ ID N°:37)		

25 Algunos péptidos inhiben las interacciones entre PSD-95 y múltiples subunidades de NMDAR. En tales casos, el uso del péptido no requiere necesariamente la comprensión de las contribuciones respectivas de los diferentes NMDARs a la neurotransmisión excitatoria. Otros péptidos son específicos para un único NMDAR. De manera similar, si un agente caracterizado como que inhibe una interacción (p.ej., PSD-95 y NMDAR) inhibe inherentemente otra interacción (p.ej., PSD-95 y nNOS), los usos o métodos empleando el agente pueden efectuarse mediante un mecanismo que implica cualquiera o ambas inhibiciones.

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

Otros péptidos que inhiben las interacciones entre PSD95 y NDMARs incluyen los péptidos del dominio PDZ 1 y/o 2 de PSD-95 o un subfragmento de cualquiera de estos que inhibe las interacciones entre PSD-95 y un receptor de NMDA, tal como NMDA 2B. Tales péptidos activos comprenden al menos 50, 60, 70, 80 ó 90 aminoácidos del dominio PDZ 1 y/o dominio PDZ 2 de PSD-95, que se dan dentro de aproximadamente los aminoácidos 65-248 de

PSD-95 proporcionados por Stathakism, Genomics 44(1):71-82 (1997) (secuencia humana) o NP_031890.1, GI:6681195 (secuencia de ratón) o las regiones correspondientes de otras variantes de especie.

Los péptidos y moléculas peptidomiméticas descritos en la presente memoria pueden contener residuos de aminoácidos modificados, por ejemplo, residuos que están N-alquilados. Las modificaciones de alquilo N-terminales pueden incluir, por ejemplo, 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-(Naftaleno-2-il)etilo).

Bach, J. Med. Chem 51, 6450-6459 (2008) y WO 2010/004003 han descrito una serie de análogos de NR2B9c. La actividad de unión a PDZ es exhibida por péptidos que tienen solo tres aminoácidos del extremo C-terminal (SDV). Bach también informa análogos que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en YtSXV (SEQ ID N°:68), en el que t y S son aminoácidos alternativos, Y se selecciona entre E, Q y A, o un análogo de los mismos, X es seleccionado 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 la posición P3 (tercer aminoácido del extremo C-terminal, es decir, la posición tS). El péptido puede estar N-alquilado con un ciclohexano o sustituyente aromático, y además comprende 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, preferiblemente seleccionado 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/o alquilo.

Pueden incorporarse otras modificaciones sin afectar negativamente la actividad y estas incluyen la sustitución de uno o más de los aminoácidos en la forma L-isomérica natural con aminoácidos en la forma D-isomérica. Por lo tanto, cualquier aminoácido de origen natural en la configuración L (que también puede denominarse R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) puede reemplazarse con el aminoácido del mismo tipo estructural químico o una molécula peptidomimética, pero de la quiralidad opuesta, generalmente denominada D-aminoácido, pero que adicionalmente puede denominarse la forma R o S. Por lo tanto, una molécula peptidomimética puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, al menos 50%, o todos los residuos de D-aminoácido. Una molécula peptidomimética que contiene algunos o todos los residuos D a veces se refiere a un péptido "inverso".

Las moléculas peptidomiméticas también incluyen péptidos retro. Un péptido retro tiene una secuencia de aminoácidos inversa. Las moléculas peptidomiméticas también incluyen péptidos retro inversos en los que se invierte el orden de los aminoácidos por lo que el aminoácido originalmente C-terminal aparece en el extremo N-terminal y se usan D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos. El documento WO 2008/014917 describe un análogo retro-inverso de Tat-NR2B9c que tiene la secuencia de aminoácidos vdseisslk-rrrqrkrkyin (SEQ ID N°:69) (las letras minúsculas indican aminoácidos D), e informa que es eficaz para inhibir la isquemia cerebral. Otro péptido eficaz descrito en la presente memoria es Rv-Tat-NR2B9c (RRRQRRKRGYKLSSIESDV SEQ ID N°:70).

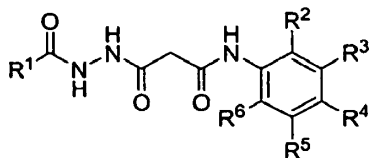
Puede usarse un enlazador, p.ej., un enlazador de polietilenglicol, para dimerizar el resto activo del péptido o la molécula peptidomimética para mejorar su afinidad y selectividad hacia proteínas que contienen dominios PDZ en tándem. Véase, p.ej., Bach et al., (2009) Angew. Chem Int. Ed. 48:9685-9689 y WO 2010/004003. Un péptido que contiene un motivo PL se dimeriza preferiblemente uniendo el extremo N-terminal de dos de tales moléculas, dejando el extremo C-terminal libre. Bach informa además que un péptido pentamérico IESDV (SEQ ID N°:71) del extremo C-terminal de NMDAR 2B fue eficaz en la inhibición de la unión de NMDAR 2B a PSD95. Opcionalmente, pueden unirse alrededor de 2-10 copias de un PEG en tándem como un enlazador.

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

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

Los agentes farmacológicos también incluyen moléculas pequeñas que inhiben las interacciones entre PSD95 y NMDAR 2B, y/u otras interacciones descritas anteriormente. Los inhibidores de moléculas pequeñas adecuados se describen en el documento WO 07/079406 y 60/947.892 presentada el 3 de julio de 2007, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad. Estas moléculas se identificaron mediante un cribado *in silico* de una biblioteca de compuestos en función de la unión a PSD95, y se verificó experimentalmente la unión de los compuestos ejemplares.

Se describen muchos compuestos adecuados en la Sol. Provisional de EE.UU. N° 60/947.883, incorporada de este modo como referencia en su totalidad. Una clase ejemplar de compuestos adecuados son de fórmula:



5

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

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

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

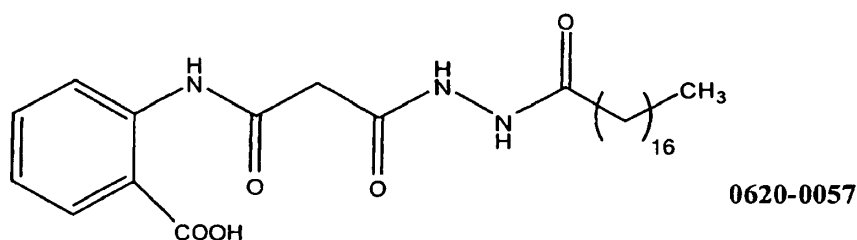
cada R^{10} y R^{11} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, ciclohexano, fenilo y un péptido de translocación de la membrana celular;

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

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

Un compuesto es 0620-0057, cuya estructura es:

20



25

III. Péptidos de interiorización

Los péptidos de interiorización, también conocidos como péptidos de transducción de membrana celular o péptidos de penetración celular, son una clase bien conocida de péptidos relativamente cortos (p.ej., 5-30 aminoácidos) que permiten que muchas proteínas celulares o virales atraviesen las membranas. Tales péptidos tienen típicamente una carga catiónica de una representación normal superior (en relación con las proteínas en general) de residuos de arginina y/o lisina que se cree que facilita 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 antenapedia (Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997) (y las variantes de la misma), la proteína tat del virus de la inmunodeficiencia humana, la proteína VP22, el producto del gen UL49 del virus herpes simplex de tipo 1, Penetratina, SynB1 y 3, Transportan, Anfipático, gp41NLS, poliArg, y varias toxinas proteicas vegetales y bacterianas, tales como ricina, abrina, modeccina, toxina de la difteria, toxina del cólera, toxina del carbunco, toxinas termolábiles, y exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa (ETA). Se describen otros ejemplos en las siguientes referencias (Temsamani, Drug Discovery Today, 9(23):1012-1019, 2004; De Coupade, Biochem J., 390:407-418, 2005; Saalik Bioconjugate Chem. 15: 1246-1253, 2004; Zhao, Medicinal Research Reviews 24(1):1-12, 2004; Deshayes, Cellular and Molecular Life Sciences 62:1839-49, 2005).

Un péptido de interiorización preferido es tat del virus VIH. Un péptido tat informado en trabajos previos comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos estándar YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2) hallada en la proteína Tat del VIH. Si hay presentes residuos adicionales que flanquean tal motivo tat (además del agente farmacológico), los residuos pueden ser, por ejemplo, aminoácidos naturales que flanquean este segmento de una proteína tat, aminoácidos espaciadores o ligadores de un tipo usado en general para unir dos dominios peptídicos, p.ej., gly (ser)₄ (SEQ ID N°:44), TGEKP (SEQ ID N°:45), GGRRGGGS (SEQ ID N°:46), o LRQRDGERP (SEQ ID N°:47) (véase, p.ej., Tang et al. (1996), J. Biol. Chem. 271, 15682-15686; Hennecke et al. (1998), Protein Eng. 11, 405-410)), o pueden ser otros aminoácidos que no reduzcan significativamente la capacidad de conferir la absorción de la

45

variante sin los residuos flanqueantes. Preferiblemente, el número de aminoácidos flanqueantes distintos de un péptido activo no supera diez a cada lado de YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2). Un péptido tat adecuado que comprende residuos de aminoácidos adicionales que flanquean el extremo C-terminal de YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2) es YGRKKRRQRRRPQ (SEQ ID N°:48). Sin embargo, preferiblemente, no hay presentes aminoácidos

flanqueantes.

Las variantes del péptido tat anterior que tienen una capacidad reducida de unirse a los canales de calcio de tipo N se describen en el documento WO/2008/109010. Tales variantes pueden comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos XGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:49), en la que X es un aminoácido distinto de Y o nada (en cuyo caso G es un residuo N-terminal libre). Un péptido tat preferido tiene el residuo Y N-terminal sustituido con F. Así, se prefiere un péptido tat que comprende o que consiste en FGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:3). Otra variante preferida del péptido tat consiste en GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:1). Otros péptidos tat que pueden usarse incluyen GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID N°:4) y GRKKRRQRRR (SEQ ID N°:72). Otros péptidos tat comprenden al menos ocho aminoácidos contiguos de la secuencia GRKKRRQRRR. Otros péptidos tat que facilitan la absorción de un agente farmacológico sin inhibir los canales de calcio de tipo N incluyen los presentados en la Tabla 3. Otro péptido tat preferido se denomina rv-tat o RRRQRKKRGY (aminoácidos 1-11 de la SEQ ID N°:70).

Tabla 3

X-FGRKKRRQRRR (F-Tat3) (SEQ ID N°:3)
X-GKKKKKQKKK (SEQ ID N°:50)
X-RKKRRQRRR (SEQ ID N°:51)
X-GAKKRRQRRR (SEQ ID N°:52)
X-AKKRRQRRR (SEQ ID N°:53)
X-GRKARRQRRR (SEQ ID N°:54)
X-RKARRQRRR (SEQ ID N°:55)
X-GRKKARQRRR (SEQ ID N°:56)
X-RKKARQRRR (SEQ ID N°:57)
X-GRKKRRQARR (SEQ ID N°:58)
X-RKKRRQARR (SEQ ID N°:59)
X-GRKKRRQRAR (SEQ ID N°:60)
X-RKKRRQRAR (SEQ ID N°:61)
X-RRPRRPRRPRR (SEQ ID N°:62)
X-RRARRARRARR (SEQ ID N°:63)
X-RRRARRRARR (SEQ ID N°:64)
X-RRRPRRPRRPRR (SEQ ID N°:65)
X-RRPRRPRR (SEQ ID N°:66)
X-RRARRARR (SEQ ID N°:67)

X puede representar un extremo aminoterminal libre, uno o más aminoácidos, o un resto conjugado. Los péptidos de interiorización pueden usarse en forma inversa o retro o inversa retro con o sin que el péptido o molécula peptidomimética unida esté en tal forma.

Los péptidos de interiorización se pueden unir a agentes farmacológicos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los agentes se pueden unir a los péptidos de interiorización mediante unión química, por ejemplo por medio de un agente de acoplamiento o conjugación. Hay numerosos agentes disponibles comercialmente, y se revisan en Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991). Algunos ejemplos de reactivos de entrecruzamiento incluyen 3-(2-piridilditio) propionato J-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenileno) bismaleimida; N,N'-etileno-bis-(yodoacetamida) u otro reactivo que tiene puentes de metileno de 6 a 11 carbonos (que son relativamente específicos para los grupos sulfhidrilo); y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno (que forma uniones irreversibles con los grupos amino y tirosina). Otros reactivos de entrecruzamiento incluyen p,p'-difluoro-m, m'-dinitrodifenilsulfona (que forma entrecruzamientos irreversibles con grupos amino y fenólicos); adipimidato de

dimetilo (que es específico de los grupos amino); cloruro de fenol-1,4-disulfonilo (que reacciona principalmente con los grupos amino); diisocianato o diisotiocianato de hexametileno, o p-diisocianato de azofenilo (que reacciona principalmente con los grupos amino); glutaraldehído (que reacciona con varias cadenas laterales diferentes) y disdiazobencidina (que reacciona principalmente con tirosina e histidina).

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

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

IV. Respuesta inflamatoria a los péptidos de interiorización

- 15 Los presentes inventores han descubierto que los péptidos de interiorización, tales como tat, tienen la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria tras la administración a un sujeto. La respuesta inflamatoria es detectable normalmente en 1, 5, 10, 20, 30, o 60 min tras administrar el péptido, pero en general desaparece en 24 hr tras la administración del péptido (suponiendo que el péptido no se vuelva a administrar). La respuesta inflamatoria depende de la dosis. La respuesta inflamatoria en general se produce de nuevo a una intensidad similar al volver a administrar el péptido. Un aspecto de la respuesta inflamatoria es frecuentemente una disminución transitoria de la presión arterial que se produce dentro de un periodo de alrededor de 0-30 minutos después de la administración del péptido de interiorización.

La respuesta inflamatoria se caracteriza por una desgranulación de los mastocitos y la liberación consiguiente de histamina y otros mediadores de la inflamación, tales como quimiocinas, citocinas, leucotrienos, lipasas, proteasas, cininas, citocinas, derivados de ácido araquidónico tales como prostaglandinas, interleucinas, y/u óxido nítrico (véase la Figura 12). La histamina y/u otros mediadores liberados de la inflamación dan lugar a varios síntomas de inflamación, que incluyen enrojecimiento cutáneo, calor, hinchazón, hipotensión y/o pulso reducido. La liberación de histamina también puede dar como resultado vasodilatación, hipotensión, broncoconstricción, activación del músculo liso, separación de las células endoteliales (responsable de urticaria), dolor, picor, permeabilidad capilar incrementada, hipersecreción glandular, espasmo del músculo liso, y/o infiltración tisular de células inflamatorias, así como secreción de ácidos gástricos, y liberación disminuida de neurotransmisores tales como histamina, acetilcolina, norepinefrina, y serotonina. La detección de cualquiera de estas secuelas, en particular las medibles fácilmente, tales como hipotensión o una erupción cutánea, tal como urticarias, puede usarse como un indicador de la desgranulación de mastocitos.

35 V. Agentes antiinflamatorios

Hay disponibles fácilmente una amplia diversidad de agentes antiinflamatorios para inhibir uno o más aspectos del tipo de respuesta inflamatoria indicada anteriormente (véase, p.ej., la Patente de EE.UU. nº 6.204.245).

