

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 424**

51 Int. Cl.:

A61K 38/07 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2007 PCT/US2007/015747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2008 WO08008348**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2007 E 07796769 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 2043671**

54 Título: **Péptido y composición del mismo para usar en el tratamiento del accidente cerebrovascular con fiebre**

30 Prioridad:

11.07.2006 US 830189 P

26.07.2006 US 833572 P

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

08.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TYMIANSKI, MICHAEL

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

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

ES 2 804 424 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

Péptido y composición del mismo para usar en el tratamiento del accidente cerebrovascular con fiebre

5 Declaración sobre los derechos a las invenciones realizadas bajo investigación o desarrollo patrocinado federalmente

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el número de subvención de NIH NS048956. El gobierno puede tener ciertos derechos en esta invención.

10 Antecedentes de la invención

Se prevé que el accidente cerebrovascular afecte a más de 600 000 personas en los Estados Unidos al año. En un informe de 1999, más de 167 000 personas murieron de accidentes cerebrovasculares, con una mortalidad total de 278 000. En 1998, se pagaron 3,6 billones solo a aquellos beneficiarios de Medicare que fueron dados de alta de hospitales de corta estadía, sin incluir la atención a largo plazo para > 1 000 000 de personas que, según los informes, tienen limitaciones funcionales o dificultades con las actividades de la vida diaria que resulta de un accidente cerebrovascular (Heart and Stroke Statistical update, American Heart Association, 2002). Aún no se ha aprobado la terapéutica para reducir el daño cerebral que resulta del accidente cerebrovascular.

20 El accidente cerebrovascular se caracteriza por la muerte celular neuronal en las áreas de isquemia, hemorragia cerebral y/o trauma. La muerte celular se desencadena por la sobreexcitación de las neuronas por el glutamato, lo que aumenta el Ca^{2+} intracelular y aumenta el óxido nítrico debido a un aumento en la actividad nNOS (óxido nítrico sintasa neuronal).

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

40 Debido al papel clave de los receptores NMDA en la respuesta a la excitotoxicidad, se han considerado como objetivos para la terapéutica. Se han desarrollado compuestos que se dirigen al canal iónico (ketamina, fenciclidina, PCP, MK801, amantadina), el canal externo (magnesio), el sitio de unión de glicina en subunidades NR1, el sitio de unión a glutamato en subunidades NR2 y sitios específicos en subunidades NR2 (Zinc-NR2A; Ifenprodil, Traxoprodil-NR2B). Entre estos, los antagonistas no selectivos del receptor NMDA han sido los agentes más neuroprotectores en modelos animales de accidente cerebrovascular. Sin embargo, los ensayos clínicos con estos fármacos en accidentes cerebrovasculares y lesiones cerebrales traumáticas han fallado hasta ahora, generalmente como resultado de efectos secundarios graves como alucinaciones e incluso coma. Otras críticas de estudios anteriores sobre accidentes cerebrovasculares en animales incluyen que la eficacia de muchos neuroprotectores se determinó en modelos de isquemia leve (isquemia-reperusión en lugar de isquemia permanente) y en condiciones de privación de alimentos, que no pueden imitar adecuadamente la situación humana más grave. Además, la mayoría de los fármacos se administraron antes de la isquemia, mientras que los ensayos en humanos necesitan un paradigma de postratamiento (Gladstone y otros, 2002; STAIR Committee, 1999).

55 Otra diferencia clave entre el accidente cerebrovascular humano y la isquemia experimental es que algunas víctimas del accidente cerebrovascular también sufren de condiciones premórbidas o comórbidas agravantes o complicaciones relacionadas con el accidente cerebrovascular. Entre ellos destaca la hiperglucemia (Alvarez-Sabin., 2003), especialmente en pacientes diabéticos (Paolino, 2005), pero también en no diabéticos (Alvarez-Sabin., 2003). Sin embargo, la hiperglucemia se evita activamente en los estudios de laboratorio de accidente cerebrovascular, ya que se sabe que exacerba el infarto cerebral (Li, 1997, 1998, 2000, 2001; Farrokhnia, 2005), y los animales experimentales están en ayunas de forma rutinaria para minimizar las elevaciones de glucosa en sangre intra-isquémica (Elsersy, 2004; Horiguchi, 2003; Belayev, 2005a). La fiebre es otra complicación que afecta a algunas víctimas de accidente cerebrovascular, y es un predictor independiente de malos resultados (Azzimondi, 1995; Reith, 1996; Boysen, 2001; Ginsberg, 1998). Se sabe desde hace tiempo que la hipertermia exacerba la lesión isquémica experimental global y focal (Busto, 1987b, 1989a, 1989b; Ginsberg, 1992; Morikawa, 1992; Chen, 1993; Minamisawa, 1990a, 1990b, 1990c; Chen, 1991) y, precisamente Por esta razón, se ha evitado fuertemente en estudios de fármacos neuroprotectores.

El presente inventor ha informado que la proteína postsináptica de densidad 95 (PSD-95) acopla los NMDAR a vías que median la excitotoxicidad y el daño cerebral isquémico (Aarts y otros, Science 298, 846-850 (2002)). Este acoplamiento se interrumpió al transducir neuronas con péptidos que se unen a dominios modulares en ambos lados del complejo de interacción PSD-95/NMDAR. Este tratamiento atenuó la señalización de NMDAR aguas abajo sin bloquear la actividad de NMDAR, protegió a las neuronas corticales cultivadas de los ataques excitotóxicos y redujo el volumen de infarto cerebral en ratas sometidas a isquemia cerebral focal transitoria. El análisis se realizó en condiciones de isquemia transitoria y ayuno previo para evitar exacerbar la fiebre y la hiperglucemia.

Resumen de la invención reivindicada

La invención proporciona un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] para usar en el tratamiento, opcionalmente en donde el tratamiento es profiláctico, del efecto dañino del accidente cerebrovascular exacerbado por la fiebre en un sujeto humano con una fiebre de al menos 38 grados Celsius al iniciar el tratamiento. La invención también proporciona una composición farmacéutica para usar en el tratamiento del accidente cerebrovascular exacerbado por la fiebre en un sujeto humano que tiene fiebre de al menos 38 grados Celsius al iniciar el tratamiento, que comprende una dosis unitaria de 0,05 a 500 mg, opcionalmente 0,1 a 100 mg, por ejemplo 0,5 a 50 mg, tal como 1 a 20 mg de un péptido como se establece en las reivindicaciones. La especificación describe el uso de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende T/SXV/L o un peptidomimético del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del efecto dañino del accidente cerebrovascular u otra lesión del SNC exacerbada por fiebre o hiperglucemia.

La invención proporciona un método de detección de un compuesto que inhibe la unión de PSD-95 a NMDAR, que comprende: administrar el compuesto a un animal no humano con isquemia y también i) fiebre de al menos 38 grados Celsius y/o ii) hiperglucemia; y determinar si el compuesto reduce el volumen de infarto que resulta de la isquemia en relación con un animal control no tratado con el compuesto. La invención proporciona, además, según lo especificado por las reivindicaciones, un método de selección de un compuesto que inhibe la unión de PSD-95 a NMDAR, que comprende administrar el compuesto a un animal que tiene isquemia exacerbada por hipertermia y/o hiperglucemia; y determinar si el compuesto reduce el volumen de infarto que resulta de la isquemia en relación con un animal control no tratado con el compuesto.

La especificación describe además un método para reducir el efecto dañino del accidente cerebrovascular en un paciente con accidente cerebrovascular u otra lesión del SNC exacerbada por fiebre o hiperglucemia que comprende administrar la cantidad efectiva de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende T/S-[X]-V/L, o peptidomimético del mismo, y por lo tanto reduce el efecto dañino del accidente cerebrovascular u otra lesión.

La especificación describe además el uso de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende T/SXV/L o un peptidomimético del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar el efecto dañino del accidente cerebrovascular u otra lesión del SNC en un paciente con fiebre o hiperglucemia.

La especificación describe además el uso de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende T/SXV/L o un peptidomimético del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico del efecto dañino del accidente cerebrovascular u otra lesión del SNC en un paciente con fiebre o hiperglucemia.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Efectos de los modelos de isquemia en la temperatura central. Los animales en A-E fueron implantados con sondas telemétricas de temperatura intraperitoneales y expuestos a las condiciones indicadas. Las barras grises indican la duración de la cirugía animal. A. Procedimiento simulado (n = 4). B. Procedimiento simulado con administración de Tat-NR2B9c_(SDV) (n = 6). C. Oclusión de vasos piales (n = 5). D. MCAO permanente sin enfriamiento de la jaula. (n = 8). E. MCAO permanente con enfriamiento de la jaula mediante el uso de un sistema de retroalimentación (n = 8). CT: temperatura central. Jaula: temperatura de la jaula. Los símbolos en A-E indican las medias + SE del número indicado de animales. F. Efectos de las condiciones indicadas en la temperatura del músculo temporal, centro y cerebro en los momentos indicados después de pMCAO. Salina central: animales tratados con solución salina 1 hora después de pMCAO (n = 6). Solución Salina-Temporal: temperaturas simultáneas musculares temporales de animales tratados con solución salina. Centro-SDV: animales tratados con Tat-NR2B9c_(SDV) 1 hora después de pMCAO (n = 6). Cerebro-SDV: mediciones simultáneas de temperatura cerebral directa de animales tratados con NR2B9c_(SDV).

Figura 2. Efecto del postratamiento Tat-NR2B9c_(SDV) en el modelo de oclusión permanente del vaso pial. A. Los tres sitios de oclusión del vaso pial. B. Infarto típico que resulta en el cerebro teñido con TTC. C. Efecto del fármaco indicado y la concentración del fármaco sobre el tamaño del infarto. El número de animales por grupo se proporciona en la Tabla 1. Asterisco: significativamente diferente de los controles de solución salina y ADA (ANOVA, p<0,05). ADA: Tat-NR2B9c_(ADA). SDV: Tat-NR2B9c_(SDV). D. Infartos representativos de cada grupo en secciones coronales teñidas con TTC.

Figura 3. Los inhibidores de PSD-95 no afectan la respuesta hipertérmica después de pMCAO. A-E: temperaturas centrales antes, durante (barras grises) y después de la cirugía pMCAO en animales tratados con el inhibidor de PSD-95 indicado a la dosis indicada. N = 8 para cada grupo.

5 **Figura 4.** Secciones representativas de cerebro coronal teñidas con TTC tomadas de animales 24 horas después de someterlas a cirugía simulada (A) o pMCAO (B-F). Los animales en B-F fueron tratados con el inhibidor de PSD-95 indicado a la dosis indicada 1 hora después de pMCAO.

10 **Figura 5.** Reducción de los volúmenes de infarto pMCAO por tratamiento posterior con inhibidores de PSD-95. Ai y Aii: Efectos de los inhibidores de PSD-95 en los volúmenes de infarto hemisférico (Ai) y cortical (Aii) en el primer estudio ciego. Bi y Bii: Efectos de los inhibidores de PSD-95 en los volúmenes de infarto hemisférico (Bi) y cortical (Bii) en el segundo estudio ciego. Los animales fueron tratados con los inhibidores de PSD-95 a las dosis indicadas 1 hora después de pMCAO. Asteriscos: significativamente diferentes de los controles salinos (ANOVA seguido de múltiples comparaciones mediante el uso de la corrección de Bonferroni). Recuadro: paradigma de estudio. El número de animales por grupo se proporciona en la Tabla 2.

15 **Figura 6.** Áreas de infarto de 8 secciones del cerebro coronal de las cuales se derivaron los volúmenes de la Figura 5. Cada símbolo indica el área media \pm SE en un plano estereotáctico dado para las condiciones indicadas.

20 **Figura 7.** A. Puntajes compuestos de comportamiento neurológico a las 2 y 24 horas después de pMCAO para las condiciones indicadas. B-G: Gráficos de la actividad de la jaula animal antes y después del procedimiento de MCAO permanente en los diferentes grupos con inhibidor de PSD-95. Cero indica el tiempo de MCAO.

25 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

30 Un "polipéptido de fusión" se refiere a un polipéptido compuesto, es decir, una secuencia de aminoácidos contigua única, compuesta por dos (o más) polipéptidos heterólogos distintos que normalmente no se fusionan en una secuencia de aminoácidos única.

35 El término "dominio PDZ" se refiere a un dominio de proteína modular de aproximadamente 90 aminoácidos, caracterizado por una identidad de secuencia significativa (por ejemplo, al menos 60 %) con la proteína sináptica cerebral PSD-95, la proteína de unión de septo *Drosophila* Discs-Large (DLG), y la proteína de unión epitelial ajustada ZO1 (ZO1). Los dominios PDZ también se conocen como repeticiones de homología Discs-Large ("DHR") y repeticiones GLGF. Los dominios PDZ generalmente parecen mantener una secuencia central de consenso (Doyle, DA, 1996, Cell 85:1067-76). Ejemplos de proteínas que contienen el dominio PDZ y secuencias del dominio PDZ descritas en la Solicitud de los Estados Unidos Núm. 10/714 537.