Una clase preferida de agente antiinflamatorio son los inhibidores de la desgranulación de mastocitos. Esta clase de compuestos incluye cromolina (ácido 5,5'-(2-hidroxiopropano-1,3-diil)bis(oxi)bis(4-oxo-4H-cromeno-2-carboxílico) (también conocido como cromoglicato), y derivados de 2-carboxilatocromon-5'-il-2-hidroxiopropano tal como bis(acetoximetil), cromoglicato disódico, nedocromil (ácido 9-etil-4,6-dioxo-10-propil-6,9-dihidro-4H-pirano[3,2-g]quinolin-2,8-dicarboxílico) y tranilast (2-[(2E)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enil]amino) y lodoxamida (Ácido 2-[2-cloro-5-ciano-3-(oxaloamino)anilino]-2-oxoacético). La referencia a un compuesto específico incluye sales farmacéuticamente aceptables del compuesto. La cromolina está fácilmente disponible en formulaciones para administración nasal, oral, inhalada o intravenosa. Se cree que estos agentes actúan en una etapa temprana de la respuesta inflamatoria inducida por un péptido de interiorización y, por lo tanto, son más eficaces para inhibir el desarrollo de sus secuelas, incluida una reducción transitoria de la presión arterial. Otras clases de agente antiinflamatorio analizadas anteriormente sirven para inhibir uno o más eventos posteriores que resultan de la desgranulación de mastocitos, tal como la inhibición de la unión de la histamina a un receptor de H1 o H2, pero pueden no inhibir todas las secuelas de la desgranulación de mastocitos o pueden requerir dosificaciones más altas o usarlas en combinaciones. La Tabla 8 a continuación resume los nombres, la fórmula química y el estado según la FDA de varios inhibidores de la desgranulación de mastocitos que pueden usarse.

Tabla 8

	Nombre del fármaco	Nombres alternativos	Fórmula química	Estado según la FDA
5	Azelastina	Astelin, Optivar	4-[(4-clorofenil)metil]-2-(1-metilazepan-4-il)ftalazin-1-ona	Aprobado
10	Bepotastina	Besilato de bepotastina, besilato de betotastina, TAU-284DS, bepotastina	Ácido 4-[4-[(4-clorofenil)-piridin-2-ilmetoxi]piperidin-1-il]butanoico	Aprobado
15	Clorzoxazona	Biomioran, EZE-DS, Escoflex, Flexazona, Mioran, Miotran, Mioflexin, Mioflexina, Neoflex, Paraflex, Parafon Forte Dsc, Patorisin, Relaxazona, Remular, Remular-S, Solaxin, Strifon Forte Dsc, Usaf Ma-10	5-cloro-3H-1,3-benzoxazol-2-ona	Aprobado
20	Cromolina	Cromoglicato, Cromoglicato, Ácido cromoglicico, Aaraoe, Alercom, Alerion, Allergocrom, ApoCromolina, Children't Nasalcrom, Colimune, Crolom, Cromolina Solución nasal, Cromoptic, Cromovet, Fivent, Gastrocrom, Gastrofrenal, GenCromoglicato, Inostrat, Intal, Intal, Inhaler, Intal, Sincroner, Introl, Irtan, Lomudal, Lomupren, Lomusol, Lomuspray, Nalcrom, Nalcron, Nasalcrom, Nasmil, Opticrom, Opticron, Rynacrom, Sofro, Vistacrom, Vividrin	Ácido 5-[3-(2-carboxi-4-oxocromen-6-il)oxi-2-hidroxi]propoxi]-4-oxocromeno-2-carboxílico	Aprobado
25	Epinaestina	Elestat	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ , CAS 80012-43-7	Aprobado
30	Isoproterenol	Aerolona, Aleudrin, Aleudrina, Aludrin, Aludrina, Asiprenol, Asmalar, Assiprenol, Bellasthman, Bronkephrine, Euspiran, Isadrina, Isonoreno, Isonorin, Isorenin, Isuprel, Isuprel Mistometer, Isupren, Medihaler-Iso, NeoEpinino, Neodrenal, Norisodrina, Norisodrina, Aerotrol, Novodrin, Proternol, Respifral, Saventrine, Vapo-Iso	4-[1-hidroxi-2-(propan-2-ilamino)ethyl]benzene-1,2-diol	Aprobado
35	Ketotifeno	Zaditor	C ₁₉ H ₁₉ NOS, CAS 34580-14-8	Aprobado
	Lodoxamida (lodoxamida trometamina)	Alomida	Sal de trometamina de ácido N,N'-(2-cloro-5-ciano-m-fenilene)dioxámico	Aprobado
	Nedocromil	Alocril, Nedocromil [USAN:BAN:INN], Tilade	Ácido 9-etil-4,6-dioxo-10-propilpirano[5,6-g]quinolina-2,8-dicarboxílico	Aprobado

Olopatadina	Clorhidrato de Olopatadina	Ácido 2-[(11Z)-11-(3-dimetilaminopropilideno)-6H-benzo[c][2]benzoxepin-2-il]acético	Aprobado
Pemirolast	Alamast	9-metil-3-(2H-tetrazol-5-il)pirido[2,1-b]pirimidin-4-ona	Aprobado
Pirbuterol	Maxair	6-[2-(terc-butilamino)-1-hidroxietil]-2-(hidroximetil)piridin-3-ol	Aprobado

Otra clase de agente antinflamatorio es los compuestos antihistamínicos. Tales agentes inhiben la interacción de la histamina con sus receptores, y de ese modo inhiben las secuelas resultantes de la inflamación indicadas anteriormente. Hay disponibles comercialmente muchos antihistamínicos, algunos sin receta médica. Los ejemplos de antihistamínicos son azatadina, azelastina, burfrolina, cetirizina, ciproheptadina, doxantrozol, etodroxizina, forskolina, hidroxizina, cetotifeno, oxatomida, pizotifeno, proxicromil, piperazinas N,N'-sustituidas o terfenadina. Los antihistamínicos varían en su capacidad de bloquear los receptores de histamina en el SNC así como los receptores periféricos, y los antihistamínicos de segunda y tercera generación tienen selectividad hacia los receptores periféricos. Acrivastina, Astemizol, Cetirizina, Loratadina, Mizolastina, Levocetirizina, Desloratadina, y Fexofenadina, son ejemplos de antihistamínicos de segunda y tercera generación. Los antihistamínicos están disponibles de manera generalizada en formulaciones orales y tópicas. Algunos antihistamínicos adicionales que pueden usarse se resumen en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9

Nombre del fármaco	Nombres alternativos	Fórmula química	Estado según la FDA
Fumarato de Ketotifeno	Ketotifeno, Zaditor	C ₁₉ H ₁₉ NOS	Aprobado
Mequitazina	Butix, Instotal, Kitazemin, Metaplexan, Mircol, Primalan, Vigigan, Virginan, Zesulan	10-(1-azabicyclo[2.2.2]octan-8-ilmetil)fenotiazina	Aprobado
Dexbromfeniramina	Ilvan	(3S)-3-(4-bromofenil)-N,N-dimetil-3-piridin-2-ilpropan-1-amina	Aprobado
Metdilazina	Bristalina, Dilosyn, Disyncram, Disyncran, Tacaryl, Tacaryl hydrochloride, Tacazyl, Tacryl	10-[(1-metilpirrolidin-3-il)metil]fenotiazina	Aprobado
Clorfeniramina	Aller-Chlor, Allergican, Allergisan, Antagonate, Chlo-Amine, Chlor-Trimeton, Chlor-Trimeton Allergy, Chlor-Trimeton Repetabs, Chlor-Tripolon, Chlorate, Cloropiril, Cloropiril, Efidac 24 Chlorpheniramine Maleate, Gen-Allerate, Haynon, Histadur, Kloromin, Mylaramine, Novo-Pheniram, Pediacare Allergy Formula, Phenetron, Piriton, Polaramine, Polaronil, Pyridamal 100, Telachlor, Teldrin	3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-3-piridin-2-ilpropan-1-amina	Aprobado

5	Bromofeniramina	Bromfed, Bromfenex, Dimetane, Veltane	3-(4-bromofenil)-N,N-dimetil-3-piridin-2-ilpropan-1-amina	Aprobado
	Terbutalina	Brethaire, Brethine, Brican, Bricanyl, Bricar, Bricaril, Bricyn	5-[2-(terc-butilamino)-1-hidroxietil]benceno-1,3-diol	Aprobado
	pimecrolimus	Elidel	(3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19R,26aS)-3-[(E)-2-[(1R,3R,4S)-4-Cloro-3-metoxiciclohexil]-1-metilvinil]-8-etil-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-hexadecahidro-5,19-dihidroxi-14,16-dimetoxi-4,10,12,18-tetrametil-15,19-epoxi-3H-pirido[2,1-c][1,4]oxaazaciclotricosina-1,7,20,21(4H,23H)-tetrona	Aprobado como tópico, en investigación como oral

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

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

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

Pueden usarse diferentes clases de fármacos en combinaciones para la inhibición de una respuesta inflamatoria. Una combinación preferida es un inhibidor de la desgranulación de mastocitos y un antihistamínico.

VI. Conjugación

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

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

VII. Pacientes susceptibles de tratamiento/profilaxis

Una amplia diversidad de pacientes son susceptibles de tratamiento, como se ejemplifica mediante los agentes farmacológicos y afecciones asociadas enumeradas en la Tabla 1. Los métodos son de uso particular en los pacientes que tienen una afección que exacerbaría cualquier inflamación que resultase de un péptido de interiorización, por ejemplo, un paciente que padece hipertensión, pulso elevado u otros signos o síntomas de inflamación. Los métodos también son especialmente útiles en métodos de tratamiento que requieren una dosis elevada de agente farmacológico unido al péptido de interiorización. En sentido estricto, lo que determina la presencia y el grado de la respuesta inflamatoria, si la hay, es la dosis del péptido de interiorización más que el agente farmacológico unido. Sin embargo, la dosis del péptido de interiorización está determinada, por supuesto, por

la dosis del agente farmacológico unido. Por ejemplo, se puede hacer perceptible una respuesta inflamatoria a una dosis de más de 1,5 mg/kg de péptido de interiorización. En el tratamiento de ciertas enfermedades, la dosis eficaz del agente farmacológico y por lo tanto del péptido de interiorización unido es demasiado baja para inducir una respuesta inflamatoria en la mayoría de pacientes. Sin embargo, la sensibilidad de los pacientes individuales a una respuesta inflamatoria puede variar, y el tratamiento con un agente antiinflamatorio suave, tal como una histamina, todavía puede ser una precaución conveniente.

Una clase de pacientes de interés particular son aquellos que tienen o que corren el riesgo de tener una enfermedad o afección caracterizada por la excitotoxicidad. Tales enfermedades y afecciones incluyen ictus, epilepsia, hipoxia, lesión traumática del SNC no asociada a ictus, tal como lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Tales afecciones también incluyen pacientes que se someten a cirugía que afecta o puede afectar un vaso (p.ej., vena yugular o arteria carótida) suministrando o extrayendo la sangre hacia o desde el cerebro, particularmente pacientes que se someten a neurocirugía, tal como cirugía endovascular para reparar un aneurisma o cirugía endovascular para un vaso sanguíneo que suministra una extremidad, médula espinal, retina o riñón (véase 61/185.989 presentada el 10 de junio de 2009 y el expediente del abogado 026373-00920PC presentado aquí). Tal reparación puede efectuarse, por ejemplo, insertando un stent o espiral en el vaso sanguíneo del sujeto al aneurisma. Los medios anteriores son adecuados para tratar a pacientes de sexo masculino y femenino que tienen o que corren el riesgo de tener tales enfermedades y afecciones.

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

Tabla 4

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

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

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

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

Un ictus isquémico se refiere de manera más específica a un tipo de ictus que está provocado por el bloqueo del flujo sanguíneo en el cerebro. Lo más frecuentemente, la afección subyacente para este tipo de bloqueo es el desarrollo de depósitos grasos que recubren las paredes de los vasos. Esta afección se denominada aterosclerosis. Estos depósitos grasos pueden provocar dos tipos de obstrucción. La trombosis cerebral se refiere a un trombo (coágulo sanguíneo) que se desarrolla en la parte obstruida del vaso. "Embolia cerebral" se refiere en general a un coágulo sanguíneo que se forma en otra localización del sistema circulatorio, normalmente el corazón y las arterias de gran tamaño de la parte superior del pecho y del cuello. Después se desprende una porción del coágulo sanguíneo, entra en el torrente sanguíneo y viaja a través de los vasos sanguíneos del cerebro hasta que alcanza vasos demasiado pequeños para poder pasar. Una segunda causa importante de embolia es un ritmo

cardíaco irregular, conocido como fibrilación arterial. Esto crea condiciones en las que se pueden formar coágulos en el corazón, desprenderse y viajar hacia el cerebro. Las causas potenciales adicionales de ictus isquémico son hemorragia, trombosis, disección de una arteria o vena, un paro cardíaco, choque de cualquier causa que incluye hemorragia, y causas yatrógenas tales como lesión quirúrgica directa en los vasos sanguíneos del cerebro o vasos que conducen al cerebro o cirugía cardíaca o pulmonar. El ictus isquémico representa alrededor del 83 por ciento de todos los casos de ictus.

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

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

VIII. Administración de un agente farmacológico con un agente antiinflamatorio

En los métodos en los que se administra un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización con un agente antiinflamatorio, las dos entidades se administran lo suficientemente próximas en el tiempo de forma que el agente antiinflamatorio pueda inhibir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido de interiorización. El agente antiinflamatorio se puede administrar antes, al mismo tiempo que o después del agente farmacológico, pero preferiblemente se administra antes. El momento preferido depende en parte de la farmacocinética y la farmacodinámica del agente antiinflamatorio. El agente antiinflamatorio puede administrarse en un intervalo antes del agente farmacológico, de forma que el agente antiinflamatorio está cerca de la concentración sérica máxima en el momento en el que se administra el agente farmacológico. En general, el agente antiinflamatorio se administra entre 6 horas antes del agente farmacológico y una hora después. Por ejemplo, el agente antiinflamatorio puede administrarse entre 1 hora antes y 30 minutos después del agente farmacológico. Preferiblemente, el agente antiinflamatorio se administra entre 30 minutos antes y 15 minutos después del agente farmacológico, y más preferiblemente dentro de los 15 minutos antes y al mismo tiempo que el agente farmacológico. En algunos métodos, el agente antiinflamatorio se administra antes del agente farmacológico dentro de un período de 15, 10 o 5 minutos antes de administrar el agente farmacológico. En algunos métodos, el agente se administra 1-15, 1-10 o 1-5 minutos antes del agente farmacológico.

Cuando la administración de un agente no es instantánea, tal como con la infusión intravenosa, se considera que el agente antiinflamatorio y el agente farmacológico se administran al mismo tiempo si sus períodos de administración son coextensivos o superpuestos. Los períodos de tiempo de administración antes de la administración comienzan desde el comienzo de su administración. Los períodos de tiempo después de la administración comienzan desde el final de su administración. Los períodos de tiempo en referencia a la administración del agente antiinflamatorio se refieren al comienzo de su administración.

Cuando se dice que un agente antiinflamatorio puede inhibir la respuesta inflamatoria de un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización, lo que significa es que los dos se administran lo suficientemente cerca en el tiempo como para que el agente antiinflamatorio inhiba la respuesta inflamatoria inducible por el agente farmacológico unido al péptido de interiorización si tal respuesta ocurre en un paciente particular, y no necesariamente implica que tal respuesta ocurra en ese paciente. Algunos pacientes son tratados con una dosis de agente farmacológico unido a un péptido de interiorización que se asocia con una respuesta inflamatoria en un número estadísticamente significativo de pacientes en un ensayo clínico o no clínico controlado. Puede suponerse razonablemente que una proporción significativa de tales pacientes, aunque no necesariamente todos, desarrollan una respuesta antiinflamatoria al agente farmacológico unido al péptido de interiorización. En algunos pacientes, se

detectan o son detectables signos o síntomas de una respuesta inflamatoria al agente farmacológico unido al péptido de interiorización.

En el tratamiento clínico de un paciente individual, normalmente no es posible comparar la respuesta inflamatoria de un agente farmacológico unido a un péptido de interiorización en presencia y ausencia de un agente antiinflamatorio. Sin embargo, se puede concluir razonablemente que el agente antiinflamatorio inhibe una respuesta antiinflamatoria inducible por el péptido si se observa una inhibición significativa en las mismas o similares condiciones de coadministración en un ensayo clínico o preclínico controlado. Los resultados en el paciente (p.ej., presión arterial, frecuencia cardíaca, urticarias) también pueden compararse con los resultados típicos de un grupo de control en un ensayo clínico como un indicador de si se produjo inhibición en el paciente individual. Normalmente, el agente antiinflamatorio está presente a una concentración sérica detectable en cierto punto dentro del periodo de tiempo de una hora después de la administración del agente farmacológico. La farmacocinética de muchos agentes antiinflamatorios se conoce ampliamente, y el momento relativo de administración del agente antiinflamatorio se puede ajustar en consecuencia. El agente antiinflamatorio se administra normalmente de manera periférica, es decir, segregado por la barrera hematoencefálica del cerebro. Por ejemplo, el agente antiinflamatorio puede administrarse por vía oral, intravenosa o tópica dependiendo del agente en cuestión. Si el agente antiinflamatorio se administra al mismo tiempo que el agente farmacológico, los dos se pueden administrar como una formulación combinada o por separado.

En algunos métodos, el agente antiinflamatorio es uno que no atraviesa la barrera hematoencefálica cuando se administra por vía oral o intravenosa, al menos en cantidades suficientes para ejercer una actividad farmacológica detectable en el cerebro. Tal agente puede inhibir la desgranulación de mastocitos y sus secuelas que resultan de la administración del agente farmacológico en la periferia sin ejercer ningún efecto terapéutico detectable en el cerebro. En algunos métodos, el agente antiinflamatorio se administra sin ningún cotratamiento para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica o para derivatizar o formular el agente antiinflamatorio para aumentar su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, en otros métodos, el agente antiinflamatorio, por su naturaleza, derivatización, formulación o vía de administración, puede ingresar al cerebro o influir de otro modo en la inflamación en el cerebro, ejercer un doble efecto en la supresión de la desgranulación de mastocitos y/o sus secuelas en la periferia debido a un péptido de interiorización e inhibir la inflamación en el cerebro. Strbian et al., documento WO 04/071531 han informado que un inhibidor de la desgranulación de mastocitos, cromoglicato, administrado por vía i.c.v. pero no intravenosamente tiene actividad directa en la inhibición de infartos en un modelo animal.

En algunos métodos, el paciente no se trata también con el mismo agente antiinflamatorio coadministrado con el agente farmacológico en el día, semana o mes anterior o siguiente a la coadministración con el agente farmacológico. En algunos métodos, si el paciente está siendo tratado con el mismo agente antiinflamatorio coadministrado con el agente farmacológico en un régimen recurrente (por ejemplo, la misma cantidad, vía de administración, frecuencia de dosificación, momento del día de la dosificación), La coadministración del agente antiinflamatorio con el agente farmacológico no conlleva al régimen recurrente en ninguna o todas las cantidades, vías de administración, frecuencia de dosificación u hora del día de la dosificación. En algunos métodos, no se conoce que el paciente padezca una enfermedad o afección inflamatoria que requiera la administración del agente antiinflamatorio coadministrado con el agente farmacológico en los presentes métodos. En algunos métodos, el paciente no padece de asma o enfermedad alérgica tratable con un inhibidor de la desgranulación de mastocitos. En algunos métodos, el agente antiinflamatorio y el agente farmacológico se administran una vez y solo una vez dentro de una ventana como se definió anteriormente, por episodio de enfermedad, siendo un episodio un período relativamente corto en el que los síntomas de la enfermedad están flanqueados por períodos más largos en que síntomas están ausentes o reducidos.

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

IX. Tratamiento/profilaxis

a) Tratamiento

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

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

b) Profilaxis

La invención también proporciona métodos y composiciones para el uso en la profilaxis de un trastorno en un sujeto que corre el riesgo de tener ese trastorno. Normalmente, tal sujeto tiene una probabilidad incrementada de desarrollar el trastorno (p.ej., una afección, dolencia, trastorno o enfermedad) respecto de una población de control. La población de control, por ejemplo, puede comprender uno o más individuos seleccionados aleatoriamente de la población general (p.ej., coincidentes en edad, sexo, raza y/o etnia) a los que no se les ha diagnosticado o que no tienen antecedentes familiares del trastorno. Se puede considerar que un sujeto corre el riesgo de tener un trastorno si se descubre que un "factor de riesgo" asociado a ese trastorno está asociado a ese sujeto. Un factor de riesgo puede incluir cualquier actividad, rasgo, suceso o propiedad asociada a un trastorno determinado, por ejemplo, por medio de estudios estadísticos o epidemiológicos en una población de sujetos. Un sujeto se puede clasificar así como en riesgo de un trastorno incluso si los estudios que identifican los factores de riesgo subyacentes no incluyeron de manera específica al sujeto. Por ejemplo, un sujeto que se somete a cirugía cardíaca tiene riesgo de ataque isquémico cerebral transitorio porque la frecuencia del ataque isquémico cerebral transitorio se incrementa en una población de sujetos que se han sometido a cirugía cardíaca en comparación con una población de sujetos que no se han sometido a ella.

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

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

X. Composiciones farmacéuticas, dosis, y vías de administración

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

ejemplo, se pueden usar los agentes quiméricos liofilizados de la invención en las formulaciones y composiciones descritas más adelante.

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

Algunas composiciones farmacéuticas son una coformulación de un agente activo y un agente antiinflamatorio como se describió anteriormente para la administración simultánea del agente activo y el agente antiinflamatorio. Tales coformulaciones típicamente tienen los agentes activos disueltos en solución, aunque los agentes activos también pueden coliofilizarse o liofilizarse individualmente y mezclarse, y después reformularse antes de su uso. Ya sea que se mezcle a partir de soluciones o mediante la reconstitución de un liofilizado, la formulación está preferiblemente sustancialmente libre de partículas visibles en la formación (es decir, menos del 10%, 5% o 1% de cada agente activo está en forma de partículas). La formulación preferiblemente permanece sustancialmente libre de partículas visibles durante el almacenamiento durante al menos una semana, un mes o un año. La formulación puede almacenarse en forma líquida fría (en un refrigerador a alrededor de 4 grados C o puede almacenarse en forma congelada).

Un ejemplo de tal composición es una coformulación de Tat-NR2B9c con lodoxamida. Los dos agentes activos se pueden formular en una solución acuosa en un rango de concentraciones de los agentes activos. Por ejemplo, la concentración de Tat-NR2B9c puede variar de alrededor de 1-30 mg/ml y la de lodoxamida de 0,1 a 5 mg/ml. La coformulación también puede contener un agente de tonicidad (p.ej., NaCl), ácido clorhídrico o hidróxido de sodio para ajustar el pH, un tampón, un conservante y varios otros excipientes usados en la preparación comercial de lodoxamida, tal como manitol, hidroxipropilmetilcelulosa 2910, citrato de sodio, ácido cítrico, edetato disódico, tiloxapol. La formulación se puede preparar, por ejemplo, simplemente mezclando Tat-NR2B9c en solución salina con Alomida (lodoxamida), como se define adicionalmente en los Ejemplos y agitando en vórtex. El Tat-NR2B9c está preferiblemente a una concentración de 10-30 mg/ml o más preferiblemente 20 mg/ml. El NA-1 y la lodoxamida se combinan en una relación de alrededor de 2:3 o más preferiblemente 1,89:3,11.

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

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

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

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

Para la administración oral, los agentes quiméricos se pueden formular con vehículos farmacéuticamente aceptables en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente a tratar. Para las formulaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen rellenos tales como carbohidratos, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcellulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico. Si se desea, las formas farmacéuticas sólidas se pueden revestir con carbohidratos o con un revestimiento entérico mediante el uso de las técnicas habituales. Para las preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y disoluciones, los vehículos adecuados, excipientes o diluyentes incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes. Además, se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares.

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

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

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

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

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

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

La coadministración de un agente antiinflamatorio con un agente farmacológico es particularmente útil cuando el agente farmacológico se administra a dosis más altas donde es más probable que se produzca la desgranulación de mastocitos. Para la administración del agente quimérico Tat-NR2B9c a humanos, un nivel de dosis aproximado donde es probable que ocurra la desgranulación de mastocitos es una dosis mayor o igual a 2,6 mg/mg. Por lo tanto, la coadministración de un agente antiinflamatorio es particularmente útil a una dosis de Tat-NR2B9c mayor o igual a 2,6 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg. Por lo general, la dosis no es superior a 50 mg/kg.

Aunque las dosis más bajas pueden ser igualmente eficaces en muchos pacientes, el uso de dosis altas es ventajoso en enfermedades extremadamente agudas, como el ictus, en el que si la primera administración de un agente farmacológico es insuficiente, existen muy pocas oportunidades de una segunda. Por supuesto, se espera alguna variación entre pacientes individuales en la dosis precisa a la que se produce la desgranulación de mastocitos. Por lo tanto, también puede ser útil administrar el antiinflamatorio como precaución a dosis más bajas de Tat-NR2B9c en caso de que se produzca la desgranulación de mastocitos en unos pocos pacientes con una susceptibilidad mayor de lo normal. Por ejemplo, el agente antiinflamatorio puede administrarse a dosis de Tat-NR2B9c mayores o iguales a 0,5 mg/kg, 1 mg/mg o 2 mg/kg.

En algunos métodos, en los cuales se trata una población de pacientes, a algunos pacientes se les administra un agente antiinflamatorio y a algunos no dependiendo de la dosis del agente farmacológico unido al péptido de interiorización donde los pacientes que reciben una dosis más alta reciben el agente antiinflamatorio. El punto de transición para administrar o no administrar el agente antiinflamatorio para Tat-NR2B9c puede ser una dosis de alrededor de 1-3 mg/kg. Por ejemplo, a los pacientes que reciben 1 mg/kg o menos no se les administra el agente antiinflamatorio, a los pacientes que reciben 3 mg/kg o más se les administra el agente antiinflamatorio y a los pacientes que reciben una dosis de más de 1 y menos de 3 mg/kg, se les puede administrar o no el antiinflamatorio. Por supuesto, el esquema anterior es solo un ejemplo, y se puede establecer un punto de transición diferente. Además, a todos los pacientes que reciben una dosis igual o superior al punto de transición se les puede administrar el antiinflamatorio y todos los pacientes que reciben una dosis inferior al punto de transición pueden tratarse sin el antiinflamatorio. Además, a todos los pacientes se les puede administrar el antiinflamatorio sin tener en cuenta la

dosis del agente farmacológico unido al péptido de interiorización, como se analizó anteriormente. Las dosis indicadas anteriormente para el agente quimérico Tat-NR2B9c (YGRKKRRQRRRLSSI ESDV; SEQ ID N°:6) también pueden usarse para variantes relacionadas de ese agente en las que uno o algunos aminoácidos se sustituyen, insertan o delecionan y el peso molecular sigue siendo el mismo dentro de alrededor de +/- 25%. Sin embargo, en general, las dosis equivalentes de otros agentes con el fin de determinar cuándo administrar un agente inflamatorio pueden determinarse al calcular la dosis de ese agente que administra una cantidad equimolar de péptido de interiorización a una dosis dada de Tat-NR2B9c.

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

XI. Equipos

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

XII. Métodos de cribado

A. Medida de la Actividad de Interiorización

Las variantes del péptido tat o de otro péptido de interiorización se pueden ensayar por la actividad de transporte en un animal. Los péptidos de interiorización se pueden ensayar solos o cuando están unidos a un agente activo, tal como un péptido activo, p.ej., KLSSI ESDV (SEQ ID N°:5). El péptido de interiorización, opcionalmente unido a un agente activo, tal como un péptido, se marca, preferiblemente con un marcador fluorescente, tal como cloruro de dansilo. El péptido de interiorización se inyecta después de manera periférica en un animal, tal como un ratón. Es adecuada la inyección intraperitoneal o intravenosa, por ejemplo. Alrededor de una hora después de la inyección, los ratones se sacrifican, se perfunden con disolución fijadora (3% de paraformaldehído, 0,25% de glutaraldehído, 10% de sacarosa, 10 U/mL de heparina en solución salina). Después se extraen los cerebros, se congelan y se cortan. Se analiza la fluorescencia en los cortes mediante el uso de un microscopio confocal. La actividad de interiorización se determina a partir de la fluorescencia, opcionalmente respecto de controles positivos y negativos. Un control positivo adecuado es el péptido tat estándar unido al mismo péptido activo (si está presente) como péptido de interiorización a ensayar. Un control negativo adecuado es el péptido activo marcado de manera fluorescente sin unir a un péptido de interiorización. También se puede usar el vehículo sin marcar como control negativo.

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

2. Medida de la Actividad en el Tratamiento del Ictus

La actividad de los agentes quiméricos que comprenden un péptido de interiorización unido a un agente se puede ensayar en diversos modelos animales de ictus. En tal modelo, se somete a ratas macho Sprague-Dawley adultas a oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) transitoria durante 90 minutos mediante el método de sutura intraluminal (36,37). Se hace ayunar a los animales durante la noche y se les inyecta sulfato de atropina (0,5 mg/kg IP). Después de 10 minutos, se induce la anestesia. Se intuba a las ratas de manera oral, se ventilan mecánicamente, y se paralizan con bromuro de pancuronio (0,6 mg/kg IV). La temperatura corporal se mantiene a 36,5-37,5 °C con una lámpara de calentamiento. Se usan catéteres de polietileno en la arteria y vena femoral para registrar continuamente la tensión arterial y para tomar muestras de sangre para las medidas de gases y de pH. La MCAO transitoria se lleva a cabo durante 90 min introduciendo una sutura de nailon de monofilamento 3-0 revestido de poli-L-lisina (Harvard Apparatus) en el círculo de Willis por medio de la arteria carótida interna, lo que ocluye de manera eficaz la arteria cerebral media. Esto produce un infarto considerable que abarca la corteza cerebral y los ganglios basales. Los animales se tratan con un agente quimérico de ensayo o un control negativo o positivo. El tratamiento puede ser antes o hasta una hora después de inducir la isquemia. Un control negativo puede ser el vehículo. Un control positivo puede ser el péptido Tat-NR2B9c, YGRKKRRQRRRLSSI ESDV (SEQ ID N°:6), que se ha demostrado previamente que es eficaz. El agente quimérico se administra mediante una única inyección rápida intravenosa 45 min antes de la MCAO (3 nmoles/g). Después de administrar los compuestos a los animales, se

determina el volumen de infarto y/o el índice de discapacidad. Los volúmenes de infarto se determinan normalmente 24 hr tras el tratamiento, pero se pueden determinar en un momento posterior tal como 3, 7, 14 ó 60 días. El índice de discapacidad se puede monitorizar a lo largo del tiempo, p.ej., 2 hr tras el tratamiento, 24 hr tras el tratamiento, una semana y un mes tras el tratamiento. Los agentes quiméricos que muestran una reducción estadísticamente significativa del volumen de infarto y/o del índice de discapacidad respecto de los animales de control sin tratar con los compuestos se identifican por tener una actividad útil para poner en práctica los métodos de la invención.