40 El término "proteína PL" o "proteína ligando PDZ" se refiere a una proteína natural que forma un complejo molecular con un dominio PDZ, o a una proteína cuyo carboxi terminal, cuando se expresa por separado de la proteína de longitud completa (por ejemplo, como un fragmento peptídico de 3-25 residuos, por ejemplo, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 14 o 16 residuos), forma dicho complejo molecular. El complejo molecular puede observarse *in vitro* mediante el uso del "ensayo A" o el "ensayo G" descritos, por ejemplo, en la solicitud de los Estados Unidos Núm. 10/714 537, o *in vivo*.

45 El término "receptor de NMDA" o "NMDAR" se refiere a una proteína asociada a la membrana que se sabe que interactúa con NMDA. Por lo tanto, el término incluye las diversas formas de subunidades descritas en la Sección de Antecedentes. Dichos receptores pueden ser humanos o no (por ejemplo, ratón, rata, conejo, mono).

50 Un "motivo PL" se refiere a la secuencia de aminoácidos del extremo C de una proteína PL (por ejemplo, el extremo C 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 20 o 25 residuos contiguos) ("secuencia PL extremo C") o a una secuencia interna que se sabe que se une a un dominio PDZ ("secuencia PL interna").

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

60 Los términos "aislado" o "purificado" significan que la especie objeto (por ejemplo, un péptido) se ha purificado de contaminantes que están presentes en una muestra, como una muestra obtenida de fuentes naturales que contienen la especie objeto. Si una especie objeto se aísla o purifica, es la especie macromolecular predominante (por ejemplo, polipéptido) presente en una muestra (es decir, sobre una base molar, es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferentemente la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 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. Con la mayor preferencia, la especie objeto se purifica a una homogeneidad esencial (es decir, las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

Un "peptidomimético" y se refiere a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de un péptido de la invención. El peptidomimético puede contener análogos de aminoácidos completamente naturales y no sintéticos, o es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos de aminoácidos parcialmente no naturales. El peptidomimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales siempre que dichas sustituciones no alteren sustancialmente la estructura mimética y/o la actividad inhibitoria o de unión. Las composiciones miméticas de polipéptidos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son típicamente de tres grupos estructurales: a) grupos de enlace de residuos distintos de los enlaces de enlace amida natural ("enlace peptídico"); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos naturales; o c) residuos que inducen mimetismo estructural secundario, es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, por ejemplo, un giro beta, giro gamma, lámina beta, conformación de hélice alfa y similares.

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

Estadísticamente significativo se refiere a un valor p que es <0,05, preferentemente <0,01 y con mayor preferencia <0,001.

II. General

La invención proporciona, como se especifica en las reivindicaciones, péptidos útiles para reducir los efectos dañinos del accidente cerebrovascular exacerbado por la fiebre. Los subgrupos de pacientes afectados con uno o ambos de fiebre e hiperglucemia (factores exacerbantes) tienen un resultado significativamente peor en comparación con los pacientes en los que estos factores están presentes. La invención se basa en parte en los resultados descritos en los ejemplos en los que se descubrió que ciertos péptidos reducen el volumen de infarto en un modelo de rata de isquemia permanente a pesar de la hipertermia grave (≥ 39 °C) y la falta de ayuno previo. Sorprendentemente, los sujetos con accidente cerebrovascular y fiebre o hiperglucemia pueden ser tratados de manera tan efectiva como los sujetos que no sufren de tales complicaciones comórbidas. Los péptidos usados en tales métodos tienen una secuencia de aminoácidos que incluye o se basa en el motivo PL del receptor NMDAR 2B (es decir, péptidos PL). Aunque no se requiere una comprensión del mecanismo para la práctica de la invención, se cree que tales péptidos actúan al menos en parte inhibiendo la interacción entre NMDAR con la proteína 95 de densidad postsináptica (es decir, inhibidores de PSD-95). Los péptidos también pueden inhibir las interacciones entre PSD-95 y nNOS. A diferencia de los antagonistas de glutamato que han fallado previamente en ensayos clínicos, dichos péptidos pueden alterar la señalización neurotóxica durante la isquemia sin incurrir en las consecuencias negativas de la pérdida de la función NMDAR.

III. Péptidos y peptidomiméticos

Los péptidos útiles en la invención según lo especificado por las reivindicaciones inhiben la interacción entre el dominio 2 de la proteína postsináptica de densidad 95 (PSD-95 d2) que contiene un dominio PDZ (Stathakism, Genomics 44 (1):71-82 (1997)) y el extremo C de la subunidad NR2B del receptor neuronal de N-metil-D-aspartato (NMDAR) que contiene un motivo PL (Mandich y otros, Genomics 22, 216-8 (1994)). Como se especifica en las reivindicaciones, dichos péptidos incluyen o se basan en un motivo PL del extremo C de esta subunidad y tienen una secuencia de aminoácidos que comprende [S/T]-X-[V/L] (SEQ ID Núm.: 1). Esta secuencia aparece preferentemente en el extremo C de los péptidos de la invención. Los péptidos preferidos tienen una secuencia de aminoácidos como se especifica en las reivindicaciones que comprenden [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID Núm.: 2) en su extremo C. Los péptidos ilustrativos comprenden: ESDV (SEQ ID Núm.: 3), ESEV (SEQ ID Núm.: 4), ETDV (SEQ ID Núm.: 5), ETEV (SEQ ID Núm.: 6), DTDV (SEQ ID Núm.: 7) y DTEV (SEQ ID Núm.: 8). Dos péptidos particularmente preferidos son KLSSIESDV (SEQ ID Núm.: 9) y KLSSIETDV (SEQ ID Núm.: 10).

Cualquiera de los péptidos de la invención puede unirse, preferentemente en su extremo N, a un péptido de internalización que facilite la translocación a través de la membrana plasmática de una célula. Por ejemplo, puede usarse el péptido de internalización de VIH TAT YGRKKRRQRRR. También puede usarse un péptido de internalización derivado de Antennapedia (ver Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997)). Dos péptidos preferidos que incluyen el péptido de internalización Tat del VIH son **YGRKKRR-QRRRKLSSIETDV** (SEC ID Núm.: 11, Tat-NR2B9c (TDV)), y **YGRKKRRORRRKLSSIESDV** (SEC ID Núm.: 12, Tat-NR2B9c (SDV)).

Los péptidos de la invención sin un péptido de internalización generalmente tienen 3-25 aminoácidos, se prefieren longitudes de péptidos (también sin un péptido de internalización) de 5-10 aminoácidos, y particularmente 9 aminoácidos.

La actividad farmacológica apropiada de péptidos o peptidomiméticos puede confirmarse, si se desea, mediante el uso del modelo animal descrito en los Ejemplos. Opcionalmente, los péptidos o peptidomiméticos también pueden

seleccionarse para determinar su capacidad para inhibir las interacciones entre PSD-95 y NDMAR 2B mediante el uso de ensayos descritos, por ejemplo, en el documento de los Estados Unidos 20050059597.

5 Los péptidos útiles tienen típicamente valores de IC50 de menos de 50 μM , 25 μM , 10 μM , 0,1 μM o 0,01 μM en dicho ensayo. Los péptidos preferidos tienen típicamente un valor de IC50 de entre 0,001-1 μM , y con mayor preferencia de 0,05-0,5 o 0,05 a 0,1 μM

10 Los péptidos como los que se acaban de describir pueden derivatizarse opcionalmente (por ejemplo, acetilados, fosforilados y/o glicosilados) para mejorar la afinidad de unión del inhibidor, mejorar la capacidad del inhibidor para ser transportado a través de una membrana celular o mejorar la estabilidad. Como un ejemplo específico, para los inhibidores en los que el tercer residuo desde el extremo C es S o T, este residuo puede ser fosforilado antes del uso del péptido.

15 Los péptidos de la invención, opcionalmente fusionados a dominios de internalización, pueden sintetizarse por síntesis en fase sólida o métodos recombinantes. Los peptidomiméticos pueden sintetizarse mediante el uso de una variedad de procedimientos y metodologías descritos en la bibliografía científica y de patentes, *por ejemplo*, Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman y otros (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.

20 IV. Accidente cerebrovascular y condiciones relacionadas

Un accidente cerebrovascular es una afección que resulta de un flujo sanguíneo deficiente en el SNC, independientemente de la causa. Las posibles causas incluyen embolia, hemorragia y trombosis. Algunas células neuronales mueren inmediatamente como resultado de la alteración del flujo sanguíneo. Estas células liberan sus moléculas componentes, que incluye el glutamato, que a su vez activa los receptores de NMDA, que elevan los niveles de calcio intracelular, y los niveles de enzimas intracelulares que dan lugar consecuentemente a una muerte de las células neuronales (la cascada de excitotoxicidad). La muerte del tejido del SNC se conoce como infarto. El volumen de infarto (es decir, el volumen de células neuronales muertas que resulta de un accidente cerebrovascular en el cerebro) puede usarse como un indicador de la extensión del daño patológico que resulta de un accidente cerebrovascular. El efecto sintomático depende tanto del volumen de un infarto como del lugar donde se encuentra en el cerebro. El índice de discapacidad puede usarse como una medida del daño sintomático, tal como la Escala de Rankin de Resultados de Accidente Cerebrovascular (Rankin, Scott Med J; 2:200-15 (1957)) y el Índice de Barthel. La escala de Rankin se basa en evaluar directamente las condiciones globales de un paciente de la siguiente manera.

- 35
- 0 Sin síntomas en absoluto
 - 1 Sin discapacidad significativa a pesar de los síntomas; capaz de llevar a cabo todas las tareas y actividades habituales.
 - 2 Leve discapacidad; incapaz de llevar a cabo todas las actividades anteriores pero capaz de ocuparse de sus propios asuntos sin ayuda.
 - 40 3 Discapacidad moderada que requiere ayuda, pero que puede caminar sin ayuda
 - 4 Discapacidad moderada a grave; incapaz de caminar sin ayuda y no puede atender sus propias necesidades corporales sin asistencia.
 - 45 5 Discapacidad grave; postrado en la cama, incontinente, y que requiere atención y cuidados de enfermería constantes.

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

50 Un accidente cerebrovascular isquémico se refiere más específicamente a un tipo de accidente cerebrovascular provocado por un bloqueo del flujo sanguíneo al cerebro. La afección subyacente para este tipo de bloqueo lo más comúnmente es el desarrollo de depósitos de grasa que revisten las paredes de los vasos. Esta afección se llama aterosclerosis. Estos depósitos grasos pueden causar dos tipos de obstrucción. La trombosis cerebral se refiere a un trombo (coágulo de sangre) que se desarrolla en la parte obstruida del vaso. "Embolia cerebral" se refiere generalmente a un coágulo de sangre que se forma en otra ubicación en el sistema circulatorio, habitualmente en el corazón y las arterias grandes del tórax superior y cuello. Una porción del coágulo de sangre se suelta, entra en el torrente sanguíneo y viaja a través de los vasos sanguíneos del cerebro hasta que llega a vasos demasiado pequeños que no lo dejan pasar. Una segunda causa importante de las embolias es un latido irregular, conocido como fibrilación arterial. Crea afecciones en las que los coágulos pueden formarse en el corazón, desplazarse y viajar al cerebro. Las causas potenciales adicionales del accidente cerebrovascular isquémico son hemorragia, trombosis, disección de una arteria o vena, un paro cardíaco, choque de cualquier causa, incluida hemorragia y causas iatrogénicas, tales como lesión quirúrgica directa en vasos sanguíneos del cerebro o vasos que conducen al cerebro o cirugía cardíaca. El accidente cerebrovascular isquémico representa aproximadamente el 83 por ciento de todos los casos de accidente cerebrovascular.

Los ataques isquémicos transitorios (TIA) son accidentes cerebrovasculares menores o de advertencia. En un TIA, existen condiciones indicativas de un accidente cerebrovascular isquémico y se desarrollan los signos típicos de advertencia del accidente cerebrovascular. Sin embargo, la obstrucción (coágulo de sangre) se produce durante un corto tiempo y tiende a resolverse a través de mecanismos normales.

El accidente cerebrovascular hemorrágico representa aproximadamente el 17 por ciento de los casos de accidentes cerebrovasculares. Es el resultado de un vaso debilitado que se rompe y sangra en el cerebro circundante. La sangre se acumula y comprime el tejido cerebral circundante. Los dos tipos generales de accidentes cerebrovasculares hemorrágicos son la hemorragia intracerebral y la hemorragia subaracnoidea. El accidente cerebrovascular hemorrágico es el resultado de la ruptura de los vasos sanguíneos debilitados. Las posibles causas de ruptura de un vaso sanguíneo debilitado incluyen una hemorragia hipertensiva, en la que la presión sanguínea alta causa la ruptura de un vaso sanguíneo, u otra causa subyacente de vasos sanguíneos debilitados, tal como una malformación vascular cerebral dañada, incluido un aneurisma cerebral, una malformación arteriovenosa (AVM) o malformación cavernosa. Los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos también pueden surgir de una transformación hemorrágica de un accidente cerebrovascular isquémico que debilita los vasos sanguíneos en el infarto, o de una hemorragia de tumores primarios o metastásicos en el SNC que contienen vasos sanguíneos anormalmente débiles. El accidente cerebrovascular hemorrágico también puede surgir de causas iatrogénicas, tales como la lesión quirúrgica directa en un vaso sanguíneo cerebral. Un aneurisma es una dilatación de una región debilitada de un vaso sanguíneo. Si no se trata, el aneurisma continúa debilitándose hasta que se rompe y sangra en el cerebro. Una malformación arteriovenosa (AVM) es una agrupación de vasos sanguíneos anormalmente formados. Una malformación cavernosa es una anomalía venosa que puede causar una hemorragia por estructuras venosas debilitadas. Cualquiera de estos vasos puede romperse, lo que también causa sangrado en el cerebro. El accidente cerebrovascular hemorrágico también puede resultar de un trauma físico. El accidente cerebrovascular hemorrágico en una parte del cerebro puede dar lugar a un accidente cerebrovascular isquémico en otra, por la escasez de sangre perdida en el accidente cerebrovascular hemorrágico.

Varias otras afecciones neurológicas también pueden provocar la muerte neurológica a través de la excitotoxicidad mediada por NDMAR. Estas condiciones incluyen epilepsia, hipoxia, lesión traumática del SNC no asociada con accidente cerebrovascular, como lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson V. Condiciones que exacerban el accidente cerebrovascular

Un subconjunto de pacientes con accidente cerebrovascular tiene fiebre exacerbada y/o hiperglucemia, que son condiciones comórbidas, que en ausencia de tratamiento con los métodos actuales predisponen a los pacientes a un peor resultado que el caso de todos los pacientes con accidente cerebrovascular, particularmente los pacientes con accidente cerebrovascular que carecen de tal comorbilidad exacerbada.

Fiebre (también conocida como pirexia) significa un aumento en la temperatura interna del cuerpo a un nivel de al menos 0,5 °C por encima de lo normal (37 °C, 98,6 °F). En algunos pacientes la fiebre es de al menos 38, 39 o 40 °C. La fiebre está relacionada con la hipertermia, que es una afección aguda que resulta de un aumento de la temperatura corporal sobre el punto de ajuste termorregulador normal del cuerpo (debido a la producción excesiva de calor o termorregulación insuficiente, o un punto de ajuste termorregulador alterado o cualquier combinación de los mismos). La fiebre exagera el accidente cerebrovascular al promover la formación de infarto.

La fiebre, como una condición comórbida exacerbada con el accidente cerebrovascular, puede ser el resultado de varias circunstancias. Algunos pacientes tienen una infección antes de que ocurra el accidente cerebrovascular, lo que produce fiebre en el momento del accidente cerebrovascular, en el momento del tratamiento, (generalmente 1-6 horas después del accidente cerebrovascular) y persiste al menos 24 horas después del tratamiento. Otros pacientes no tienen fiebre al inicio del accidente cerebrovascular, pero desarrollan fiebre porque el accidente cerebrovascular afecta un área del cerebro que controla la temperatura del paciente. Tal fiebre puede desarrollarse entre el inicio del accidente cerebrovascular y el inicio del tratamiento, y puede persistir durante al menos 24 horas después del tratamiento. Tal fiebre también puede desarrollarse después de que el tratamiento ha comenzado y persistir durante un período de al menos 24 horas después del inicio del tratamiento. Este tipo de fiebre espontánea se ha asociado con grandes accidentes cerebrovasculares en humanos (Azzimondi y otros, 1995; Reith y otros, 1996; Ginsberg y Busto, 1998; Boysen y Christensen, 2001). Otros pacientes tienen fiebre como resultado de estar expuestos a altas temperaturas en el momento del inicio del accidente cerebrovascular. Dicha fiebre generalmente persiste a través del inicio del tratamiento del paciente, pero puede disminuir posteriormente.

La hiperglucemia o nivel alto de azúcar en la sangre es una afección en la que circula una cantidad excesiva de glucosa en el plasma sanguíneo. Los niveles de glucosa en sangre pueden medirse en miligramos por decilitro (mg/dL) o en milimoles por litro (mmol/L). En general, los niveles normales de glucosa en sangre en ayunas varían de aproximadamente 80 a 120 mg/dL o de 4 a 7 mmol/L. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas superiores a aproximadamente 126 mg/dL o 7 mmol/L son hiperglucémicos Aunque el mecanismo por el cual la hiperglucemia exagera el accidente cerebrovascular es controvertido, un mecanismo es la promoción de la acidosis tisular (pH bajo) y/o la activación de muchas respuestas intracelulares tales como las actividades de las proteínas quinasas y la fosforilación de proteínas, el metabolismo intracelular del calcio y el metabolismo hormonal, incluidos los glucocorticoides.]

La hiperglucemia como una comorbilidad exacerbada con accidente cerebrovascular también puede ser el resultado de varias circunstancias. Una circunstancia es la presencia simultánea de diabetes, tanto tipo I como II. Aunque los niveles glucémicos pueden controlarse en cierta medida mediante la administración de insulina, los pacientes con diabetes son particularmente vulnerables a los cambios en los niveles glucémicos. La hiperglucemia también puede ser el resultado de una comida abundante, particularmente una rica en carbohidratos simples, antes del inicio de un derrame cerebral.

VI. Métodos de tratamiento

Los péptidos o peptidomiméticos descritos anteriormente se usan para tratar pacientes con accidente cerebrovascular exacerbado por fiebre y/o hiperglucemia, como se describió anteriormente. El tratamiento generalmente se inicia lo antes posible después del inicio del accidente cerebrovascular. Ocasionalmente, el tratamiento puede iniciarse en o antes del inicio del accidente cerebrovascular en pacientes que se sabe que tienen un alto riesgo. Los factores de riesgo incluyen hipertensión, diabetes, antecedentes familiares, tabaquismo, accidente cerebrovascular previo y someterse a cirugía. Por lo general, el tratamiento se administra primero dentro de una a seis horas después del inicio del accidente cerebrovascular. Opcionalmente, se mide la temperatura del paciente y/o el nivel de glucemia en sangre del paciente antes de comenzar el tratamiento para determinar la presencia o ausencia de fiebre y/o hiperglucemia. También puede determinarse la presencia de diabetes u otra condición metabólica que elimine al sujeto a hiperglucemia. Opcionalmente, la temperatura y el nivel de glucemia en sangre del paciente se controlan a varios intervalos o al menos diariamente después de recibir el tratamiento. A menudo, una dosis única de péptido o peptidomimético de la invención es suficiente. Sin embargo, también pueden administrarse dosis múltiples a intervalos de 6--24 horas.

La respuesta del paciente al tratamiento puede controlarse al determinar el volumen del infarto antes y en varios momentos después del tratamiento. La isquemia temprana puede detectarse mediante imágenes de difusión por resonancia magnética. Las combinaciones de protocolos de MRI, que incluye las imágenes de perfusión, pueden usarse para determinar el tejido en riesgo y predecir el volumen del infarto. Los métodos logran preferentemente una reducción en el volumen de infarto de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50 % en relación con el volumen medio de infarto en una población de pacientes comparables que no reciben tratamiento por los métodos de la invención. La respuesta del paciente también puede medirse a partir de un índice de discapacidad determinado un día a una semana después de iniciar el tratamiento. El paciente preferentemente muestra una mejora (es decir, menos discapacidad) en el índice de discapacidad de al menos 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50 % en relación con el índice de discapacidad promedio en una población de pacientes comparables que no reciben tratamiento por los métodos de la invención. El paciente preferentemente puntúa un cero o uno en el índice de accidente cerebrovascular de Rankin o más de 75 en el índice de Barthel.

VII. Composiciones farmacéuticas, dosis y vías de administración

Los péptidos de la invención pueden administrarse en forma de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se fabrican en condiciones de GMP. Las composiciones farmacéuticas pueden, según lo especificado por ciertas reivindicaciones, proporcionarse en forma de dosificación unitaria (es decir, la dosificación para una única administración) que contiene cualquiera de las dosificaciones indicadas anteriormente. Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. En particular, los péptidos liofilizados de la invención pueden usarse en las formulaciones y composiciones descritas más abajo.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional mediante el uso de uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de péptidos o peptidomiméticos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

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 preferentemente estériles y sustancialmente isotónicas. Para la inyección, los péptidos o peptidomiméticos pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles como la solución de Hanks, la solución de Ringer o la solución salina fisiológica o el tampón de acetato (para reducir la incomodidad en el sitio de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Alternativamente, los péptidos o peptidomiméticos pueden estar en forma de polvo para constituirlos con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Para la administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Esta ruta de administración puede usarse para administrar los compuestos a la cavidad nasal o para la administración

sublingual.

Para la administración oral, los compuestos pueden formularse combinando los péptidos o peptidomiméticos con portadores farmacéuticamente aceptables como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral de un paciente a tratar. Para formulaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, 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, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes de unión. Si se desea, pueden agregarse agentes desintegrantes, como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, como el alginato de sodio. Si se desea, las formas de dosificación sólidas pueden recubrirse con azúcar o con recubrimiento entérico mediante el uso de técnicas estándar. Para preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes. Además, pueden añadirse agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también pueden formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de suministro farmacéutico. Los liposomas y las emulsiones pueden usarse para administrar péptidos y peptidomiméticos. También pueden emplearse ciertos solventes orgánicos como el dimetilsulfóxido, aunque generalmente a costa de una mayor toxicidad. Además, los compuestos pueden administrarse mediante el uso de un sistema de liberación sostenida, como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico.

Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los péptidos o peptidomiméticos durante algunas semanas hasta más de 100 días. En función de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Como los péptidos o peptidomiméticos de la invención pueden contener cadenas laterales o terminales cargadas, pueden incluirse en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como ácidos o bases libres o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son aquellas sales que retienen sustancialmente la actividad biológica de las bases libres y que se preparan por reacción con ácidos inorgánicos. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en solventes acuosos y otros disolventes próticos que las formas de base libre correspondientes.

Los péptidos de la invención se usan en una cantidad efectiva para lograr el propósito pretendido (por ejemplo, reducción del efecto de daño del accidente cerebrovascular dañino y condiciones relacionadas). Una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de péptido suficiente para reducir significativamente el daño que resulta del accidente cerebrovascular en una población de pacientes (o modelos animales) tratados con los péptidos de la invención en relación con el daño en una población control de pacientes con accidente cerebrovascular (o modelos animales) no tratados con los péptidos de la invención. La cantidad también se considera terapéuticamente efectiva si un paciente tratado individualmente logra un resultado más favorable que el resultado medio (determinado por el volumen de infarto o el índice de discapacidad) en una población control de pacientes comparables no tratados por los métodos de la invención. La cantidad también se considera terapéuticamente efectiva si un paciente tratado individualmente muestra una discapacidad de dos o menos en la escala de Rankin y 75 o más en la escala de Barthel. Una dosis también se considera efectiva terapéuticamente si una población de pacientes tratados muestra una distribución de puntajes significativamente mejorada (es decir, menos discapacidad) en una escala de discapacidad que una población no tratada comparable, ver Lees y otros 1., N Engl J Med 2006; 354:588-600 un régimen terapéuticamente efectivo significa una combinación de una dosis terapéuticamente efectiva y una frecuencia de administración necesaria para lograr el propósito previsto como se describió anteriormente. Por lo general, una sola administración es suficiente.

Los intervalos de dosificación preferidos incluyen 0,001 a 20 μmol de péptido o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente, opcionalmente 0,03 a 3 μmol de péptido o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente a μmol de péptido o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente dentro de las 6 horas posteriores al accidente cerebrovascular. En algunos métodos, se administran 0,1-20 μmol de péptido o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente en 6 horas. En algunos métodos, se administran 0,1-10 μmol de péptido o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente en 6 horas, con mayor preferencia alrededor de 0,3 μmol de péptido o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente en 6 horas. En otros casos, el intervalo de dosificación es de 0,005 a 0,5 μmol de péptido o peptidomimético por kg de peso corporal del paciente. La dosis por kg de peso corporal

5 puede convertirse de ratas a humanos al dividir por 6,2 para compensar las diferentes relaciones de superficie a masa. Las dosis pueden convertirse de unidades de moles a gramos multiplicando por el peso molar de un péptido. Las dosis adecuadas de péptidos o peptidomiméticos para usar en humanos pueden incluir 0,001 a 5 mg/kg de peso corporal del paciente, o con mayor preferencia 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 en 0,075-375 mg, 0,375 a 75 mg o 3,75 mg a 75 mg o 6,7 a 67 mg. Redondeado para abarcar variaciones en, por ejemplo, el peso del paciente, la dosis generalmente está dentro de 0,05 a 500 mg, preferentemente 0,1 a 100 mg, 0,5 a 50 mg, o 1-20 mg.

10 La cantidad de péptido o peptidomimético administrado depende del sujeto a tratar, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, la forma de administración y el juicio del médico que prescribe. La terapia puede repetirse intermitentemente mientras los síntomas son detectables o incluso cuando no son detectables. La terapia puede proporcionarse sola o en combinación con otros fármacos.