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

La arteria cerebral media izquierda se puede ocluir mediante el método de sutura intraluminal descrito por Longa, Stroke 20, 84-91 (1989). Brevemente, la arteria carótida común izquierda (ACC) se expone por medio de una incisión en el cuello en la línea media y se diseca sin nervios ni fascia circundantes, desde su bifurcación hasta la base del cráneo. Después se aíslan las ramas arteriales occipitales de la arteria carótida externa (ACE), y estas ramas se disecan y coagulan. La ACE se diseca adicionalmente de manera distal y se coagula junto con las ramas arteriales lingual y maxilar terminales, que después se dividen. La arteria carótida interna (ACI) se aísla y se separa del nervio vago adyacente, y la arteria pterigopalatina se liga cerca de su origen. La punta de una sutura de nailon de monofilamento 3-0 de 4 cm de longitud (Harvard Apparatus) se redondea quemándola para conseguir un diámetro de punta de 0,33-0,36 mm y una longitud de punta de 0,5-0,6 mm, y se reviste con poli-L-lisina. La sutura se introduce a través de la ACC y se hace avanzar hacia la ACI y desde allí hacia el círculo de Willis (alrededor de 18-20 mm desde la bifurcación de la carótida), ocluyendo de manera eficaz la arteria cerebral media. La sutura de seda alrededor de la ACC se tensa alrededor de la sutura de nailon intraluminal para sujetarla y ocluir permanentemente la arteria cerebral media.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Impacto del Sexo sobre la Eficacia Neuroprotectora de Tat-NR2B9c

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

Métodos

Animales

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

Procedimiento General

Las ratas se anestesiaron con una inyección intramuscular de 0,5 ml/kg de ketamina (100 mg/kg), acepromazina (2 mg/kg), y xilazina (5 mg/kg), complementada con un tercio de la dosis inicial según fuera necesario. Se insertó una sonda de temperatura anal y el animal se colocó sobre una almohadilla de calentamiento mantenida a 37 °C. Se insertó una cánula en la arteria carótida externa (ACE) derecha con un tubo de polietileno PE 10 para las inyecciones de colorante. El cráneo se expuso por medio de una incisión en la línea media, se retiró el tejido, y el músculo temporal se desconectó del cráneo en el lado derecho. Mediante el uso de un microscopio de disección y un taladro dental neumático, se hizo una ventana craneal de 6x4 mm sobre la corteza somatosensorial derecha (2 mm caudal y 5 mm lateral respecto a bregma) taladrando un rectángulo a través del cráneo y levantando el fragmento de cráneo a la vez que se mantenía intacta la duramadre. Después de bañarlo con líquido cefalorraquídeo artificial, se realizaron pequeñas inyecciones rápidas (10 a 20 µL) del colorante vital azul violeta patente (10 mMol/L;

Sigma) en solución salina normal, en la arteria carótida externa derecha para demostrar el tránsito a través de los vasos superficiales de la corteza. Se seleccionaron tres ramas arteriolas críticas de la ACM alrededor de la corteza de barriles y se cauterizaron eléctricamente a través de la duramadre. Tras las cauterizaciones, las inyecciones rápidas y los tránsitos del colorante se repitieron para asegurar que se bloquearon los tránsitos a través de las arteriolas cauterizadas. El rectángulo del cráneo se sustituyó sobre la ventana y se suturó el cuero cabelludo. El catéter se retiró de la ACE, se ligó la ACE, y se suturó el cuello anterior. Una hora tras el inicio de la oclusión focal, se infundieron 0,3 ml de fármaco (3 nMol/g de peso corporal) o control de solución salina a través de la vena de la cola a una velocidad de 0,06 ml/min. Cada rata se devolvió a su jaula individual con una lámpara de calentamiento para mantener la temperatura corporal hasta que la rata se recuperó completamente. Se suministró alimento y agua a voluntad.

Recogida del Tejido Cerebral y Análisis del Tamaño de Infarto

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

Resultados y conclusiones

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

Ejemplo 2

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

Métodos

Cultivo celular

Se esterilizaron ratones C57 con etanol del 70%, y el fémur se disecó de la piel y del tejido conectivo. Se recogieron las células de la médula ósea y se resuspendieron en OPTI-MEM (Gibco) que contenía un 5% de FBS termoinactivado, 6% de medio acondicionado con WEHI (como fuente de IL-3), y 2-mercaptoetanol 55 μ M. Las células se cultivaron a aproximadamente 1×10^6 células/mL. Después de 2 días, se recogieron las células y se centrifugaron, y el sedimento se colocó en una placa nueva con medio nuevo. Se añadió medio acondicionado con WEHI nuevo cada semana. Las células se cultivaron durante alrededor de 4 semanas, tras lo cual fueron >95% de mastocitos, y se usaron para el ensayo de desgranulación de mastocitos.

Ensayo de desgranulación de mastocitos

Se determinó la actividad de triptasa mediante el uso del Equipo de Ensayo de Desgranulación de Mastocitos (CHEMICON, Temecula, CA). Tras el aislamiento, las células se lavaron y se resuspendieron hasta aproximadamente 1×10^6 células/mL en Tampón de Ensayo 1X. Para el tratamiento con Tat-NR2B9c u otros péptidos, se añadieron 50 μ L de disolución de las concentraciones siguientes: 0,125 mg/mL, 1,25 mg/mL, 12,5 mg/mL, o 125 mg/mL a la suspensión celular, y se usó A23187 500 nM (Calcimicina), un inductor conocido de la liberación de triptasa en mastocitos, como control positivo. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 60 minutos. La suspensión celular se centrifugó a 700 x g y el sobrenadante se recogió con cuidado. Se preparó una mezcla de ensayo (proporcionada en el equipo) en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La reacción colorimétrica se inició añadiendo 20 μ L del Sustrato de Triptasa a cada pocillo experimental y de control. Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Se leyó la densidad óptica a 405 nm en un lector de microplacas.

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

- 1) Control negativo (tampón de ensayo desprovisto de péptidos)
- 2) Control Positivo (el ionóforo de calcio A23187)
- 3) Tat-NR2B9c

4) La secuencia derivada de Tat de Tat-NR2B9c desprovista de la secuencia de unión a PSD-95

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

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

Todos los péptidos se aplicaron a una concentración de 125 mg/mL para aproximarse a las concentraciones séricas máximas alcanzadas en perros que recibieron una dosis de 10 mg/kg de Tat-NR2B9c en algunos de los experimentos con animales descritos más adelante (basados en suponer un volumen sanguíneo del 8% del peso corporal total).

Resultados y conclusiones

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

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

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

Tabla 5

ID del Péptido	Nombre del Péptido (concentración)	Secuencia/Estructura
	control	(Sin péptido)
	IC (500 nM)	Ionóforo de Calcio
	Tat-NR2B9c (125 mg/ml)	YGRKKRRQRRRLSSIESDV (SEQ ID N°:6)
1990	TAT (125 mg/ml)	YGRKKRRQRRR (SEQ ID N°:2)
1991	2B9c (125 mg/ml)	KLSSIESDV (SEQ ID N°:5)
1992	AA (125 mg/ml)	YGRKKRRQRRRLSSIEADA (SEQ ID N°:7)
1993	F-Tat-NR2B9c (125 mg/ml)	FGRKKRRQRRRLSSIESDV (SEQ ID N°:8)
1994	Tat-NR2B9c K>A (125 mg/m)	YGRKKRRQRRRALSSIESDV (SEQ ID N°:9)
1995	F-Tat-NR2B9c K>A (125 mg/m)	FGRKKRRQRRRALSSIESDV (SEQ ID N°:10)
1992	AA (12,5 mg/ml)	YGRKKRRQRRRLSSIEADA (SEQ ID N°:7)

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

Ejemplo 3

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

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

Ejemplo 4

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

Estudios en Perros Beagle

Se llevó a cabo un estudio GLP de toxicidad intravenosa de 14 días en perros Beagle sin experimentación previa (3/sexo/grupo) (Estudio CRM N° 501448) en el que los animales recibieron inyecciones diarias de 0, 0,25, 1,0, o 10 mg/kg de Tat-NR2B9c. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 1 mL) de todos los animales en los Días 1, 6 y 12 antes de la dosis, 5 y 15 minutos tras la inyección. Las muestras de sangre se recogieron mediante venopunción (yugular, safena y cefálica) en tubos que contenían EDTA. Las muestras se centrifugaron después (en 30 minutos desde la recogida) en una centrífuga refrigerada (aprox. 4 °C) a 2700 rpm durante 10 minutos. El plasma se separó en un segundo tubo con la etiqueta adecuada, y se almacenó a -80 °C hasta el análisis en CRM. Se usaron las muestras de plasma para investigar los niveles de histamina. Las muestras de los animales a los que se administró de manera intravenosa una dosis de Tat-NR2B9c se analizaron mediante el uso de un método validado.

Todos los animales a los que se administraron 10 mg/kg de Tat-NR2B9c exhibieron signos clínicos relacionados con el tratamiento, que consistieron en un enrojecimiento del hocico, encías (que también se observó que estuvieron pálidas), orejas, región periorbital y extremidades, y a menudo estuvieron asociadas a hinchazón. Estos efectos estuvieron asociados a letargia y un pulso no palpable, caracterizados como una reacción hipotensiva grave por el veterinario adjunto. Estos efectos se observaron diariamente, comenzando el primer día de dosificación y persistiendo a lo largo del periodo de dosificación de 14 días, sin una adaptación aparente de los animales. Estos efectos no se debieron al desarrollo de una respuesta inmunitaria basada en anticuerpos, ya que estos animales no se expusieron a Tat-NR2B9c el primer día de dosificación, y no se observó una gravedad incrementada de la respuesta a lo largo de los 14 días de tratamiento. De manera específica, se observaron niveles incrementados de histamina inmediatamente tras la primera administración de Tat-NR2B9c a estos perros Beagle sin experimentación previa (véase la Tabla 6 para un resumen de los niveles plasmáticos de histamina en los perros). Estos animales nunca se habían expuesto a Tat-NR2B9c, y así no debería haber células T de memoria o anticuerpos circulantes contra Tat-NR2B9c. Además, no se observó un incremento coherente de los niveles de histamina durante el estudio de toxicidad de dosis repetidas de 14 días a ningún nivel de dosis, lo que indica que no hay una expansión de una respuesta específica a antígenos. Así, los incrementos observados de los niveles de histamina debidos a Tat-NR2B9c son el resultado de la desgranulación directa de los mastocitos, en vez de una respuesta de anticuerpos específicos de un antígeno.

Tabla 6

Determinación de Histamina en Plasma de Perro mediante Inmunoensayo Enzimático

DÍA 12 Hembras

5

10

15

20

25

30

35

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

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

LLOQ = 0.180 ng/mL

h = la muestra estuvo hemolizada

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

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

respuesta inmunitaria. El efecto está provocado, por tanto, por una desgranulación directa de los mastocitos que provoca la liberación de histamina.

Para obtener una información cardiovascular detallada al nivel de dosis más elevado ensayado en el estudio de toxicidad de dosis repetidas en perros de 14 días (es decir, 10 mg/kg), se llevó a cabo un estudio GLP de telemetría cardiovascular adicional en perros Beagle conscientes sin inmovilizar (Estudio CRM N° 691429). Seis animales (3 machos, 3 hembras) recibieron vehículo por la mañana y 10 mg/kg de Tat-NR2B9c por la tarde del mismo día (al menos 4 horas entre dosis). Los incrementos de la frecuencia cardíaca se observaron durante hasta 15 minutos tras la dosis en los animales tratados, y el efecto máximo se observó a los 10 minutos en machos y hembras. Se observaron disminuciones de los valores de tensión arterial (hasta un 62%) en animales individuales de 5 a 10 minutos tras la dosis. Los animales hembra usados en este estudio cardiovascular adicional se obtuvieron de la colonia de Charles River, y fueron animales con experimentación previa, que se habían usado previamente en el primer estudio cardiovascular de Tat-NR2B9c (Estudio CRM N° 691106). Los efectos observados a 10 mg/kg en el Estudio CRM N° 691429 fueron comparables a los signos clínicos observados en el estudio de toxicidad en perros de 14 días (Estudio CRM N° 501448), con efectos más graves sobre la tensión arterial observados para los animales tratados que los observados al nivel de dosis más alta (5 mg/kg) ensayado en el Estudio CRM N° 691106. Estos resultados indican de nuevo una desgranulación directa de los mastocitos.

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

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

Reacciones Inflamatorias Indicativas de la Liberación de Histamina en Perros

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

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

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

Ejemplo 5

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

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

los antihistamínicos tales como benadriilo, y los corticosteroides tales como dexametasona, tratan de manera eficaz las consecuencias adversas de la desgranulación de mastocitos.

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

Ejemplo 6

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

Métodos

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

Momentos de la Extracción de Sangre:

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

Determinación de la seguridad:

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

Resultados

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

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

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

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

Día	Tiempo (hr)	Número de Sujetos								
		Placebo (n=16)	Dosis de NA-1 (mg/kg)							
			0,02 (n=2)	0,08 (n=2)	0,20 (n=2)	0,375 (n=8)	0,75 (n=8)	1,50 (n=8)	2,60 (n=8)	3,75 (n=8)
5	Cribado	0	0	0	0	1	0	0	0	0
10	1	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0
		0,08	0	0	0	0	0	0	0	0
		0,17	0	0	0	0	0	0	0	7
		0,25	0	0	0	0	0	0	0	3
		0,50	0	0	0	0	0	0	0	0
		1,00	0	0	0	0	0	0	0	0
		2,00	1	0	0	0	0	0	0	0
		24,00	0	0	0	0	0	0	0	0
15	7	N/AP	0	0	0	0	0	0	0	0
	14	N/AP	0	0	0	0	0	0	0	0
	28 Final del estudio	N/AP	0	0	0	0	0	0	0	0

Parte 11: Datos de Seguridad

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

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

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

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

Ejemplo 7

Materiales TAT-NR2B9c sintetizado químicamente por AnaSpec Inc (San José, CA). Rv-Tat-NR2B9c sintetizado químicamente por el Centro de Tecnología de Proteína Avanzada del Hospital Sickkids (Toronto, ON, Canadá). Todos los péptidos se purificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento purificada a >95%. Se prepararon soluciones madre de péptidos (3 mM) en solución salina estéril y se almacenaron en alícuotas a -80 °C. Cromolina, pirilamina, ranitidina, oxatomida y dexametasona comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Las ratas se pusieron a dormir en una cámara con 2% de isoflurano y un gas de 2L de oxígeno, y después se transfirieron a una máscara facial con gas reducido (1% de isoflurano y un gas de 2L de oxígeno) una vez dormidas. Corte femoral de arteria y vena para cateterismo con tubo PE50. Estas arterias y venas proporcionan acceso para el monitoreo continuo de la presión arterial media (PAM) y para la infusión de fármacos, respectivamente. La Cromolina (1 mg/kg/min) o solución salina (1 ml/kg/min) se infundió durante 5 minutos y después se administró TAT-NR2B9c, Rv-Tat-2B9c (3 µM/kg en solución salina) o solución salina (1 ml/kg) mediante inyecciones en bolo inmediatamente después de la infusión de solución salina o cromolina. Mediante el uso de estos estudios, otros fármacos se infundieron 10 minutos antes de la inyección de TAT-NR2B9c. Las cirugías se realizaron en el lado izquierdo del animal. La presión arterial del animal (HEWLETT PACKARD Sistema de presión arterial, modelo 78304A) y la temperatura corporal (Digi Sense Thermometer, modelo 8528-10) se monitorearon cada 1 minuto en 60 minutos. Se administró solución salina (1 ml/kg) a todos los grupos al inicio del estudio, y el grupo de control recibió una solución salina adicional de 2 ml/kg en cada punto de tiempo. Los resultados presentados son la MAP promedio de 5 ratas. Un resumen de todos los experimentos realizados (n = 10 cada fármaco) se presenta en los gráficos respectivos como media ± SEM, (prueba de Student, *, $P < 0.05$ y ***, $p < 0.001$)

La figura 7 muestra que tanto Tat-NR2B9c como Rv-Tat-NR2B9 (tat unido a NR2B9c en orientación inversa) a la dosis alta de 7,5 mg/kg producen una reducción rápida y transitoria en MAP durante un período de alrededor de 0-6 min después de la inyección.