15 La dosis terapéuticamente efectiva de los presentes péptidos o peptidomiméticos puede proporcionar un beneficio terapéutico sin causar una toxicidad sustancial. La toxicidad de los péptidos o peptidomiméticos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, *por ejemplo*, al determinar la LD₅₀ (la dosis letal al 50 % de la población) o la LD₁₀₀ (la dosis letal al 100 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico es el índice terapéutico. Se prefieren péptidos o peptidomiméticos que exhiben altos índices terapéuticos (ver, por ejemplo, Fingl y otros, 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch.1, p.1).

VIII. Métodos de selección

25 La invención proporciona además métodos, como se especifica en las reivindicaciones, de seleccionar péptidos, peptidomiméticos y otros compuestos para la actividad útil en la reducción de los efectos dañinos del accidente cerebrovascular. Los métodos son para seleccionar compuestos que inhiben las interacciones entre PSD-95 y NMDAR 2B. Los compuestos se administran a un modelo animal de accidente cerebrovascular, en el que el animal tiene fiebre y/o hiperglucemia en el momento de administrar el compuesto. La fiebre puede ser inducida por el evento isquémico. Por ejemplo, las ratas sometidas a la isquemia focal permanente descrita en los Ejemplos desarrollan fiebre espontáneamente probablemente debido a que la isquemia afecta un área del cerebro que afecta la regulación de la temperatura que controla el cerebro [Los animales experimentales también pueden provocar fiebre por la introducción de sustancias pirogénicas tales como productos bacterianos (endotoxinas) que provocan fiebre, o al aumentar la temperatura ambiente mediante el uso de lámparas calefactoras, mantas calefactoras u otros dispositivos de calentamiento, hasta un grado que excede la capacidad del animal para termorregular a través de los mecanismos fisiológicos habituales, como la sudoración o vasodilatación. Los animales pueden estar sometidos a hiperglucemia simplemente alimentándolos dentro de las 6 o 12 horas posteriores al inicio de la isquemia. Después de administrar los compuestos a los animales, se determina el volumen de infarto y/o el índice de discapacidad. Los volúmenes de infarto generalmente se determinan 24 horas después del tratamiento, pero pueden determinarse en un momento posterior, como 3, 7, 14 o 60 días. El índice de discapacidad puede controlarse con el tiempo, por ejemplo, a las 2 horas después del tratamiento, 24 horas después del tratamiento, una semana y un mes después del tratamiento. Los compuestos que muestran una reducción estadísticamente significativa en el volumen de infarto y/o el índice de discapacidad en relación con los animales de control no tratados con los compuestos se identifican por tener actividad útil para practicar los métodos de la invención.

45 Los compuestos adecuados para la detección en los métodos incluyen péptidos, peptidomiméticos y moléculas pequeñas (es decir, menos de 500 Da) que se sabe que inhiben las interacciones de PSD-95 y NMDAR 2B. También pueden seleccionarse otros péptidos, peptidomiméticos y moléculas pequeñas que se sabe que inhiben las interacciones entre otros pares de proteínas de dominio NMDAR y PDZ que se muestran en la Tabla A.

TABLA A: RECEPTORES NMDA CON SECUENCIAS PL

Nombre	GI#	Secuencia C terminal de 20mer	Secuencia C terminal de 4mer	PL?	ID de PL interno
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID Núm.: 13)	STVV (SEQ ID Núm.:14)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID Núm.: 13)	STVV (SEQ ID Núm.:14)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID Núm.: 13)	STVV (SEQ ID Núm.:14)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID Núm.:13)	STVV (SEQ ID Núm.:14)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID Núm.: 13)	STVV (SEQ ID Núm.: 14)	X	AA216
NMDAR1-2	11 038634	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID Núm.:15)	HRES (SEQ ID Núm.: 23)		
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID Núm.:15)	HRES (SEQ ID Núm.:23)		
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISSESEV (SEQ ID Núm.: 16)	ESEV (SEQ ID Núm.: 4)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSIESDV (SEC ID Núm.: 17)	ESDV (SEQ ID Núm.:3)	X	AA34.1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEQRTSRTCES (SEQ ID Núm.: 18)	TCES (SEQ ID Núm.:24)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSIESDV (SEC ID Núm.: 17)	ESDV (SEQ ID Núm.:3)	X	
NMDAR2A	558748	LNCSNRRVYKMPESDV (SEC ID Núm.: 19)	ESDV (SEQ ID Núm.:3)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGSAAHFSSESEV (SEC ID Núm.:20)	ESEV (SEQ ID Núm.:4)	X	

Los compuestos a seleccionar pueden ser naturales y sintéticos, orgánicos e inorgánicos, e incluyen polímeros (*por ejemplo*, oligopéptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y polinucleótidos), moléculas pequeñas, anticuerpos, azúcares, ácidos grasos, nucleótidos y análogos de nucleótidos, análogos de estructuras de origen natural (*por ejemplo*, péptidos miméticos, análogos de ácidos nucleicos y similares) y muchos otros compuestos. Los compuestos pueden prepararse a partir de bibliotecas de diversidad, tales como bibliotecas de péptidos o no péptidos aleatorios o combinatorios. Las bibliotecas incluyen bibliotecas sintetizadas químicamente, bibliotecas recombinantes (*por ejemplo*, bibliotecas de presentación en fagos) y bibliotecas basadas en traducción *in vitro*. Ejemplos de bibliotecas sintetizadas químicamente se describen en Fodor y otros, 1991, *Science* 251:767-773; Houghten y otros, 1991, *Nature* 354:84-86; Lam y otros, 1991, *Nature* 354:82-84; Medynski, 1994, *Bio/Technology* 12:709-710; Gallop y otros, 1994, *J. Medicinal Chemistry* 37 (9):1233-1251; Ohlmeyer y otros, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 90:10 922-10 926; Erb y otros, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91:11 422-11 426; Houghten y otros, 1992, *Biotechniques* 13:412; Jayawickreme y otros, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91:1614-1618; Salmon y otros, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 90:11 708-11 712; el documento WO 93/20242; y Brenner y Lerner, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 89:5381-5383. Ejemplos de bibliotecas de presentación en fagos se describen en Scott y Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin y otros, 1990, *Science*, 249:404-406; Christian, RJB., y otros, 1992, *J. Mol. Biol.* 227:711-718; Lenstra, 1992, *J. Immunol. Meth.* 152:149-157; Kay y otros, 1993, *Gene* 128:59-65;. El documento WO 94/18318 de fecha 18 de agosto de 1994. Las bibliotecas basadas en la traducción *in vitro* incluyen las descritas en el documento WO 91/05058; y Mattheakis y otros, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91:9022-9026. A modo de ejemplos de bibliotecas no peptídicas, puede adaptarse para usar una biblioteca de benzodiazepinas (*ver, por ejemplo*, Bunin y otros, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4708-4712). También pueden usarse bibliotecas de peptoides (Simon y otros, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367-9371). Ostresh y otros describen otro ejemplo de una biblioteca que puede usarse, en la que las funcionalidades de amida en los péptidos se han permitido para generar una biblioteca combinatoria transformada químicamente. (1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 91:11138-11142).

Ejemplos

Materiales y métodos

5 Inhibidores de psd-95

Los péptidos sintéticos (Advanced Protein Technology Center, Hospital for Sick Kids, Toronto, Ontario o BACHEM California), fueron diseñados para inhibir las interacciones de NMDAR con la proteína de andamiaje de submembrana PSD-95/PSD-95 que une las subunidades NMDAR NR2 así como también nNOS a través de su segundo dominio PDZ (PDZ2; revisado en Hung, 2002), manteniendo así a nNOS en una asociación funcional estrecha con NMDAR (Brenman, 1996; Brenman, 1997). La interacción entre las subunidades NMDAR NR2B y el dominio PDZ2 de PSD-95 depende de un motivo conservado T/SXV del extremo C de NR2B (Kornau, 1995). Esta interacción puede ser interrumpida por la introducción intracelular de proteínas exógenas que contienen una secuencia peptídica de 9 residuos que contiene el motivo de unión SXV al dominio PDZ de NR2B (KLSSIESDV (SEQ ID Núm.: 9); denominado NR2B9c_(SDV)) (Aarts, 2002). Aquí, se sintetizó una secuencia adicional que contenía el motivo TXV (KLSSI-ETDV (SEQ ID Núm.: 10); denominado NR2B9c_(TDV)), que también interactúa con el dominio PDZ2 de PSD-95 (Kornau, 1995). Estos péptidos se asocian con PSD-95 a través de interacciones tipo I de dominio PDZ (revisado en Aarts, 2004). También se sintetizó un péptido control, en el que los residuos en las posiciones 0 y -2 del motivo T/SXV del extremo C se mutaron a alaninas (KLSSIEADA (SEQ ID Núm.: 22; denominado NR2B_(ADA)), lo que deja a este péptido incapaz de unirse a PSD-95 (Kornau, 1995; Aarts, 2002).

No se anticipa que NR2B9c_(SDV), NR2B9c_(TDV) o NR2B_(ADA) entren en las células por sí solos y, por lo tanto, cada péptido se fusionó con un dominio de transducción de proteína de membrana celular (PTD) correspondiente de la proteína VIH-1-Tat (YGRKKRRQRRR (SEQ ID Núm.: 21); Tat) para obtener los 20 péptidos de aminoácidos Tat-NR2B9c_(SDV), Tat-NR2B9c_(TDV) y Tat-NR2B_(ADA). El Tat PTD transduce las membranas celulares de manera rápida y dependiente de la dosis (Schwarze, 1999). Este enfoque se usó anteriormente para introducir con éxito péptidos pequeños y proteínas de fusión en las neuronas del SNC *in vitro* e *in vivo* (Aarts, 2002; Arundine, 2004), y muchos otros hasta ahora han demostrado que la transducción de proteínas puede utilizarse para liberar sistémicamente proteínas administradas al cerebro durante y después del accidente cerebrovascular (Asoh, 2002; Borsello, 2003; Cao, 2002; Denicourt, 2003; Dietz, 2002; Eum, 2004; Kilic, 2002, 2003; Kim, 2005).

Los péptidos se prepararon diariamente a partir de polvo liofilizado disolviéndolos en solución salina normal hasta la concentración final deseada. Fueron administrados por *vía* intravenosa *mediante* una inyección lenta (4-5 min) por individuos cegados al grupo de tratamiento.

Se realizaron experimentos en ratas Sprague-Dawley adultas machos que pesaban 250-300 g (Charles River Laboratory, Canadá). Todos los procedimientos cumplieron con las pautas establecidas por el Consejo Canadiense de Cuidado de Animales y con la aprobación del comité de cuidado de animales de la Red de Salud de la Universidad. Todos los animales se alojaron en grupos de 1-2 animales en jaulas con libre acceso a alimentos y agua y en habitaciones con una temperatura ambiente de 20 ± 1 °C y un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas.

Preparación quirúrgica

Se pesó cada animal y luego se indujo anestesia. Para el modelo de oclusión permanente del vaso pial, las ratas se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg), acepromacina (2 mg/kg) y xilacina (50 mg/kg), complementadas con un tercio de la dosis inicial según se requiera. Para los dos estudios permanentes de oclusión de la arteria cerebral media (pMCAO), se indujo anestesia con halotano al 3,5 % en una mezcla de óxido nítrico y oxígeno (Vol. 2:1) y se mantuvo con halotano al 0,8 % en la mezcla. Las ratas se intubaron endotraquealmente y se ventilaron mecánicamente (60 golpes/min, volumen de corriente de 30-35 ml). Se insertó una sonda de temperatura rectal. Se introdujeron catéteres de polietileno (PE-50) en la arteria y vena femorales izquierdas para registrar la presión arterial, tomar muestras de sangre e inyectar fármacos. La presión arterial media se midió con el uso de un catéter arterial femoral permanente conectado a un transductor de presión y se registró de forma continua. Se realizaron mediciones en serie de gases en sangre arterial, pH y glucosa en sangre.

55 Mediciones de temperatura de centro, cerebro y temporal y control de temperatura

Un día antes de someterse a isquemia, los animales se les implantaron transmisores intraperitoneales (E-Mitter; Mini Mitter / Respironics, Oregón, Estados Unidos) que permitieron el control de la actividad y la temperatura central (CT). El control se realizó de forma continua desde 20 horas antes hasta 24 horas después, el pMCAO (software de control telemétrico VitalView Mini-Mitter; Mini Mitter / Respironics, Oregon, Estados Unidos). Durante la cirugía con animales, los animales estaban lejos de los receptores telemétricos, por lo que se midió la CT con una sonda rectal y se mantuvo a una temperatura de 36,5 °C a 37,5 °C mediante el uso de una lámpara de calentamiento o una manta homeotérmica. Para medir las temperaturas cerebrales después de pMCAO, se expuso el cráneo derecho y se perforó un agujero de 1 mm de diámetro en las siguientes coordenadas estereotácticas: de bregma, AP 3,3 mm, ML 4,0 mm, DV 3,0 mm. Se insertó una cánula de metal de punta roma de calibre 19 (10 mm de longitud) a una profundidad de 5 mm y se fijó en su lugar con pegamento dental. La temperatura del cerebro se recodificó a 0, 1, 2, 4 y 24 horas mediante el uso de

una pequeña sonda de termopar insertada en la cánula metálica. Las temperaturas del músculo temporal se midieron con la misma sonda de termopar insertada en el músculo a través de una aguja de calibre 18. Las temperaturas de la jaula se registraron continuamente mediante el uso de una sonda de temperatura externa y un software (software Tektronix WaveStar; Tektronix, Texas, Estados Unidos) que se ejecuta en un osciloscopio digital y una computadora separada. En algunos experimentos, la temperatura de la jaula se ajustó continuamente en función de la CT del animal mediante el uso de una configuración de control de retroalimentación personalizada que impulsó un dispositivo de enfriamiento basado en Peltier (Iglloo KoolMate 18; Texas, Estados Unidos). El dispositivo de enfriamiento se activaba automáticamente cuando la CT del animal excedía un umbral de 37,1 °C.

10 Vaso oclusión permanente de la arteria cerebral media distal Pial

Esto se llevó a cabo como se describe en otra parte (Forder, 2005). En resumen, la ECA derecha se canuló con tubos de polietileno PE 10. El cráneo se expuso a través de una incisión en la línea media y se realizó una ventana craneal de 6 a 8 mm sobre la corteza somatosensorial derecha (2 mm caudal y 5 mm lateral a bregma). Las arterias piales se visualizaron inyectando pequeños bolos (10-20 µL) del tinte vital violeta azul patente (10 mMol/L; Sigma) en solución salina normal, en la ECA (Figura 2A). Las mismas tres ramas arteriales del MCA pial se cauterizaron eléctricamente y se repitieron las inyecciones de tinte para garantizar la interrupción del flujo a través de las arteriolas cauterizadas. Luego se cerró la incisión y el animal volvió a su jaula y permitió el libre acceso a la comida y al agua. Este modelo de isquemia permanente produce un infarto pequeño altamente reproducible (Forder, 2005) que se limita a la corteza subyacente a las arterias piales terminales coaguladas (Figuras 2A, B).

Oclusión permanente de la arteria cerebral media

La arteria cerebral media izquierda fue ocluida por el método de sutura intraluminal descrito por Longa (1989). En resumen, la arteria carótida común izquierda (CCA) se expuso a través de una incisión en el cuello de la línea media y se disecó libre de los nervios y la fascia circundantes, desde su bifurcación hasta la base del cráneo. Las ramas de la arteria occipital de la arteria carótida externa (AEC) se aislaron más tarde, y estas ramas se disecaron y coagularon. El ECA se disecó más distalmente y se coaguló junto con las ramas terminales de la arteria lingual y maxilar, que más tarde se dividieron. La arteria carótida interna (ICA) se aisló y se separó cuidadosamente del nervio vago adyacente, y la arteria pterigopalatina se ligó cerca de su origen. La punta de una sutura de nylon monofilamento 3-0 de 4 cm de longitud (Harvard Apparatus) se redondeó al quemar para lograr un diámetro de punta de 0,33-0,36 mm y una longitud de punta de 0,5-0,6 mm y se cubrió con poli-L-lisina (Belayev y otros, 1996). La sutura se introdujo a través del CCA y avanzó hacia el ICA y luego al círculo de Willis (a unos 18-20 mm de la bifurcación carotídea), ocluyendo efectivamente la arteria cerebral media. La sutura de seda alrededor del CCA se apretó alrededor de la sutura intraluminal de nylon para asegurarla y ocluir permanentemente la arteria cerebral media. Los animales operados simulados se sometieron a un procedimiento quirúrgico idéntico, que incluye la ligadura permanente del CCA, pero sin inserción de sutura para ocluir el MCA. El procedimiento de pMCAO se consideró adecuado si la puntuación del comportamiento neurológico del animal (más abajo) excedía de 10 a las 2 horas después de pMCAO. Se permitió que los animales se recuperaran de la anestesia a temperatura ambiente.

Evaluación neuroconductual

La puntuación conductual se realizó a las 2 horas y nuevamente a las 24 horas después de pMCAO. La batería consistió en dos pruebas que se usaron previamente (Aarts, 2002) para evaluar varios aspectos de la función neurológica: la prueba del reflejo postural (Bederson, 1986b) y la prueba de colocación de las extremidades anteriores (De Ryck, 1989). La función neurológica se calificó en una escala de 0 a 12 (puntuación normal, 0; puntuación máxima, 12).

Evaluación de volumen de infarto.

A las 24 horas después de pMCAO, los animales se anestesiaron profundamente al emplear inhalación de halotano y los cerebros se eliminaron rápidamente, se cortaron en 8 secciones coronales estándar y se incubaron durante 30 minutos en cloruro de trifeniltetrazolio al 2 % (TTC; Sigma, St. Louis, Estados Unidos) en solución salina a 37 °C. Esta técnica estándar (Hatfield., 1991; Bederson, 1986a; Joshi, 2004) revela el área infartada como una porción pálida y sin manchas de la sección del cerebro. Cada sección se fotografió digitalmente, y los infartos se rastrearón en plantillas que representan los 8 cortes coronales estandarizados. El uso de las plantillas corrige cualquier edema cerebral producido por el infarto, lo que permite una determinación más precisa del volumen del infarto. Más tarde, se trazó digitalmente cada área de infarto desde las plantillas (MCID Versión 6.0, Imaging Research Inc., St. Catharines, Ontario, Canadá) y se integraron las 8 áreas de infarto por cerebro para obtener el volumen.

Análisis de los datos

Toda la cirugía animal, que incluye las infusiones de fármacos, las evaluaciones del comportamiento y las determinaciones del volumen de infarto fueron realizadas por individuos cegados al grupo de tratamiento. Las exclusiones de animales del análisis de los datos de pMCAO (sección Resultados) se basaron en criterios preestablecidos, aplicados prospectivamente por individuos cegados al grupo de tratamiento. Los criterios de exclusión

preestablecidos fueron: todas las muertes antes del sacrificio de los animales, falta de mantenimiento de la CT previa a pMCAO y durante 10 minutos después de la MCAO a $37,0 \pm 1,0$ °C, falta de mantenimiento de pCO₂ entre 35 y 45 mm Hg o presión arterial media (MABP) por encima de 100 mm Hg durante la cirugía, la falla del puntaje neuroconductual excede 10 a las 2 horas después de pMCAO, las complicaciones quirúrgicas técnicas y la falta de infarto de cualquier ganglio basal en la evaluación morfológica. Los datos se expresan en media \pm S.E.M. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante el uso de ANOVA seguido de comparaciones múltiples mediante el uso de la corrección de Bonferroni.

Resultados

Efectos del ayuno nocturno sobre la glucosa en sangre

El ayuno de los animales es una práctica común en los estudios experimentales de accidente cerebrovascular (por ejemplo, Belayev, 2005b; Aronowski, 2003; Nakashima, 1995; Kuge, 1995), y puede practicarse, en gran parte, debido al impacto adverso de la hiperglucemia en la eficacia de compuestos neuroprotectores. Para medir el efecto del ayuno nocturno sobre la glucosa en sangre, a las ratas SD se les permitió acceder solo al agua (período de ayuno de 16 horas; n = 8; peso corporal $278,38 \pm 14,86$ g) o a alimentos y agua durante la noche (sin ayuno; n = 12; peso corporal $276,50 \pm 13,69$ g). La glucosa en sangre se determinó por la mañana. Los animales a los que se les permitió el acceso gratuito durante la noche a los alimentos y al agua exhibieron niveles de glucosa en sangre significativamente más altos que los animales que tuvieron acceso gratuito al agua durante la noche, pero no a los alimentos ($5,50 \pm 0,08$ mMol/l vs $3,71 \pm 0,21$ mMol/l, respectivamente; $t_{18} = 9,134$; $p < 0,001$).

Efectos de los inhibidores de PSD-95 sobre la temperatura central

La experiencia previa ha demostrado que los efectos neuroprotectores de algunos fármacos antiisquémicos podrían haber estado relacionados, al menos en parte, con la hipotermia inducida por fármacos (por ejemplo, MK-801; Corbett, 1990). Por el contrario, si un fármaco induce hipertermia, sus efectos protectores podrían disminuir (Noor, 2005; Memezawa, 1995). Para determinar si la inhibición de PSD-95 afectó la temperatura central (CT), se midió en ratas (n = 6) implantadas con monitores telemétricos de temperatura intraperitoneales. Las CT se midieron desde las 20 horas antes hasta las 24 horas después de una inyección única intravenosa de 3 nMol/g de Tat-NR2B9c_(SDV), la dosis más alta de inhibidor de PSD-95 usada en el presente estudio. Los cambios en la CT se compararon con los de los animales sometidos a cirugía simulada (Métodos) con una infusión salina (vehículo, n = 4). Los animales en ambos grupos exhibieron un aumento leve en la CT después de la finalización de la anestesia (aumento de $\sim 0,5$ °C) que regresó al valor basal en 10-15 horas. Sin embargo, no hubo diferencias en la CT en ningún momento entre la simulación (vehículo) y los animales con infusión de péptidos (Figuras 1A, B). Se han observado elevaciones transitorias en la CT en roedores después de la anestesia general (Hansen y otros, 2002; Weinandy y otros, 2005), y se han atribuido al estrés anestésico.

Efecto de pMCAO sobre la temperatura central.

La hipertermia espontánea sostenida es una consecuencia reconocida de la isquemia grave después de MCAO (Roberts-Lewis., 1993; Zhao., 1994; Reglodi., 2000; Legos, 2002; Abraham, 2002, 2003), posiblemente debido a una lesión hipotalámica (Zhao, 1994), o la activación microglial temprana en los centros reguladores de la temperatura del hipotálamo (Abraham, 2003). Para lograr una hipertermia constante y sostenida después de la pMCAO, el filamento usado para la oclusión de MCA se modificó de acuerdo con Abraham, quien demostró que el grado de hipertermia post-isquémica y la magnitud del infarto cerebral están relacionados con el tamaño del filamento oclusivo (Abraham, 2002). Se indujo pMCAO mediante el uso de un filamento con un diámetro de punta de 0,33-0,36 mm (Métodos). Esto causó que la temperatura de los animales aumentara rápidamente después de pMCAO, al alcanzar un pico a $\sim 39,5$ °C aproximadamente 2 horas después de pMCAO y permaneciendo elevada a 39 °C o más durante el período de observación de 24 horas (Figura 1D).

Luego se determinó si la hipertermia espontánea era el resultado de que los animales tuvieran un defecto en su capacidad de termorregulación. Mediante el uso de un regulador de temperatura de la jaula controlado por retroalimentación (Métodos) se intentó la inducción de normotermia en los animales isquémicos (n = 8) enfriando la jaula cada vez que su CT excedía un umbral de 37,1 °C (Figura 1E). Los animales se compararon con una cohorte que se sometió a pMCAO, pero cuya jaula se mantuvo a temperatura ambiente (n = 8; Figura 1D). La respuesta hipertérmica a pMCAO fue resistente al enfriamiento por reducción de la temperatura ambiente, y los animales mantuvieron una CT ≥ 39 °C incluso cuando la temperatura de la jaula cayó a ~ 8 °C (Figura 1E). Estudios previos sugieren que la reducción de esta respuesta hipertérmica requiere medidas extremas, que consisten en afeitar grandes áreas de pelaje, colocar a los animales a 4 °C y aplicar tópicamente alcohol al 70 % (Reglodi, 2000). Por lo tanto, se concluyó que la hipertermia robusta y sostenida después de pMCAO no se debió a la incapacidad de los animales para termorregular, sino que se debió a una alteración en el punto de ajuste de temperatura del animal (fiebre).

Efecto de la oclusión de vasos piales en la temperatura central

Como el modelo pMCAO produjo hipertermia, se buscó un modelo de isquemia permanente que no alterara la CT para

que la neuroprotección con inhibidores de PSD-95 pudiera evaluarse independientemente de la hipertermia producida por pMCAO. Con este fin, se usó un modelo de oclusión de vasos piales (Métodos) que produce un infarto pequeño (Figuras 2A, B) para no impactar la CT. Los animales sometidos a este insulto isquémico ($n = 5$) no mostraron cambios significativos en la CT en comparación con los animales de cirugía simulada (Figuras 1A, C).

5

Relación entre la temperatura central y cerebral en pMCAO.

Aunque la temperatura del cerebro puede correlacionarse más directamente con la extensión del daño isquémico (Busto, 1987a, 1987c, 1989b; Dietrich, 1992; Minamisawa, 1990a; Morikawa, 1992), es poco probable que algún fármaco administrado por vía sistémica pueda afectar la temperatura cerebral de forma independiente de la temperatura central. Para determinar si las mediciones de temperatura central reflejaban la temperatura cerebral en este estudio, algunos animales que se habían sometido a pMCAO con control de temperatura central también se sometieron a mediciones de temperatura directamente del cerebro y, en algunos experimentos, del músculo temporal como una medida sustitutiva de la temperatura cerebral. Las mediciones de temperatura central se correlacionaron dentro de $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ con las temperaturas del cerebro y del músculo temporal en animales que recibieron solución salina ($n = 6$; Figura 1F) o 3 nMol/g de Tat-NR2B9c_(SDV) ($n = 6$; Figura 1F). Por lo tanto, las mediciones de CT se usaron para el resto del estudio.