Las Figuras 8A-D muestran el efecto de 5 mg/kg de cromolina administrada por vía intravenosa alrededor de cinco minutos antes de la administración de Tat-NR2B9c. La Figura 8A muestra un transcurso de tiempo de MAP para el tratamiento con Tat-NR2B9c solo, el tratamiento con Tat-NR2B9c más cromolina o el tratamiento con cromolina más solución salina como control. La Figura 8B muestra las áreas bajo la curva. La figura 8C muestra un valor mínimo de MAP. La figura 8D muestra la disminución porcentual máxima en MAP. Los asteriscos indican un resultado estadísticamente significativo. La Figura 8B muestra que el tratamiento con cromolina reduce significativamente la disminución de MAP debido a Tat-NR2B9c. La cromolina en sí no afecta a MAP en ausencia de Tat-NR2B9c como se muestra en el control de solución salina y cromolina. Las comparaciones mostradas en las Figuras 8B-D ilustran aún más el efecto significativo de la cromolina en la inhibición de la disminución de la presión arterial.

Se realizó el mismo experimento con Rv-Tat-NR2B9c usado en lugar de Tat-NR2B9c y se obtuvieron resultados similares como se muestra en las Figuras 8E y F. Es decir, la cromolina inhibió significativamente la disminución de los valores de MAP debido a Rv-Tat-NR2B9c.

Las Figuras 9A-D presentan datos similares, excepto que la difenhidramina (12,5 mg/kg) (Benadryl), un antagonista de la histamina H1, se usó como un agente antiinflamatorio en lugar de cromolina. La difenhidramina también inhibió significativamente la disminución de la presión arterial como se muestra en las Figuras 9A, B y D. Sin embargo, la administración de difenhidramina en sí provocó una fuerte reducción de la presión arterial antes de administrar Tat-NR2B9c. El experimento se repitió excepto que se usó difendidramina a 1 mg/kg. No se observó que la difendidramina tuviera un efecto significativo en la inhibición de la disminución de la presión arterial debido a Tat-NR2b9c a esta dosis. La difenhidramina tampoco redujo la presión arterial a esta dosis.

El experimento se repitió con otro antagonista de H1 pirilamina. Aunque la disminución máxima en la presión arterial debido a Tat-NR2B9c se redujo ligeramente, la reducción no alcanzó significación estadística (véanse las Figuras 10 A-D).

La figura 11A presenta datos similares para una combinación de difenhidramina (12,5 mg/kg) y el antagonista de H2 Ranitidina (10 mg). Los agentes combinados por sí mismos disminuyeron MAP (presumiblemente debido al efecto de la difenhidramina y la reducción inhibida debido a Tat-NR2B9c. La inhibición de la reducción fue significativa como se muestra por los análisis en las Figuras 11B-D. El experimento se repitió usando solo Ranitidina. La Ranitidina no tuvo ningún efecto sobre MAP en sí mismo y cualquier efecto en la inhibición de la disminución de MAP debido a Tat-NR2B9c fue leve y no estadísticamente significativo.

Se realizó un experimento similar con 6 mg/kg de dexametasona como agente antiinflamatorio. La dexametasona se administró alrededor de diez minutos antes que TAT-NR9B9c. No se observó que la dexametasona tuviera un efecto significativo en la inhibición de la disminución de la presión arterial debido a Tat-NR2B9c en este experimento.

Se realizó un experimento similar con 6 mg/kg de lodoxamida coformulada con 3 mg/kg de Tat-NR2B9c en comparación con 3 mg/kg de Tat-NR2B9c. La solución se elaboró fresca al combinar 1,89 ml de Tat-NR2B9c a 20 mg/ml en solución salina al 0,9% con 3,11 ml de Alomide® al 0,1% (lodoxamida) y agitación con vórtex. Cada ml de ALOMIDE® contenía: 1,78 mg de lodoxamida trometamina equivalente a 1 mg de lodoxamida, conservante cloruro

de benzalconio al 0,007%, manitol, hidroxipropilmetilcelulosa 2910, citrato de sodio, ácido cítrico, edetato disódico, tiloxapol, ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio (para ajustar pH) y agua purificada.

La coformulación fue estable. Por el contrario, una coformulación de Tat-NR2B9c con cromolina tiende a precipitar. A los animales (machos, Sprague Dawley) se les permitió comer y beber antes de la cirugía. Los animales se pusieron a dormir en una cámara con isoflurano al 2% y 1 litro de oxígeno. Una vez dormida, la rata se transfirió a una máscara facial con isoflurano al 1% y un gas de 1L de oxígeno. Se usaron tubos PE50 para la conexión de la arteria y la vena femorales. Estas arterias y venas proporcionan acceso para el monitoreo continuo de la presión arterial y para la infusión de fármacos (50 mg por kg en un volumen de 2 ml por kg inyectado en 2 minutos). Las cirugías se realizaron en el lado izquierdo. La presión arterial y la temperatura corporal de los animales se monitorearon durante 90 minutos. La Figura 13A muestra un transcurso de tiempo de MAP después de una infusión de 2 minutos de 3 mM/kg de Tat-NR2B9c con 6 mg/kg de Lodoxamida (estabilizador de mastocitos) de 3 mM/kg de Tat-NR2B9c solo como un control en un volumen de 2 ml. El cotratamiento con lodoxamida puede anular completamente la caída de MAP como resultado de la inyección de Tat-NR2B9c. La cromolina infundida durante tres minutos inmediatamente antes de la administración de TAT2B9c también anuló completamente la caída de MAP (Fig. 13B).

Ejemplo 8

Se comparó Rv-Tat-NR2B9c con Tat-NR2B9c en un modelo de isquemia. Rv-Tat-NR2B9c es el mismo que Tat-NR2B9c, excepto que el orden de los aminoácidos de N-C en la porción tat del péptido se invierte en Rv-Tat-NR2B9c.

Métodos para el modelo de oclusión de tres vasos piales de la isquemia (3PVO): Los experimentos se realizaron en ratas en ayunas (acceso libre durante la noche al agua pero no a la comida). La oclusión permanente de tres vasos piales (3PVO) se realizó según lo descrito por Forder et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. Abril 2005;288(4):H1989-96. En resumen, las ratas se anestesiaron con una inyección intramuscular de 0,5 ml/kg de ketamina (100 mg/kg), acepromacina (2 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg), complementada con un tercio de la dosis inicial según fue necesario. Se monitoreó una temperatura rectal y la temperatura corporal del animal se mantuvo a 37 °C usando una almohadilla térmica. El cráneo se expuso a través de una incisión en la línea media y raspado de tejido. Usando un microscopio de disección y un taladro dental neumático, se hizo una ventana craneal rectangular de 6 a 8 mm sobre la corteza somatosensorial derecha (2 mm caudal y 5 mm lateral a bregma) y se retiró la pieza suelta del cráneo mientras se mantenía la duramadre intacta. Las 3 ramas arteriales del cerebro medio arteriolar pial se cauterizaron eléctricamente alrededor del área de la corteza del barril. La incisión se suturó con suturas de seda 3.0. Los animales se devolvieron a jaulas individuales bajo una lámpara de calentamiento para mantener la temperatura corporal hasta que las ratas se recuperaron por completo. Se suministró comida y agua. Una hora después de la isquemia 3PVO, a las ratas se les inyectó 3 µM/kg de Tat-NR2B9c o Rv-Tat-NR2B9c por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Veinticuatro horas después de la cirugía, el cerebro se recogió rápidamente, se cortó (2 mm de grosor) y se incubó en cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en solución salina durante 15 minutos a 37 °C. Las imágenes se escanearon (CanoScan, 4200F, Canon). El porcentaje de infarto se calculó por corte usando el software ImageJ (NIH).

Rv-Tat-NR2B9c es tan o más eficaz que Tat-NR2B9c en la reducción de infartos en el modelo 3PVO. La Figura 14 muestra un gráfico de barras que muestra el tamaño promedio del infarto para cada grupo.

Ejemplo 9

Se probó una coformulación de lodoxamida y Tat-NR2B9c como se describió anteriormente en comparación con Tat-NR2B9c y se probaron los controles del vehículo en un modelo 3PVO de rata de ictus como se describió anteriormente. El área de infartos resultantes se muestra en la Figura 15. Tat-NR2B9c inhibió significativamente el tamaño del infarto en relación con el control del vehículo. Sin embargo, sorprendentemente, la combinación de lodoxamida y Tat-NR2B9c dio como resultado una reducción estadísticamente significativa en relación con Tat-NR2B9c solo. Por lo tanto, la coadministración periférica de lodoxamida no solo reduce la inflamación debida a Tat-NR2B9c sino que también aumenta su eficacia en la reducción de infartos.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Tymianski, Michael
Garman, Jonathan D
NoNO, Inc.
Arbor Vita Corporation

10 <120> COADMINISTRACIÓN DE UN AGENTE UNIDO A UN PÉPTIDO DE INTERIORIZACIÓN CON UN AGENTE
ANTIINFLAMATORIO

<130> 026373-000920PC

<150> US 60/992,678
<151> 2007-12-05

15 <150> US 12/323,915
<151> 2008-11-26

20 <150> US 61/185,943
<151> 2009-06-10

<160> 72

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 1
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
35 1 5 10

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
40 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

45 <400> 2
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 11
50 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

55 <400> 3
Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 4
60 <211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido tat sintético

<400> 4
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln
 5 1 5 10

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Agente farmacológico sintético

15 <400> 5
 Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val
 1 5

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

<220>
 <223> Péptido Tat-NR2B9c sintético

25 <400> 6
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
 1 5 10 15

30 Glu Ser Asp Val
 20

<210> 7
 35 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Péptido Tat-NR2B9c sintético con 2 mutaciones puntuales en el dominio de unión a PSD-95

<400> 7
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
 45 1 5 10 15

Glu Ala Asp Ala
 20

50 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Péptido F-Tat-NR2B9c sintético

<400> 8
 Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
 60 1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
 20

ES 2 765 281 T3

	<210> 9
	<211> 20
	<212> PRT
5	<213> Secuencia Artificial
	<220>
	<223> Péptido Tat-NR2B9c K>A sintético
	<400> 9
10	Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Leu Ser Ser Ile
	1 5 10 15
	Glu Ser Asp Val
15	20
	<210> 10
	<211> 20
	<212> PRT
20	<213> Secuencia Artificial
	<220>
	<223> Péptido F-Tat-NR2B9c K>A sintético
25	<400> 10
	Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Leu Ser Ser Ile
	1 5 10 15
	Glu Ser Asp Val
30	20
	<210> 11
35	<211> 20
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
40	<223> Secuencia sintética C-terminal de 20-mer de NMDAR2B
	<400> 11
	Phe Asn Gly Ser Ser Asn Gly His Val Tyr Glu Lys Leu Ser Ser Ile
	1 5 10 15
45	Glu Ser Asp Val
	20
	<210> 12
50	<211> 4
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
55	<223> Motivo PL sintético de NMDAR2B
	<400> 12
	Glu Ser Asp Val
	1
60	<210> 13
	<211> 20
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 13

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

10 Ser Thr Val Val
20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

20 <400> 14

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

25 His Arg Glu Ser
20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética C-terminal de 20-mer de NMDAR2C

35 <400> 15

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

40 Glu Ser Glu Val
20

<210> 16

<211> 20

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética C-terminal de 20-mer de NMDAR3A

50 <400> 16

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

55 Thr Cys Glu Ser
20

<210> 17

60 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Secuencia sintética C-terminal de 20-mer de NMDAR2A

<400> 17

ES 2 765 281 T3

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

5 Glu Ser Asp Val
 20

<210> 18
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

15 <400> 18
 Gly Gly Asp Leu Gly Thr Arg Arg Gly Ser Ala His Phe Ser Ser Leu
 1 5 10 15

20 Glu Ser Glu Val
 20

<210> 19
 <211> 20
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

30 <400> 19

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

35 Gly Thr Ser Ile 20

<210> 20
 <211> 20
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

45 <400> 20
 Met Gln Ser Ile Pro Cys Met Ser His Ser Ser Gly Met Pro Leu Gly
 1 5 10 15

50 Ala Thr Gly Leu
 20

<210> 21
 55 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 60 <223> Secuencia sintética C-terminal de 20-mer del receptor de glutamato 2

<400> 21

65

ES 2 765 281 T3

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

5 Ser Val Lys Ile
 20

<210> 22
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

15 <400> 22
 Gln Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Glu Gly Tyr Asn Val Tyr Gly Thr Glu
 1 5 10 15

20 Ser Val Lys Ile
 20

<210> 23
 25 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> Secuencia sintética C-terminal de 20-mer del receptor de glutamato 4

<400> 23
 His Thr Gly Thr Ala Ile Arg Gln Ser Ser Gly Leu Ala Val Ile Ala
 1 5 10 15

35 Ser Asp Leu Pro
 20

40 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia sintética C-terminal de 20-mer del receptor de glutamato 5

<400> 24
 Ser Phe Thr Ser Ile Leu Thr Cys His Gln Arg Arg Thr Gln Arg Lys
 1 5 10 15

Glu Thr Val Ala
 20

55 <210> 25
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia sintética C-terminal de 20-mer del receptor de glutamato 6

<400> 25

65

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

5 **Glu Thr Met Ala 20**

<210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

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

15 <400> 26

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

20 **Pro Val Phe Pro**

20

<210> 27
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

30 <400> 27

Ser Thr Val Val

1

<210> 28
 <211> 4
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Secuencia sintética C-terminal de 4-mer de NMDAR1-2, NMDAR1-3

<400> 28

His Arg Glu Ser

1

45 <210> 29
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia sintética C-terminal de 4-mer de NMDAR2C, NMDAR2D

<400> 29

Glu Ser Glu Val

1

55 <210> 30
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia sintética C-terminal de 4-mer de NMDAR3A

<400> 30
 Thr Cys Glu Ser
 1

5 <210> 31
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética C-terminal de 4-mer del receptor de glutamato delta 2

 <400> 31
 Gly Thr Ser Ile
 1

15 <210> 32
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia sintética C-terminal de 4-mer del receptor de glutamato 1

 <400> 32
 Ala Thr Gly Leu
 1

25 <210> 33
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia sintética C-terminal de 4-mer del receptor de glutamato 2 y receptor de glutamato 3

 <400> 33
 Ser Val Lys Ile
 1

35 <210> 34
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia sintética C-terminal de 4-mer del receptor de glutamato 4

45 <400> 34
 Ser Asp Leu Pro
 1

 <210> 35
 <211> 4
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

55 <400> 35
 Glu Thr Val Ala
 1

60 <210> 36
 <211> 4

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Secuencia sintética C-terminal de 4-mer del receptor de glutamato 6

 <400> 36
 Glu Thr Met Ala
 1

 10 <210> 37
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia sintética C-terminal de 4-mer del receptor de glutamato 7

 <400> 37
 Pro Val Phe Pro
 1

 20 <210> 38
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Péptido sintético

 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = Glu, Asp, Asn o Gln

 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Ser o Thr

 <220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Asp, Glu, Gln o Asn

 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = Val o Leu

 <400> 38
 Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 1

 <210> 39
 <211> 4
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 60 <400> 39
 Glu Thr Asp Val
 1