Exclusiones del análisis de datos.

Los criterios de exclusión (Métodos) se aplicaron por individuos cegados a los grupos de tratamiento. Todas las exclusiones del estudio de oclusión del vaso pial se detallan en la Tabla 1. No se excluyeron animales después de la dosificación con el inhibidor de PSD-95. Las exclusiones del análisis de los dos estudios pMCAO se enumeran en la Tabla 2. En resumen, la mortalidad perioperatoria fue la razón principal para excluir a los animales del análisis. Las tasas generales de mortalidad fueron del 8,7 % y del 16,4 % para los animales en el primer y segundo estudio independiente de pMCAO, respectivamente, sin relación aparente con las infusiones o identidades del fármaco. Las necropsias revelaron que las mortalidades se asociaron principalmente con hemorragias subaracnoideas y/o cerebrales inducidas por perforaciones arteriales por el filamento pMCAO.

Efecto de los inhibidores de PSD-95 sobre el volumen del infarto.

En todos los experimentos, los inhibidores de PSD-95 se administraron 1 hora después del inicio de la isquemia, ya que el tratamiento después del inicio del accidente cerebrovascular probablemente tenga la mayor relevancia clínica.

Primero se evaluaron los efectos de Tat-NR2B9c_(SDV) en el modelo de oclusión de vasos piales (Figura 2A). Los animales fueron tratados con vehículo (solución salina), dosis bajas ($0,3\text{ nmol/g}$) o altas (3 nmol/g) del inhibidor PSD-95 a 1 hora después de la oclusión del vaso. Como control adicional en este estudio de selección, se utilizó Tat-NR2B9c_(ADA), un péptido incapaz de unirse a PSD-95 (Kornau, 1995; Methods), y que no afecta la vulnerabilidad excitotóxica (Aarts, 2002; Arundine y otros., 2004) o tamaño del infarto (Aarts, 2002). El tratamiento de los animales con vehículo o Tat-NR2B9c_(ADA) dio como resultado infartos localizados en la corteza subyacente a la oclusión del vaso pial, al ocupar aproximadamente el 9-10 % del volumen del hemisferio (Figura 2B). El tratamiento de los animales con Tat-NR2B9c_(SDV) (3 nMol/g) redujo los infartos en aproximadamente un 60 % (Figuras 2C, D).

A continuación, se usaron los inhibidores de PSD-95 en pMCAO. Todos los animales que se sometieron a pMCAO exhibieron hipertermia en el mismo grado, con una CT superior a $39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las primeras 8 horas, y que permaneció a aproximadamente $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ a partir de entonces (Figura 3A-E). La inyección de los inhibidores de PSD-95 no tuvo impacto en la respuesta hipertérmica después de pMCAO ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en el pico o la elevación de la temperatura media (ANOVA, $p > 0,15$ para cada uno).

Los animales que se habían sometido a pMCAO sin tratamiento sufrieron infartos hemisféricos grandes que, a las 24 horas, ocuparon la mayoría de la superficie cortical y las estructuras profundas (Figura 4B). Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor de PSD-95 Tat-NR2B9c_(SDV) 1 hora después de pMCAO ($0,3\text{-}3,0\text{ nM/g}$) atenuó el volumen total de infarto (por ejemplo, Figuras 4C, D) hasta en un 40 % (Figura 5A_i), con los efectos más pronunciados en el componente cortical del infarto ($\sim 45\%$ de reducción del infarto cortical; Figura 5A_{ii}). La reducción en el infarto de tejido fue observable en todos los planos esterotácticos usados para cuantificar los volúmenes de infarto (Figuras. 4C, D. 6A_i, A_{ii}).

Nosotros hemos informado previamente la neuroprotección por el péptido Tat-NR2B9c_(SDV) in vitro (Aarts, 2002; Arundine., 2004) e in vivo mediante el uso de un modelo de MCAO reversible y transitorio (Aarts, 2002). Los aminoácidos terminales en las posiciones -0 y -2 son críticos, y la mutación de incluso un residuo evita o reduce la asociación del extremo C de NR2B con PSD-95 (Bassand, 1999). Sin embargo, se predice que los péptidos que terminan con la secuencia consenso TDV del extremo C también deberían unirse a objetivos proteicos similares, que incluyen PSD-95 (Kornau, 1995, 1997; Niethammer, 1996; Bassand, 1999). Si es así, pueden exhibir efectos neuroprotectores similares, aunque esto nunca se ha determinado en ningún modelo de enfermedad. Para probar esta hipótesis, se usó Tat-NR2B9c_(TDV) a $0,3\text{ mM/g}$ y $3,0\text{ nM/g}$ en el mismo estudio y en las mismas condiciones que Tat-NR2B9c_(SDV). Como se muestra en las Figuras 4E, F, 5A_i, A_{ii} y 6A_i, A_{ii}, este péptido también redujo el volumen del

65

infarto hemisférico en un 35 % y el infarto cortical en un 40-45 %.

A continuación, se evaluó la reproducibilidad de los nuevos hallazgos derivados del primer estudio. Se realizó un segundo estudio confirmatorio similar al primero. El estudio confirmatorio se centró en replicar los efectos de la concentración más baja del péptido Tat-NR2B9c_(SDV) y los efectos de los péptidos Tat-NR2B9c_(TDV). Como la técnica quirúrgica es una variable clave en los modelos de accidente cerebrovascular en animales, la cirugía en los dos estudios independientes fue realizada por diferentes cirujanos cegados. Como en el primer estudio, todos los péptidos se administraron 1 hora después de pMCAO. El equipo que realizó el estudio confirmatorio fue cegado a los resultados del primer estudio.

El estudio confirmatorio arrojó resultados similares al primero, con los péptidos Tat-NR2B9c_(SDV) y Tat-NR2B9c_(TDV) que tuvieron un efecto similar en la reducción de los volúmenes de infarto hemisférico y cortical (Figuras 5B_i, B_{ii}, 6B_i, B_{ii}).

Efecto de los inhibidores de PSD-95 en la actividad de la jaula y en los puntajes del comportamiento neurológico.

Una desventaja del modelo de oclusión de fibra intraluminal pMCAO combinado con hipertermia y en animales sin ayuno es que los animales experimentales sufren una lesión cerebral extensa que causa déficits neurológicos graves (puntuación neurológica compuesta > 11 en animales no tratados; Figura 7A). A diferencia de la MCAO transitoria, en la que este puntaje mejora espontáneamente en 24 horas (Belayev., 2001; Aarts, 2002), los animales no tratados en esta serie de experimentos permanecieron profundamente deteriorados (puntajes neurológicos compuestos de 24 horas de ~ 11). Los animales tratados con los inhibidores de PSD-95 mostraron una tendencia hacia mejores puntuaciones neurológicas 24 horas después de pMCAO, pero estos resultados no alcanzaron significación estadística (prueba t de Student emparejada, P> 0,05; Figura 7A). Sin embargo, el control telemétrico de la actividad de la jaula (Colbourne, 1999; Barber, 2004) reveló que a las 24 horas los animales tratados con los inhibidores de PSD-95 tenían niveles similares de actividad de la jaula en comparación con los simulados (Figura 7B) y los niveles previos a MCAO (Figura 7D-G), mientras que la actividad en los animales no tratados disminuyó (Figura 7C). Pueden ser necesarios tiempos de recuperación posteriores a pMCAO más largos para evaluar completamente la recuperación neurológica después de este tipo profundo de lesión isquémica. Sin embargo, esto no se buscó en el presente estudio debido a las preocupaciones sobre la capacidad de supervivencia a más largo plazo de los animales no tratados.

Bibliografía

- Aarts (2002) *Science* 298:846-850.
 Aarts (2004) *Curr Mol Med* 4:137-147.
 Abraham (2002) *Exp Brain Res* 142:131-138. Abraham (2003) *Exp Brain Res* 153:84-91.
 Alvarez-Sabin (2003) *Stroke* 34:1235-1241. Aronowski (2003) *Stroke* 34:1246-1251.
 Arundine (2004) *J Neurosci* 24:8106-8123.
 Asoh (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:17107-17112.
 Azzimondi (1995) *Stroke* 26:2040-2043.
 Barber (2004) *Stroke* 35:1720-1725.
 Bassand (1999) *Eur J Neurosci* 11:2031-2043.
 Beckman (1996) *Chem Res Toxicol* 9:836-844. Beckman (1996) 271:C1424-C1437.
 Bederson (1986a) *Stroke* 17:1304-1308. Bederson (1986b) *Stroke* 17:472-476. Belayev (1996) *Stroke* 27:1616-1622. Belayev (2005a) *Stroke* 36:1071-1076.
 Belayev (2001) *Stroke* 32:553-560.
 Belayev (2005b) *Stroke* 36:326-331.
 Borsello (2003) *Nat Med* 9:1180-6
 Boysen (2001) *Stroke* 32:413-417.
 Brenman (1997) *Current Opin Neurobiol* 7:374-378.
 Brenman (1996) *Cell* 84:757-767.
 Busto (1987a) *J Cereb Blood Flow Metab* 7:729-738.
 Busto (1989a) *Neurosci Lett* 101:299-304.
 Busto (1989b) *Stroke* 20:1113-1114.
 Busto (1987b) *Cereb Blood Flow Metab* 7:729-738.
 Busto (1987c) *J Cereb Blood Flow Metab* 7:729-738.
 Cao (2002) *J Neurosci* 22:5423-5431.
 Chen (1991) *Neurology* 41:1133-1135.
 Chen (1993) *J Cereb Blood Flow Metab* 13:389-394.
 Colbourne (1999) *J Cereb Blood Flow Metab* 19:742-749.
 Corbett (1990) *Brain Res* 514:300-304.
 Cuervo (1996) *Adv Exp Med Biol* 387:147-161.
 Davis (1997) *Lancet* 349:32.
 Davis (2000) *Stroke* 31:347-354.
 Dawson (1993) *J Neurosci* 13:2651-2661.

- Dawson (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6368-6371.
 De Keyser (1999) *Trends Neurosci* 22:535-540.
 De Ryck (1989) *Stroke* 20:1383-1390.
 Denicourt (2003) *Trends Pharmacol Sci* 24:216-218.
 5 Dietrich (1992) *J Neurotrauma* 9: Supl 2:S475-85.
 Dietz (2002) *Mol Cell Neurosci* 21:29-37.
 Dirnagl (1999) *Trends Neurosci* 22:391-397.
 Donnan (2005) *Stroke* 36:2326.
 Elersy (2004) *Anesthesiology* 100:1160-1166.
 10 Eum (2004) *Free Radic Biol Med* 37:1656-1669.
 Farrokhnia (2005) *Acta Neurol Scand* 112:81-87.
 Fisher (2005) *Stroke* 36:2324-2325.
 Forder (2005) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1989-H1996.
 Ginsberg (1998) *Stroke* 29:529-534.
 15 Ginsberg (1992) *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 4:189-225.
 Gladstone (2002) *Stroke* 33:2123-2136.
 Hansen (2002) *Lab Anim* 36:144-152.
 Hatfield (1991) *Neuropathol Appl Neurobiol* 17:61-67.
 Horiguchi (2003) *Stroke* 34:1015-1020.
 20 Hung (2002) *J Biol Chem* 277:5699-5702.
 Ikonomidou (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12885-12890.
 Ikonomidou (2002) *Lancet Neurology* 383-386.
 Joshi (2004) *Brain Res Brain Res Protocol* 13:11-17.
 Kaste (2005) *Stroke* 36:2323-2324.
 25 Kilic (2002) *Ann Neurol* 52:617-622.
 Kilic (2003) *Stroke* 34:1304-1310.
 Kim (2005) *Mol Cells* 19:88-96.
 Kornau (1995) *Science* 269:1737-1740.
 Kornau (1997) *Current Opin Neurobiol* 7:368-373.
 30 Kuge (1995) *Stroke* 26:1655-1657.
 Lees (2000) *Lancet* 355:1949-1954.
 Legos (2002) *J Neurosci Methods* 113:159-166.
 Li (2001) 21:568-576.
 Li (2000) *Stroke* 31:183-192.
 35 Li (1997) *Acta Physiol Scand* 161:567-580.
 Li (1998) *Brain Res* 782:175-183.
 Longa (1989) *Stroke* 20:84-91.
 Memezawa (1995) *Brain Res* 670:48-52.
 Migaud (1998) *Nature* 396:433-439.
 40 Minamisawa (1990a) *Stroke* 21:758-764.
 Minamisawa (1990b) *J Cereb Blood Flow Metab* 10:365-374.
 Minamisawa (1990c) *TAnn Neurol* 28:26-33.
 Morikawa (1992) *J Cereb Blood Flow Metab* 12:380-389.
 Morris (1999) *J Neurosurg* 91:737-743.
 45 Nakashima (1995) *Anesthesiology* 82:1199-1208.
 Niethammer (1996) *J Neurosci* 16:2157-2163.
 Noor (2005) *Stroke* 36:665-669.
 Paolino (2005) *J Neurosci Nurs* 37:130-135.
 Reglodi (2000) *Exp Neurol* 163:399-407.
 50 Reith (1996) *Lancet* 347:422-425.
 Roberts-Lewis (1993) *J Neurochem* 61:378-381.
 Rothman (1995) *Trends Neurosci* 18:57-58.
 Rothman (1987) *Trends Neurosci* 10:299-302.
 Sattler (1999) *Science* 284:1845-1848.
 55 Schwarze (1999) *Science* 285:1569-1572.
 Sheng (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7058-7061.
 Comité STAIR (1999) *Stroke* 30:2752-2758.
 Walters (2005) *Cerebrovasc Dis* 20:304-309.
 Weinandy (2005) *Lab Anim* 39:200-208.
 60 Ye (1996) *Methods Enzymol* 269:201-209.
 Zhang (1994) *Science* 263:687-689.
 Zhao (1994) *Brain Res* 649:253-259.

65 La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de la invención anterior.

Tabla 1: Mortalidades y exclusiones del estudio de oclusión de vasos piales:

Grupo	Animales incluidos	Muertes quirúrgicas*	Muertes postoperatorias	Técnica Quirúrgica **	Número analizado
SOLUCIÓN SALINA	9	2	0	1	6
Tat-NR2B9c (SDV) (0,3 nMole/g)	9	1	0	1	7
Tat-NR2B9c (SDV) (3,0 nMofe/Q)	9	0	0	2	7

Los animales excluidos debido a muertes quirúrgicas* o debido a dificultades con la técnica quirúrgica** (dificultad para obtener una cauterización pial limpia) fueron excluidos antes de la infusión del fármaco. No hubo exclusiones después de la dosificación.

5

10

15

Tabla 2: Mortalidades y exclusiones del estudio pMCAO

Cirujano # (1/2)	Grupo	Animales incluidos	Muertes quirúrgicas	Muertes postoperatorias**	excluido porque 2 horas de puntaje neurológico <= 10	MABP <100 mm Hg durante la cirugía	pCO ₂ <35 o >45	CT <36 o >38 °C antes y 10 minutos después de pMCAO	No hay infartos de ganglios basales	Número analizado
	SALINA	19/11	1*/0	2/3***	0/0	0/0	0/0	0/0	2/0	14/8
	Tat-NR2B9c (sov) (0,3 nMole/q)	10/9	0/0	1/1	0/0	1/0	0/0	0/0	1/0	7/8
	Tat-NR2B9c (sov) (3,0 nMole/q)	9	0	1	0	0	0	0	0	8
	Tat-NR2B9c (rov) (0,3 nMole/g)	9/10	0/0	0/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	9/8
	Tat-NR2B9c (rov) (3,0 nMole/g)	10/11	0/0	0/3	0/0	2/0	0/0	0/0	0/0	8/8
	Cirugía simulada	4	0	0	0	0	0	0	0	4
	pMCAO con Enfriamiento por retroalimentación	8	0	0	0	0	0	0	0	8

Los dos números en cada celda (X/Y) representan números de animales para los cirujanos del estudio pMCAO #1 y #2, respectivamente.

* Concluido antes de MCAO, durante cateterismo arterial

** La necropsia reveló una hemorragia cerebral/subaracnoidea probablemente causada por la inserción del filamento MCAO.

*** Un animal sacrificado debido a problemas respiratorios 5 horas después de la cirugía pMCAO. La necropsia reveló lesión traqueal relacionada con la intubación.

Tabla 3-1

Parámetros fisiológicos de todos los grupos del 1 ^{er} estudio.						
Grupos	Control	SDV 0,3 nmol/g	SDV 3 nmol/g	TDV 0,3 nmol/g	TDV 3 nmol/g	Simulacro
N	8	8	8	9	8	4
BW (g)	275,25 ± 7,83	291,13 ± 4,30	302,87 ± 8,22	296,44 ± 5,15	300,75 ± 4,67	291,25 ± 4,05
24 horas	248,75 ± 8,04	250,00 ± 3,55	242,80 ± 4,12	254,63 ± 2,73	259,38 ± 4,86	277,25 ± 4,71
NS @ 2 horas	11,25 ± 0,25	10,50 ± 0,27	10,88 ± 0,13	11,00 ± 0,00	11,25 ± 0,16	0
24 horas	11,00 ± 0,33	10,37 ± 0,26	10,00 ± 0,42	10,55 ± 0,41	10,37 ± 0,42	0
MABP (mm Hg)	126,13 ± 5,80	119,63 ± 5,14	126,75 ± 4,39	126,00 ± 5,54	123,63 ± 6,27	108,75 ± 3,88
10 minutos	139,38 ± 4,88	136,75 ± 4,85	134,38 ± 7,42	121,44 ± 5,23	140,63 ± 7,64	132,25 ± 8,44
70 minutos	134,88 ± 3,60	139,38 ± 5,14	103,38 ± 5,06	129,44 ± 6,54	102,13 ± 2,39	120,75 ± 5,59
pH	7,43 ± 0,01	7,42 ± 0,01	7,44 ± 0,01	7,42 ± 0,02	7,44 ± 0,01	7,43 ± 0,01
10 minutos	7,42 ± 0,01	7,42 ± 0,01	7,43 ± 0,01	7,44 ± 0,01	7,43 ± 0,01	7,43 ± 0,01
70 minutos	7,41 ± 0,01	7,43 ± 0,01	7,41 ± 0,01	7,41 ± 0,01	7,40 ± 0,01	7,42 ± 0,01
pCO ₂ (mm Hg)	38,5 ± 1,27	37,5 ± 0,42	37,38 ± 0,78	38,11 ± 0,81	39,75 ± 0,70	39,25 ± 0,63
10 minutos	40,00 ± 0,91	41,38 ± 0,98	40,75 ± 1,03	39,33 ± 0,73	40,25 ± 0,99	38,25 ± 0,25
70 minutos	39,88 ± 1,13	39,00 ± 1,35	37,00 ± 0,53	38,67 ± 0,93	40,38 ± 0,84	38,50 ± 1,50
pO ₂ (mm Hg)	142,13 ± 4,80	137,75 ± 7,18	130,63 ± 5,63	131,44 ± 9,11	130,63 ± 6,24	130,25 ± 15,39
10 minutos	140,00 ± 5,83	132,38 ± 6,77	129,75 ± 4,67	124,22 ± 6,34	136,00 ± 2,57	122,00 ± 5,67
70 minutos	136,38 ± 4,93	139,38 ± 7,15	136,13 ± 5,28	137,67 ± 4,75	132,25 ± 4,65	125,5 ± 8,58

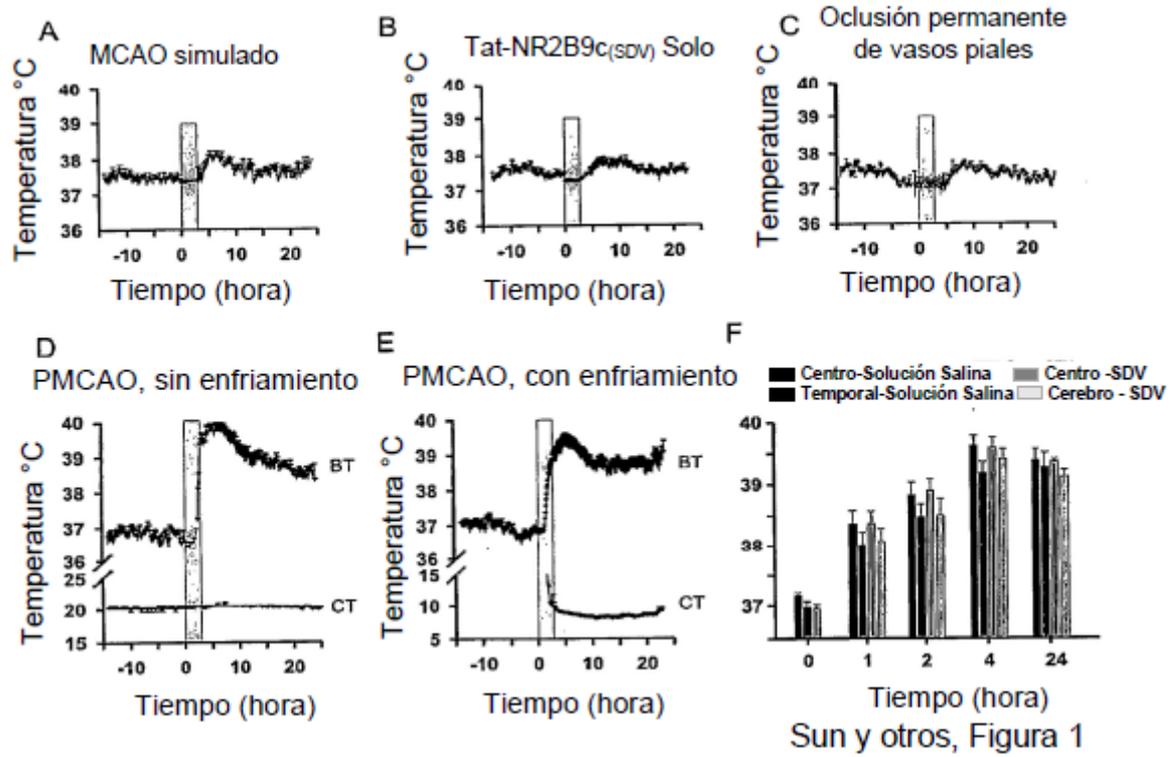
BW - peso corporal; NS - puntuación de neuroconducta.
Media ± SEM