<210> 40
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 40
 Glu Thr Glu Val
 10 1
 <210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20 <400> 41
 Asp Thr Asp Val
 1
 <210> 42
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <400> 42
 Asp Thr Glu Val
 1
 <210> 43
 35 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Péptido sintético
 <400> 43
 Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val
 1 5
 45 <210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 44
 Gly Ser Ser Ser Ser
 1 5
 55 <210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 45
 Thr Gly Glu Lys Pro
 5 1 5

<210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 46
 Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 47
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 47
 Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
 1 5

<210> 48
 <211> 13
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> Péptido sintético

<400> 48
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln
 1 5 10

40 <210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Variante sintética del péptido tat

<220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido distinto de Tyr o está ausente

<400> 49
 Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

55 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 50
Gly Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys
5 1 5 10

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

15 <400> 51
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210> 52
<211> 10
20 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

25 <400> 52
Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 53
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Péptido tat sintético

<400> 53
Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

40 <210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 54
Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg
50 1 5 10

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

55 <220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 55
Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg
60 1 5

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido tat sintético
 <400> 56
 Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg
 10 1 5 10
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido tat sintético
 20 <400> 57
 Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5
 <210> 58
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido tat sintético
 30 <400> 58
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg
 1 5 10
 <210> 59
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Péptido tat sintético
 <400> 59
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg
 1 5
 45 <210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Péptido tat sintético
 <400> 60
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg
 55 1 5 10
 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 61
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg
5 1 5

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

15 <400> 62
Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg
1 5 10

<210> 63
<211> 11
20 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido tat sintético

25 <400> 63
Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 64
<211> 10
30 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Péptido tat sintético

<400> 64
Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg
1 5 10

40 <210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 65
Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg
1 5 10

50 <210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Péptido tat sintético

<400> 66
Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg
60 1 5

<210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido tat sintético
 <400> 67
 Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg
 10 1 5
 <210> 68
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético análogo de NR2B9c
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Glu, Gln, y Ala, o un análogo del mismo
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Thr o Ser
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = Ala, Gln, Asp, Asn, N-Me-Ala, N-Me-Gln, N-Me-Asp, y N-Me-Asn o un análogo del mismo
 35 <400> 68
 Xaa Xaa Xaa Val
 1
 <210> 69
 <211> 22
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> análogo retro inverso sintético de Tat-NR2B9c
 45 <400> 69
 Val Asp Ser Glu Ile Ser Ser Leu Lys Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys
 1 5 10 15
 50 Lys Arg Gly Tyr Ile Asn
 20
 <210> 70
 55 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> péptido sintético RvTat-NR2B9c
 <400> 70

ES 2 765 281 T3

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

5	Glu	Ser	Asp	Val
				20

	<210> 71
	<211> 5
10	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial

	<220>
	<223> péptido pentámero sintético C-terminal de NMDAR 2B

15	<400> 71
	Ile Glu Ser Asp Val
	1 5

	<210> 72
20	<211> 11
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial

	<220>
25	<223> Péptido tat sintético

	<400> 72
	Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro
	1 5 10

30	
----	--

35	
----	--

REIVINDICACIONES

1. Un agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades en las que el agente farmacológico se administra con un inhibidor de desgranulación de mastocitos para inhibir una respuesta inflamatoria inducible por el péptido tat; y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es lodoxamida, tranilast, bepotastina, clorzoxazona, epinastina, isoproterenol, olopatadina, pemirolast, pimecrolimus o pirbuterol.
2. El agente farmacológico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se formula conjuntamente con el agente farmacológico y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es lodoxamida y el agente farmacológico es Tat-NR2B9c.
3. Un agente farmacológico unido a un péptido tat administrado con un inhibidor de la desgranulación de mastocitos que inhibe una respuesta inflamatoria inducible por el péptido tat para usar en el tratamiento o profilaxis del accidente cerebrovascular, epilepsia, hipoxia, lesión traumática del SNC no asociada con accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o un paciente sometido a cirugía que afecta o puede afectar el suministro de los vasos sanguíneos o la extracción de sangre del cerebro, en el que el agente inhibe las interacciones entre PSD- 95 y NMDAR2B y es un péptido que comprende la SEQ ID NO: 38 en el C-terminal y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos es lodoxamida, tranilast, bepotastina, clorzoxazona, epinastina, isoproterenol, olopatadina, pemirolast, pimecrolimus o pirbuterol.
4. El agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agente farmacológico es Tat-NR2B9c.
5. El agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el péptido tat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende RKRRRQRRR (SEQ ID NO: 51), GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1), YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), FGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 3) o GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 4) o RRRQRRKKRGY (aminoácidos 1-11 de SEQ ID NO: 70).
6. El agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de desgranulación de mastocitos se administra por una ruta periférica
7. El agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de desgranulación de mastocitos se administra dentro de una ventana de 30 minutos antes a 15 después de administrar el agente farmacológico.
8. El agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, para la administración a un sujeto que padece un episodio de una enfermedad y en el que el agente farmacológico y el inhibidor de la desgranulación de mastocitos se administran una vez durante el episodio de la enfermedad.
9. El agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la coformulación se administra por vía intravenosa
10. El agente farmacológico unido a un péptido tat para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente farmacológico también se administra con un antihistamínico.
11. Un kit que comprende un agente farmacológico unido a un péptido tat y lodoxamida.
12. Lodoxamida para el uso en la inhibición de una respuesta inflamatoria causada por una respuesta a la desgranulación de mastocitos inducible por un agente farmacológico unido a un péptido tat.
13. Una coformulación que comprende lodoxamida y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (YGRKKRRQRRKLSSIESDV) y agua.
14. La composición de coformulación de la reivindicación 13 que comprende además cloruro de sodio a una concentración de 50-200 mM y en donde la concentración de lodoxamida es de 0,5-1 mg/ml y la concentración del péptido es de 5-20 mg/ml.

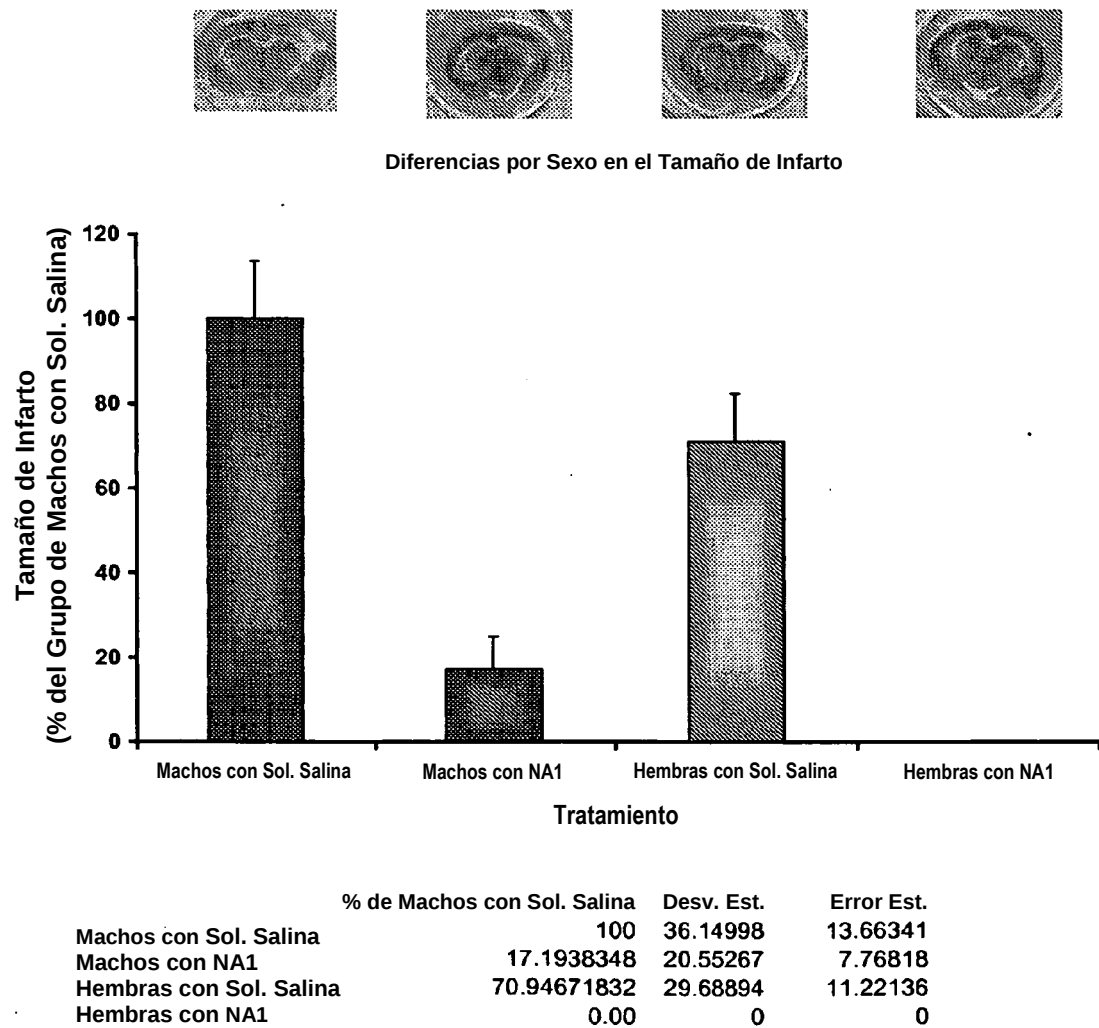


FIGURA 1

Ensayo de Desgranulación de Mastocitos en ratón

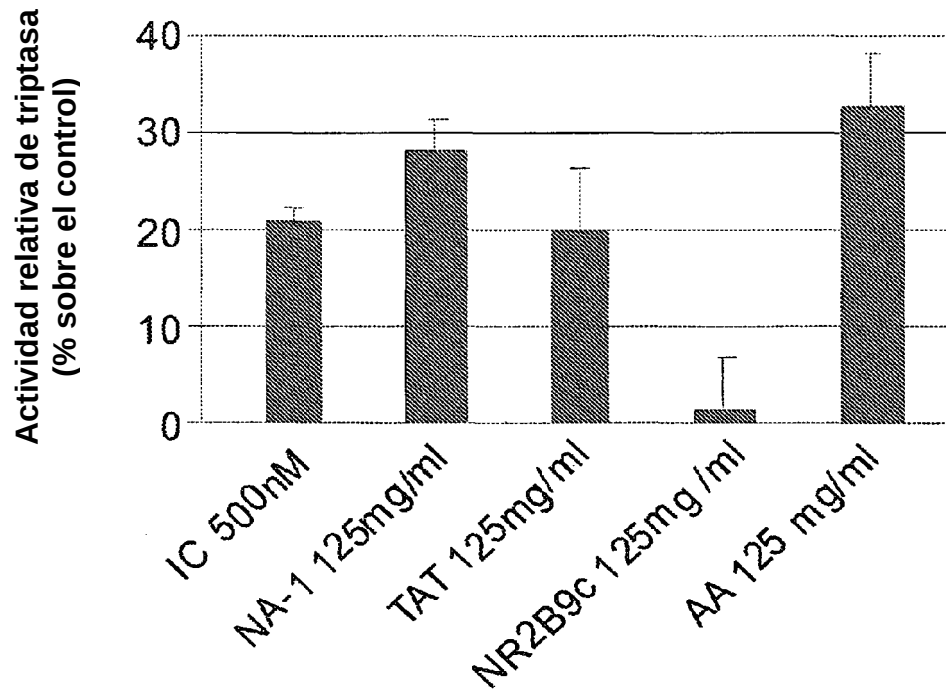


FIGURA 2

Ensayo de Desgranulación de Mastocitos

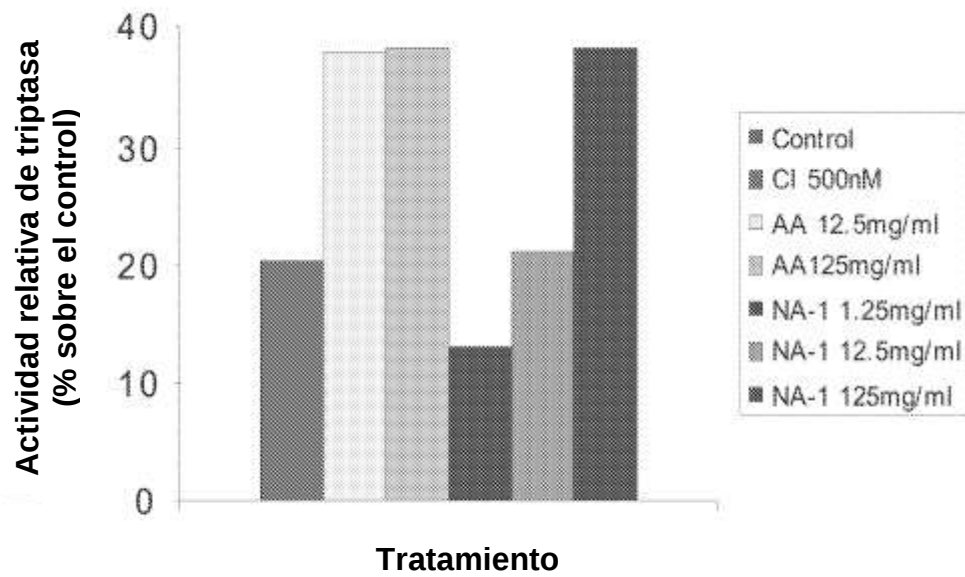


FIGURA 3

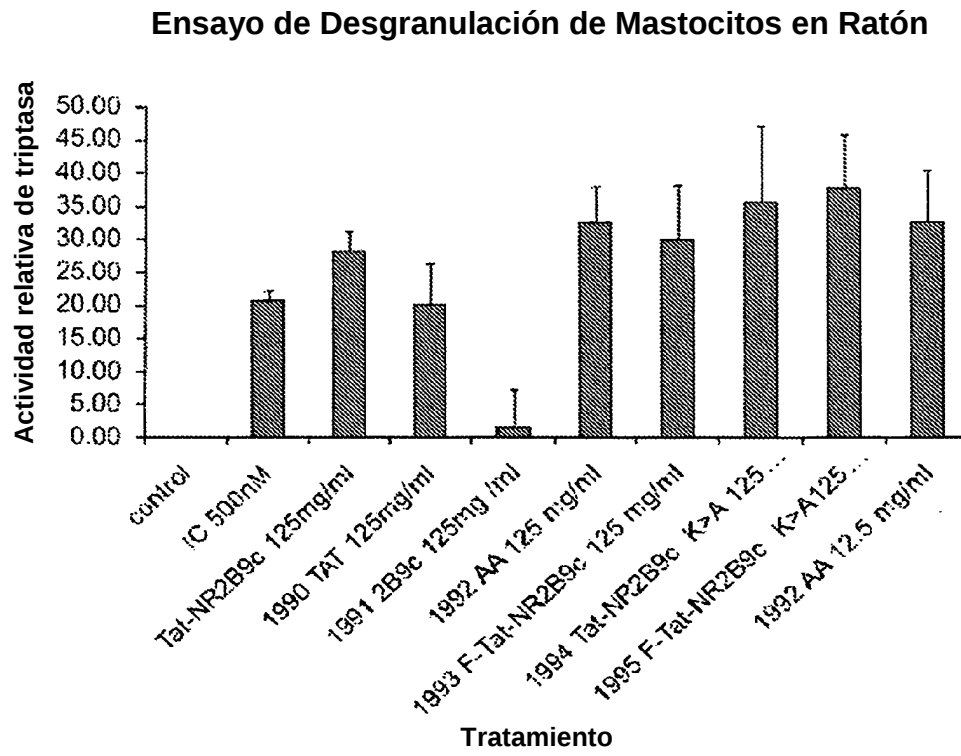


FIGURA 4

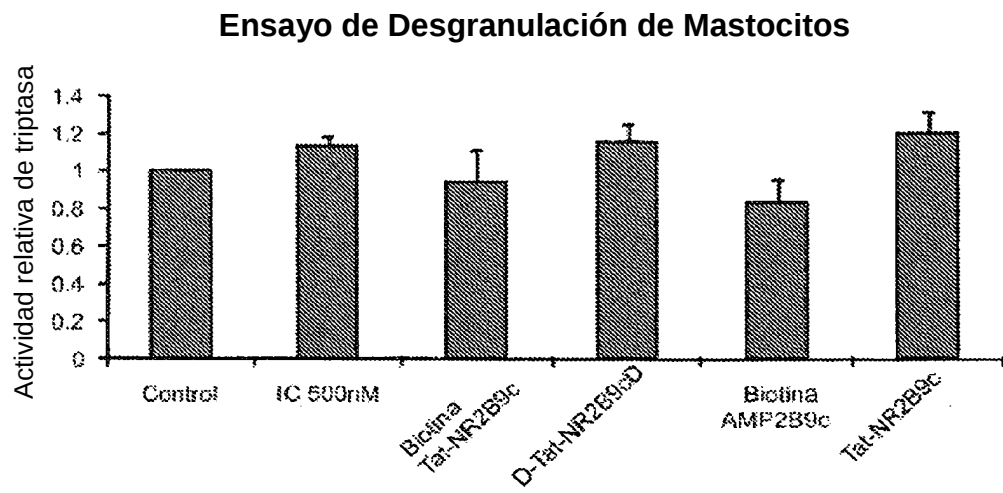


FIGURA 5

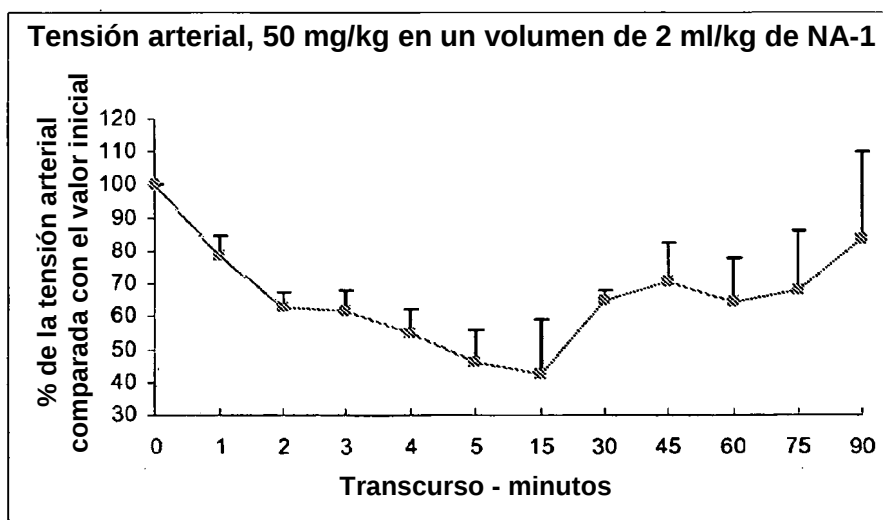


FIGURA 6

Figura 12

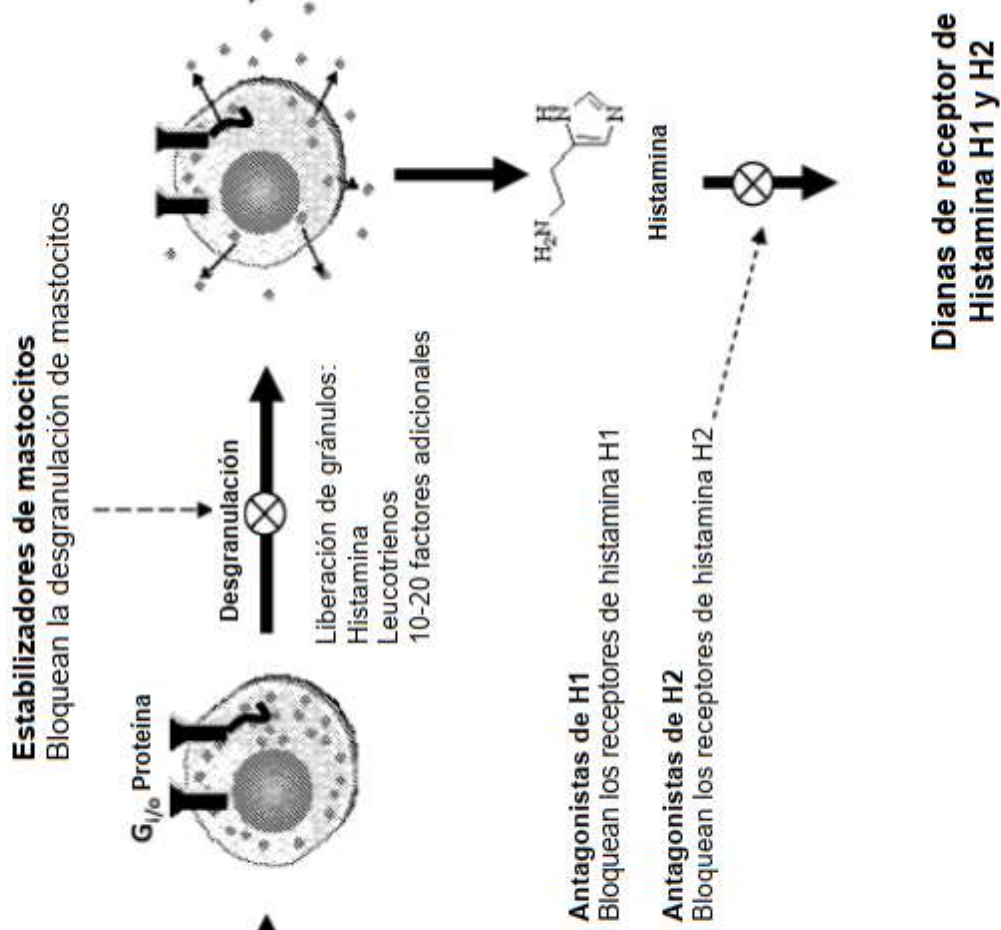
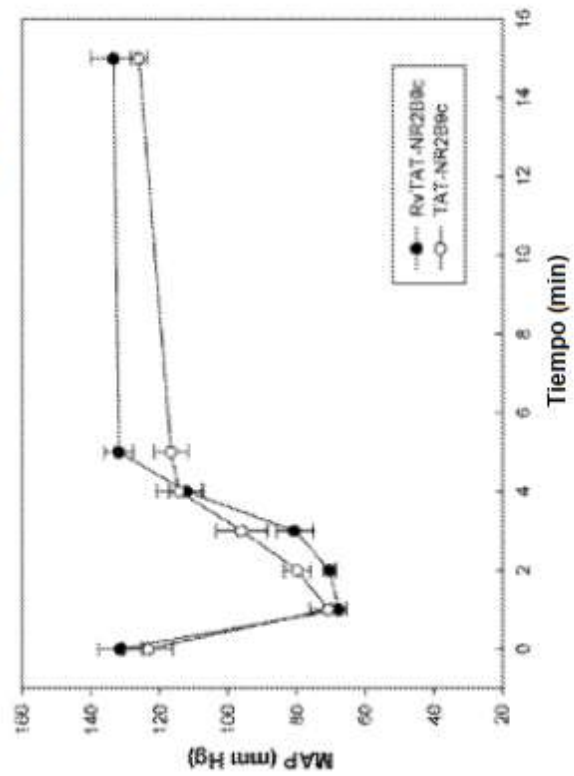
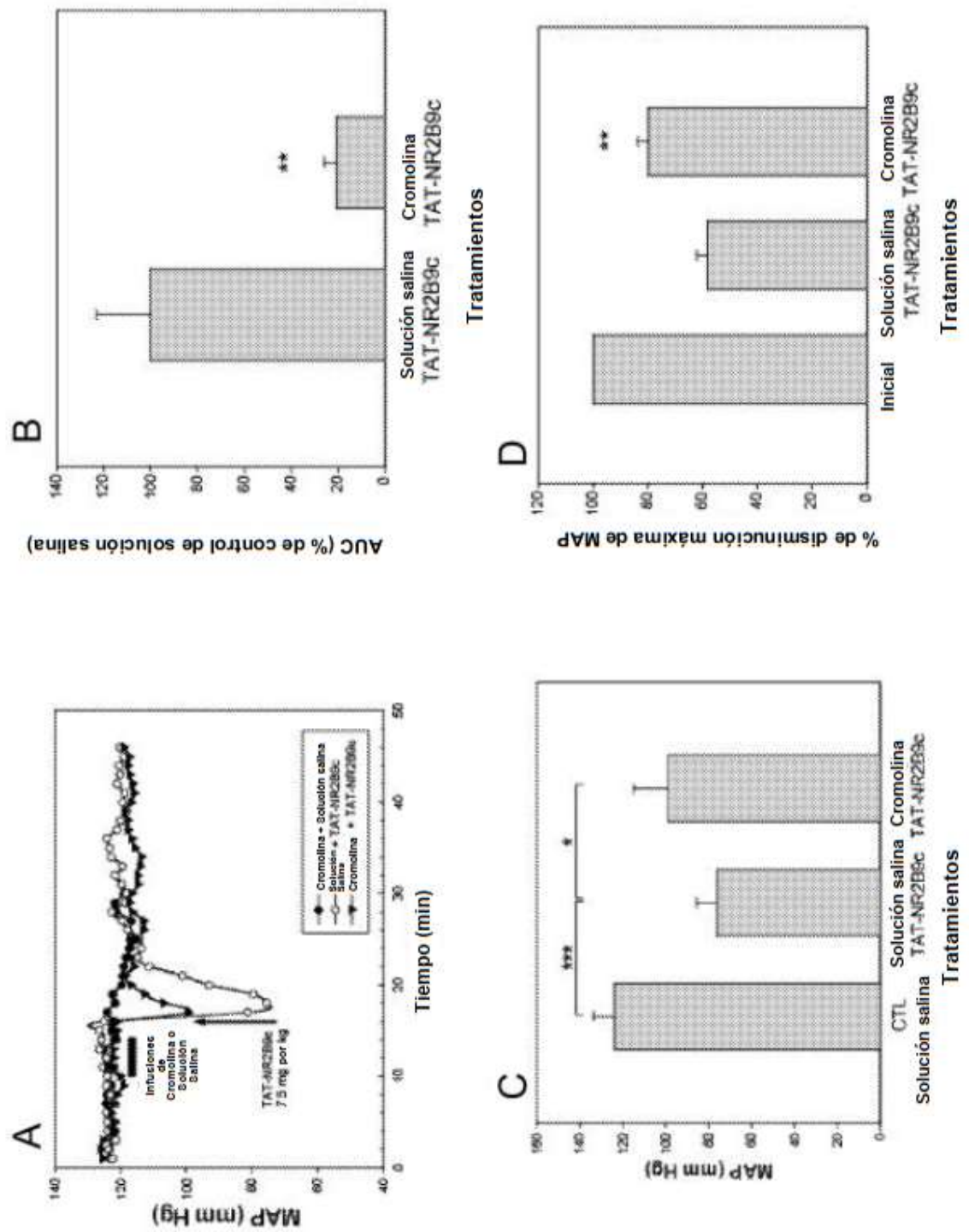


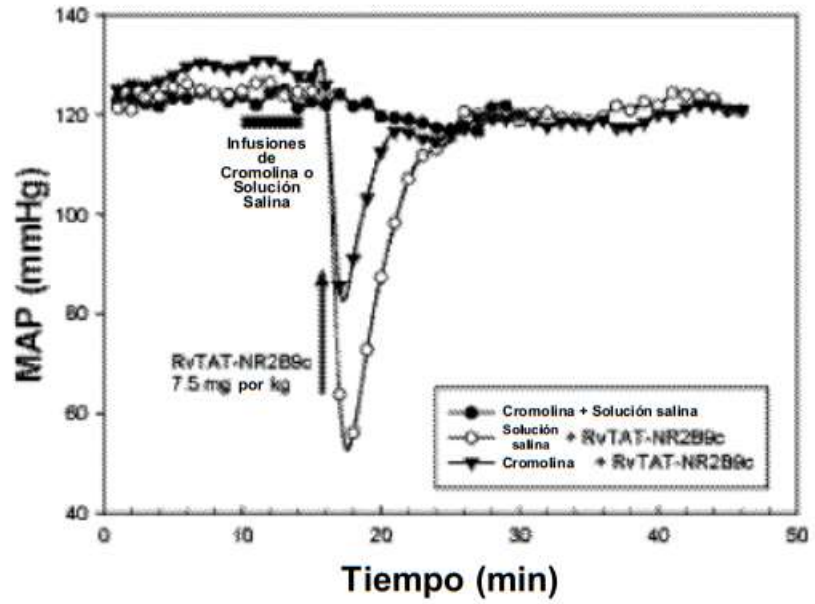
Figura 7



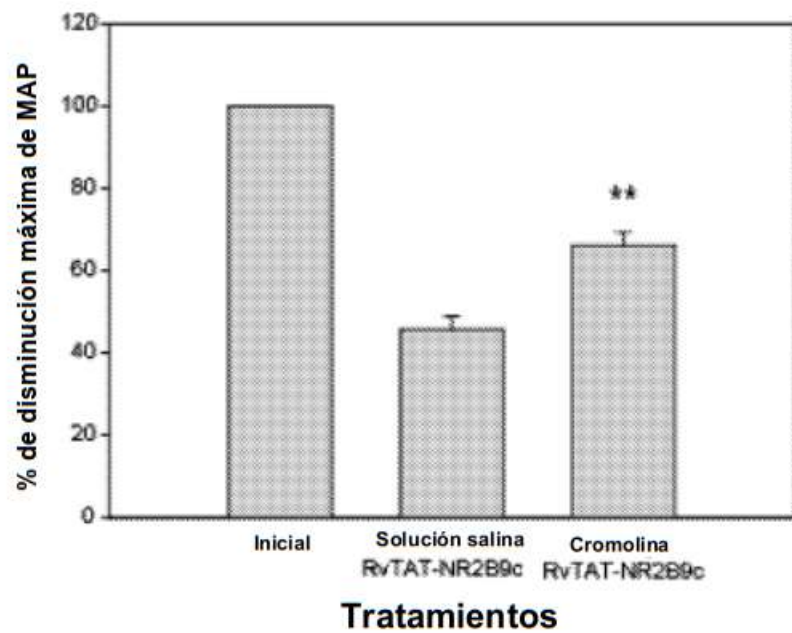
Figuras 8A-D



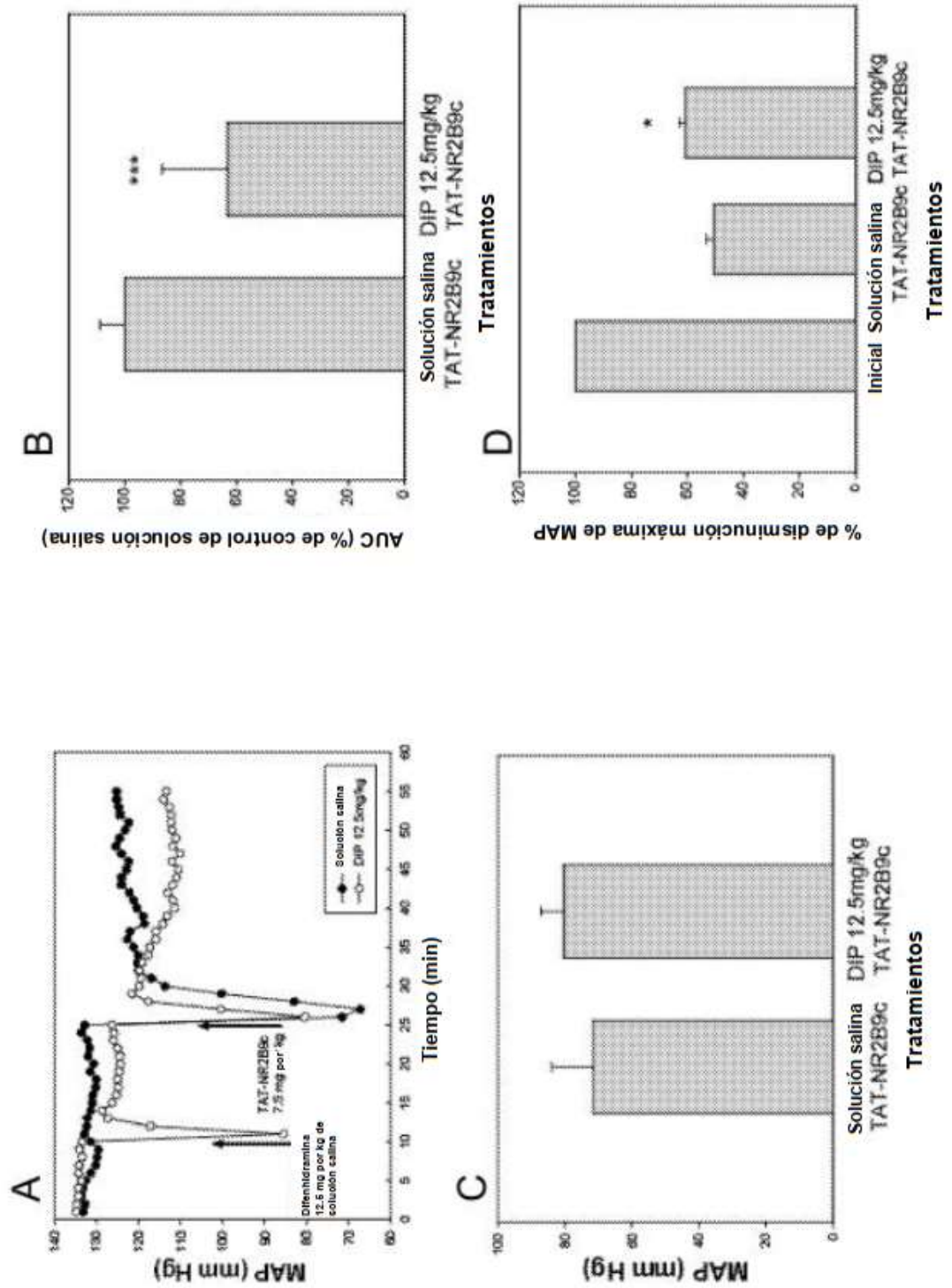
Figuras 8E, F



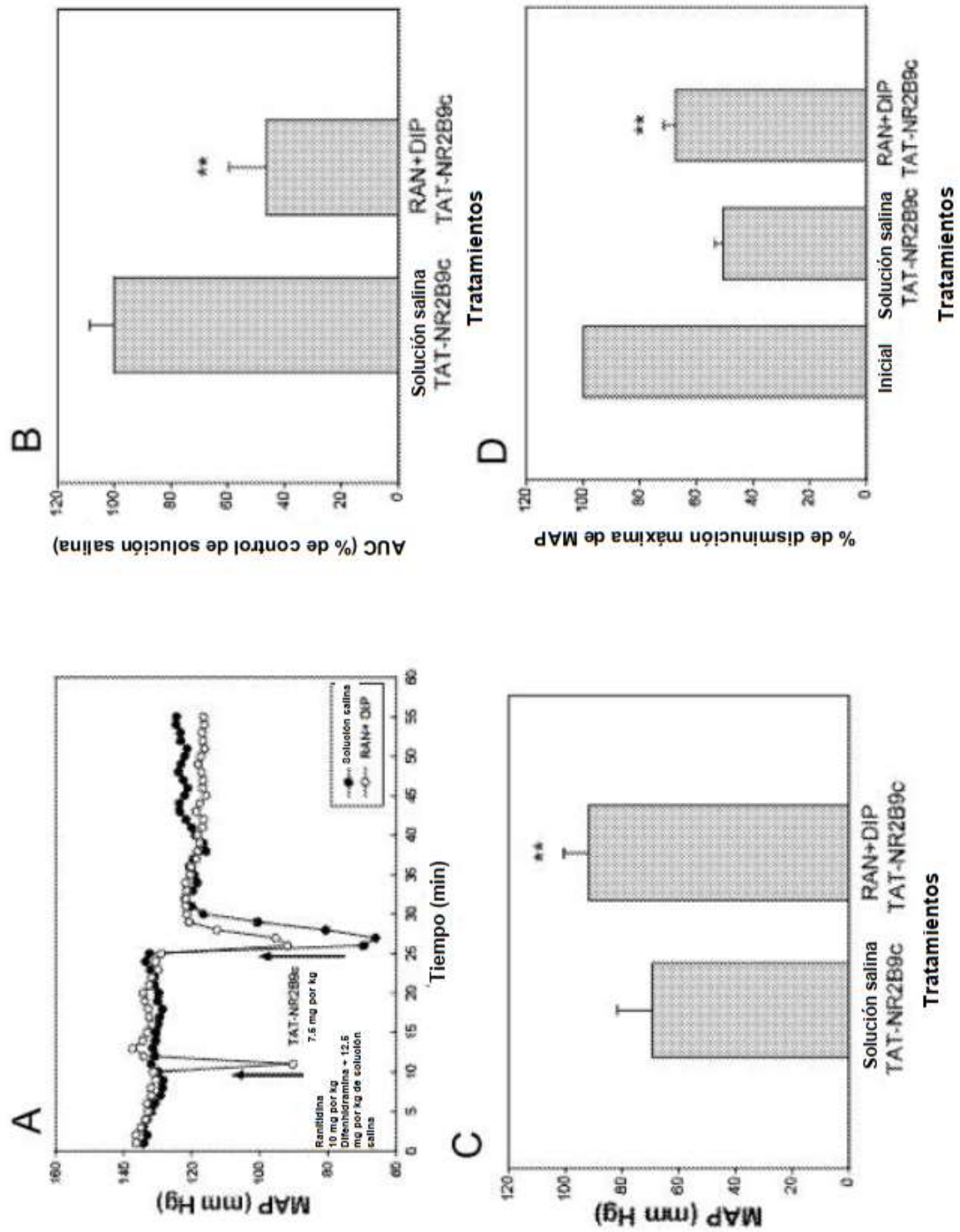
F



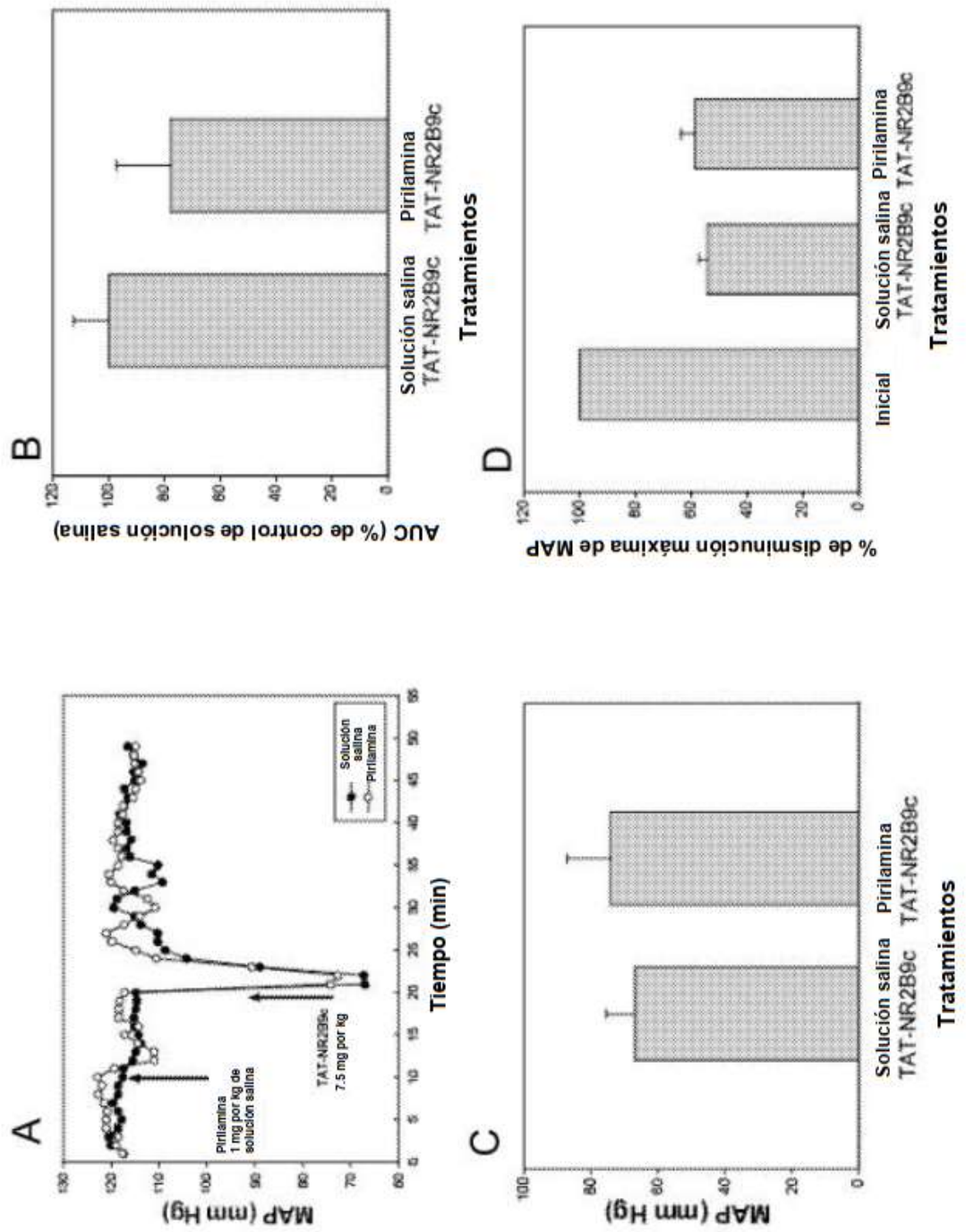
Figuras 9A-D



Figuras 10A-D

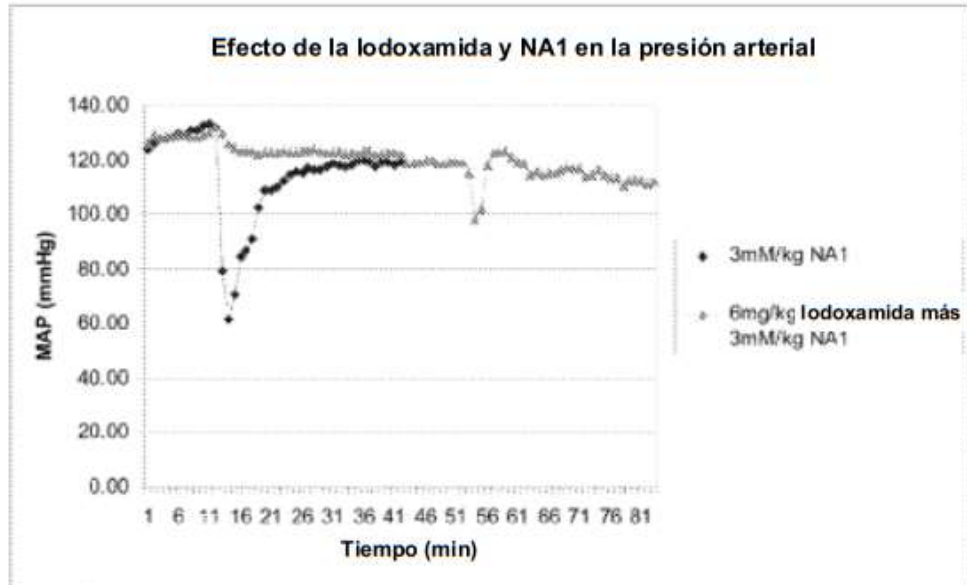


Figuras 11A-D



Figuras 13A y 13 B

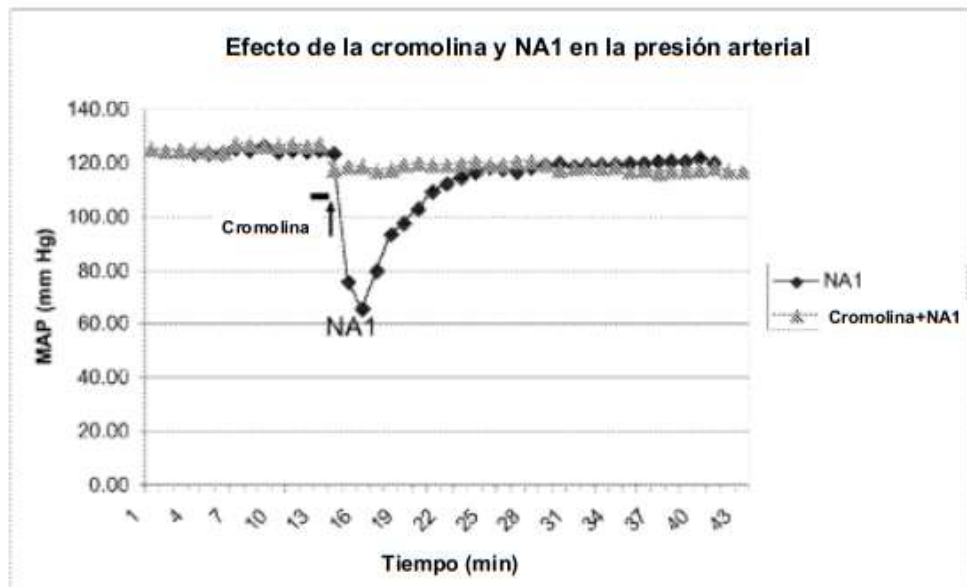
A



En 2 min de inyección

N=4

B



N=4

Figura 14

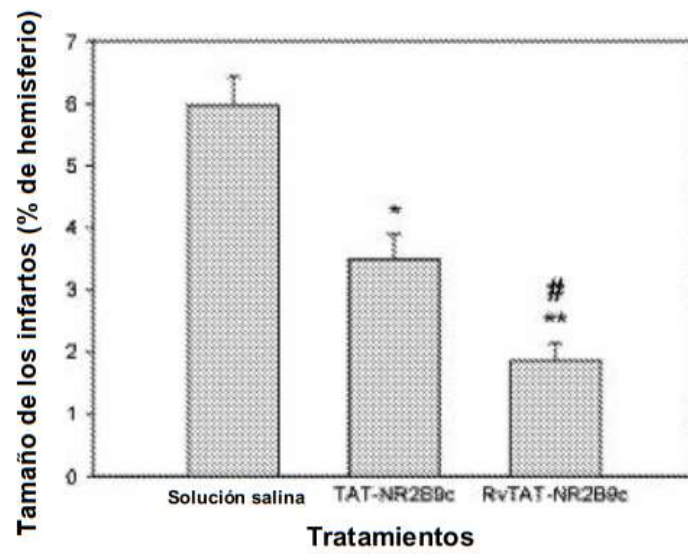


Figura 15