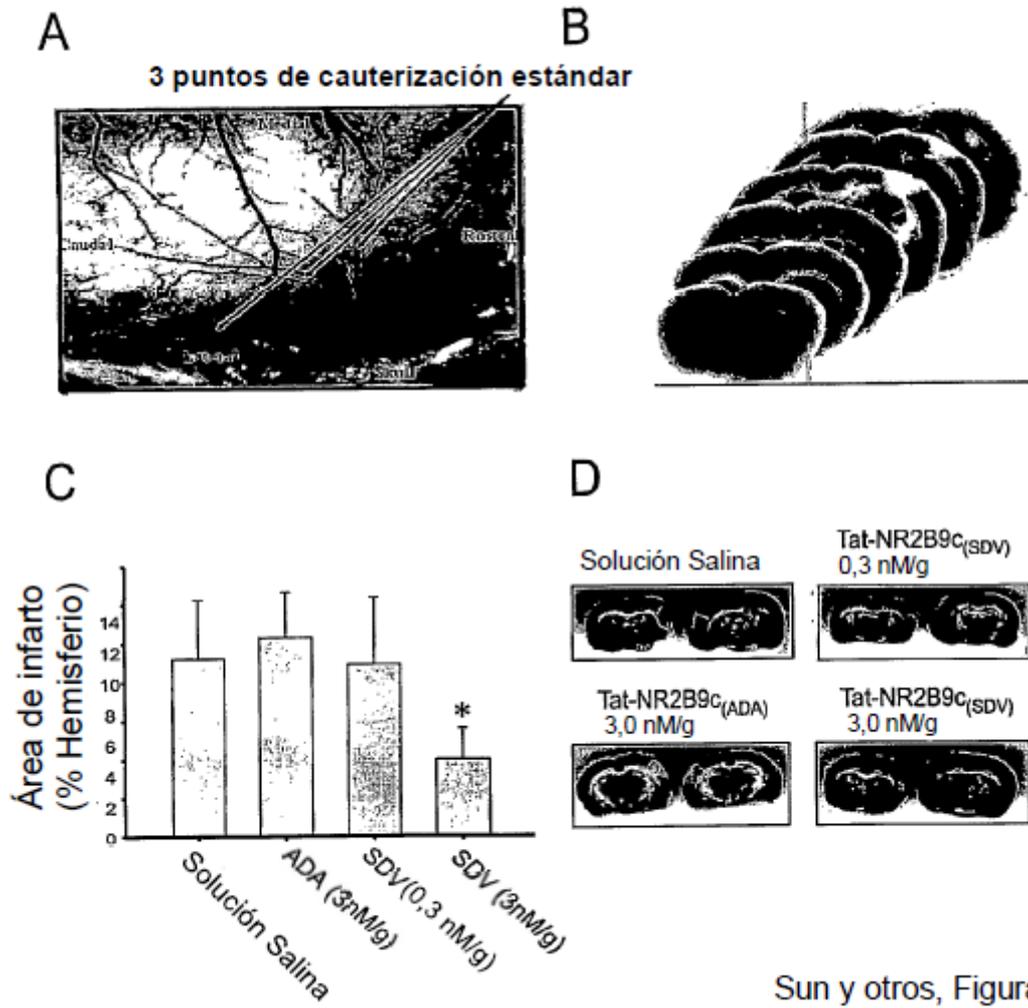
Tabla 3-2

Parámetros fisiológicos de todos los grupos del 2 ^{do} estudio.				
Grupos	Control	SDV 0,3 nmol/g	TDV 0,3 nmol/g	TDV 3 nmol/g
N	8	8	8	8
BW (g)	293,75 ± 4,07	287,75 ± 6,84	293,50 ± 2,28	296,25 ± 3,25
NS @ 2 horas	10,75 ± 0,16	10,86 ± 0,13	10,63 ± 0,18	10,60 ± 0,24
24 horas	10,88 ± 0,13	10,43 ± 0,28	10,63 ± 0,18	11,00 ± 0,00
MABP (mm Hg)	116,00 ± 5,29	114,50 ± 3,76	119,00 ± 4,11	124,13 ± 6,29
10 minutos	134,00 ± 8,76	134,38 ± 4,16	140,50 ± 4,69	146,63 ± 40,12
70 minutos	137,25 ± 5,52	125,75 ± 4,94	129,25 ± 8,09	130,25 ± 12,26
pH	7,39 ± 0,01	7,39 60,01	7,38 60,02	7,41 ± 0,01
10 minutos	7,40 ± 0,01	7,41 ± 0,01	7,38 ± 0,01	7,38 ± 0,02
70 minutos	7,39 ± 0,01	7,41 ± 0,02	7,41 60,01	7,39 ± 0,02
pCO ₂ (mm Hg)	40,13 ± 1,19	39,13 ± 1,25	39,25 ± 1,06	38,63 ± 1,05
10 minutos	40,88 ± 0,93	38,63 ± 0,89	42,75 ± 0,59	37,50 ± 0,80
70 minutos	39,13 ± 1,25	39,50 ± 1,22	41,75 ± 1,13	40,88 ± 1,42
pO ₂ (mm Hg)	119,13 ± 7,83	142,75 ± 4,34	133,13 ± 5,15	141,13 ± 10,44
10 minutos	121,25 ± 6,09	137,75 ± 5,55	132,00 ± 4,92	120,13 ± 6,53
70 minutos	120,50 ± 3,01	126,38 ± 4,79	121,00 ± 4,39	124,63 ± 4,44

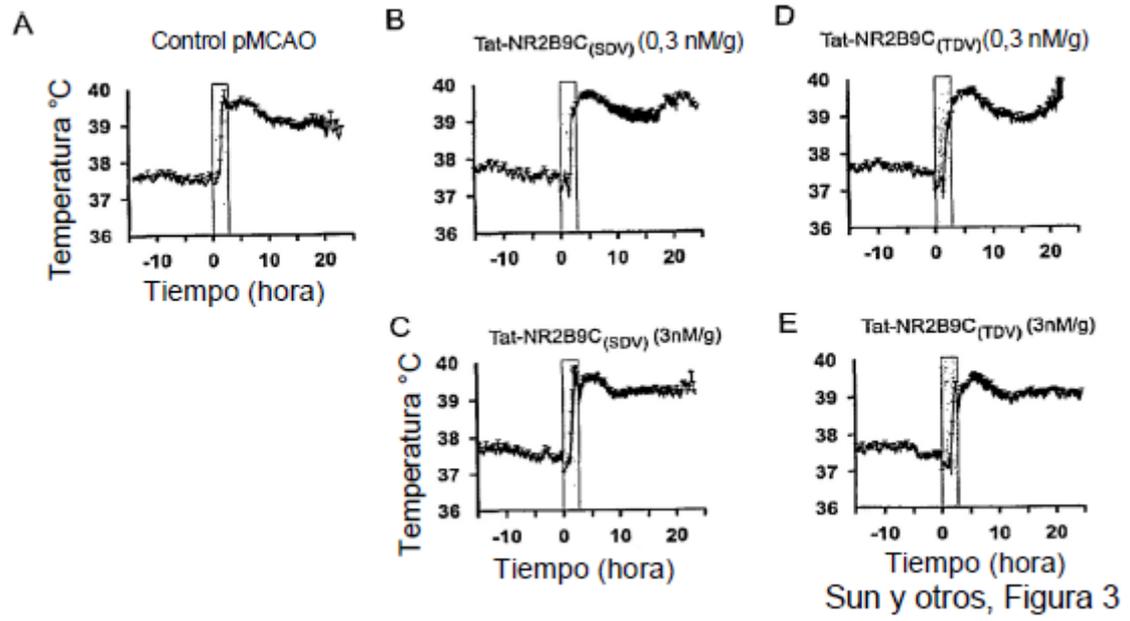
REIVINDICACIONES

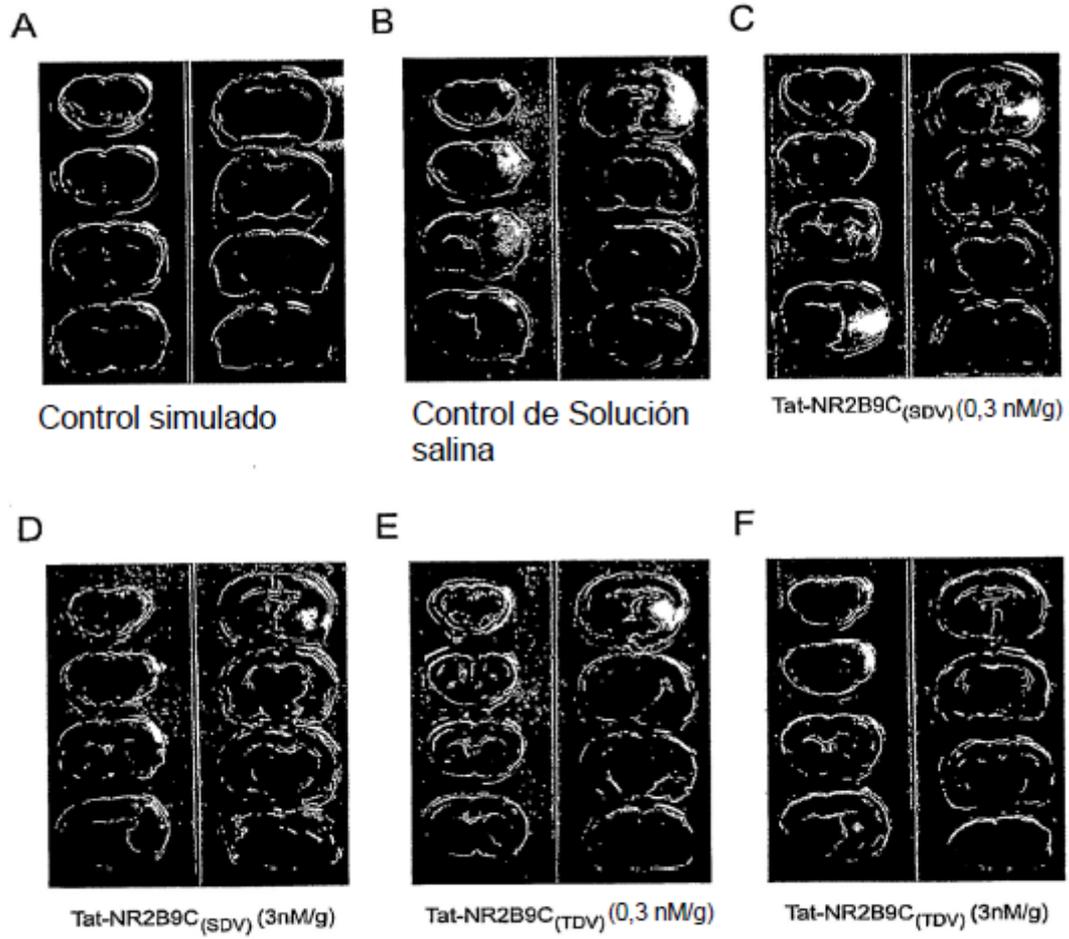
- 5 1. Un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] para su uso en el tratamiento, opcionalmente en donde el tratamiento es profiláctico, del efecto dañino del accidente cerebrovascular exacerbado por la fiebre en un sujeto que tiene fiebre de al menos 38 grados Celsius al inicio del tratamiento.
- 10 2. Un péptido para su uso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la fiebre es de al menos 39 grados Celsius antes o hasta 24 horas después del inicio del tratamiento, por ejemplo, entre el inicio del tratamiento y 6 horas después.
- 15 3. Un péptido para su uso como se reivindica en la reivindicación 1 o 2 en donde [E/D/N/Q] es E, [D/E/Q/N] es D y [V/L] es V.
- 20 4. Un péptido para su uso como se reivindica en las reivindicaciones 1 o 2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ETDV, ESDV, ESEV, ETEV, DTDV y DTEV.
- 25 5. Un péptido para su uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el péptido comprende ESDV o ETDV.
- 30 6. Un péptido para su uso como se reivindica en la reivindicación 5, en donde el péptido comprende KLSSIETDV o KLSSIESDV.
- 35 7. Un péptido para su uso como se reivindica en la reivindicación 6, que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos YGRKKRR-QRRRKLSSIETDV o YGRKKRRORRRKLSSIESDV.
- 40 8. Un péptido para su uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la fiebre se debe a (i) infección concurrente, (ii) ubicación del accidente cerebrovascular en una región del cerebro que afecta el control de temperatura o el punto de ajuste, (iii) exposición al calor del sujeto.
- 45 9. Un péptido para su uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el accidente cerebrovascular es accidente cerebrovascular isquémico.
- 50 10. Un péptido para su uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el sujeto también tiene hiperglucemia debido a diabetes concurrente.
11. Un péptido para su uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tratamiento reduce el volumen de infarto en al menos un 10 %, por ejemplo, al menos un 20 %.
12. Un péptido para su uso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el sujeto es humano.
13. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del accidente cerebrovascular exacerbado por la fiebre en un sujeto que tiene fiebre de al menos 38 grados Celsius al inicio del tratamiento, que comprende en dosis unitarias de 0,05 a 500 mg, opcionalmente 0,1 a 100 mg, por ejemplo 0,5 a 50 mg tal como 1 a 20 mg de un péptido como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7.
14. Una composición farmacéutica para su uso como se reivindica en la reivindicación 13, en donde el sujeto es humano.



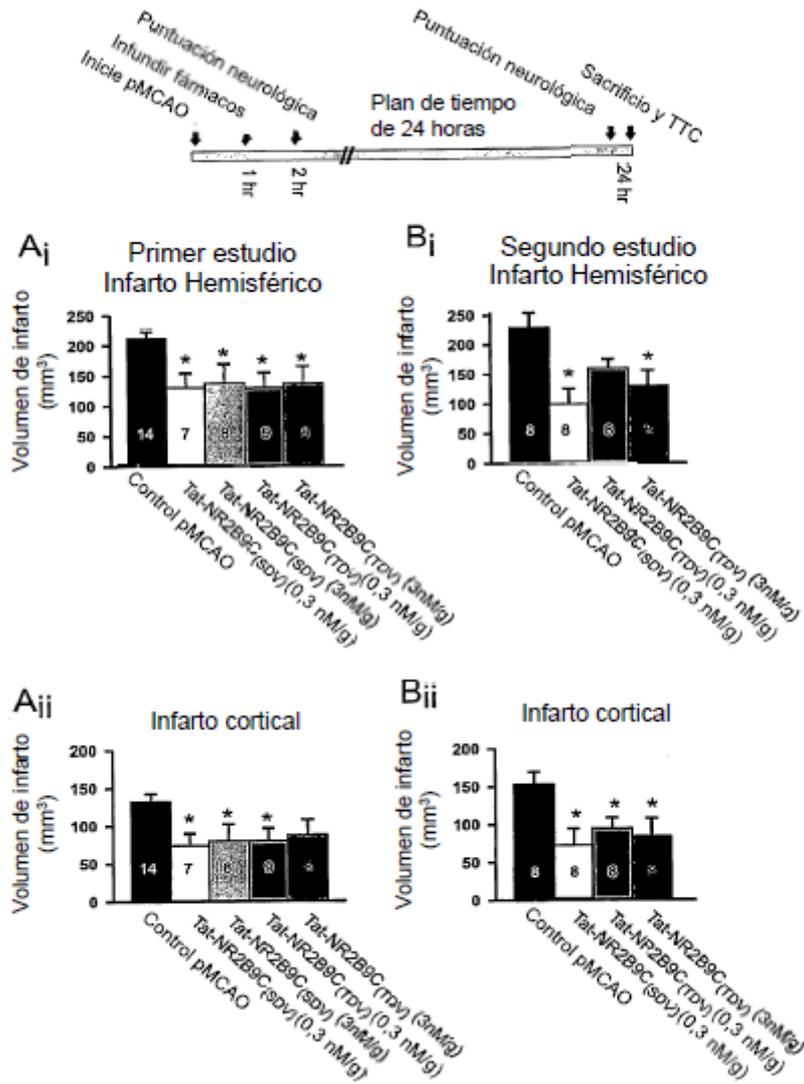


Sun y otros, Figura 2

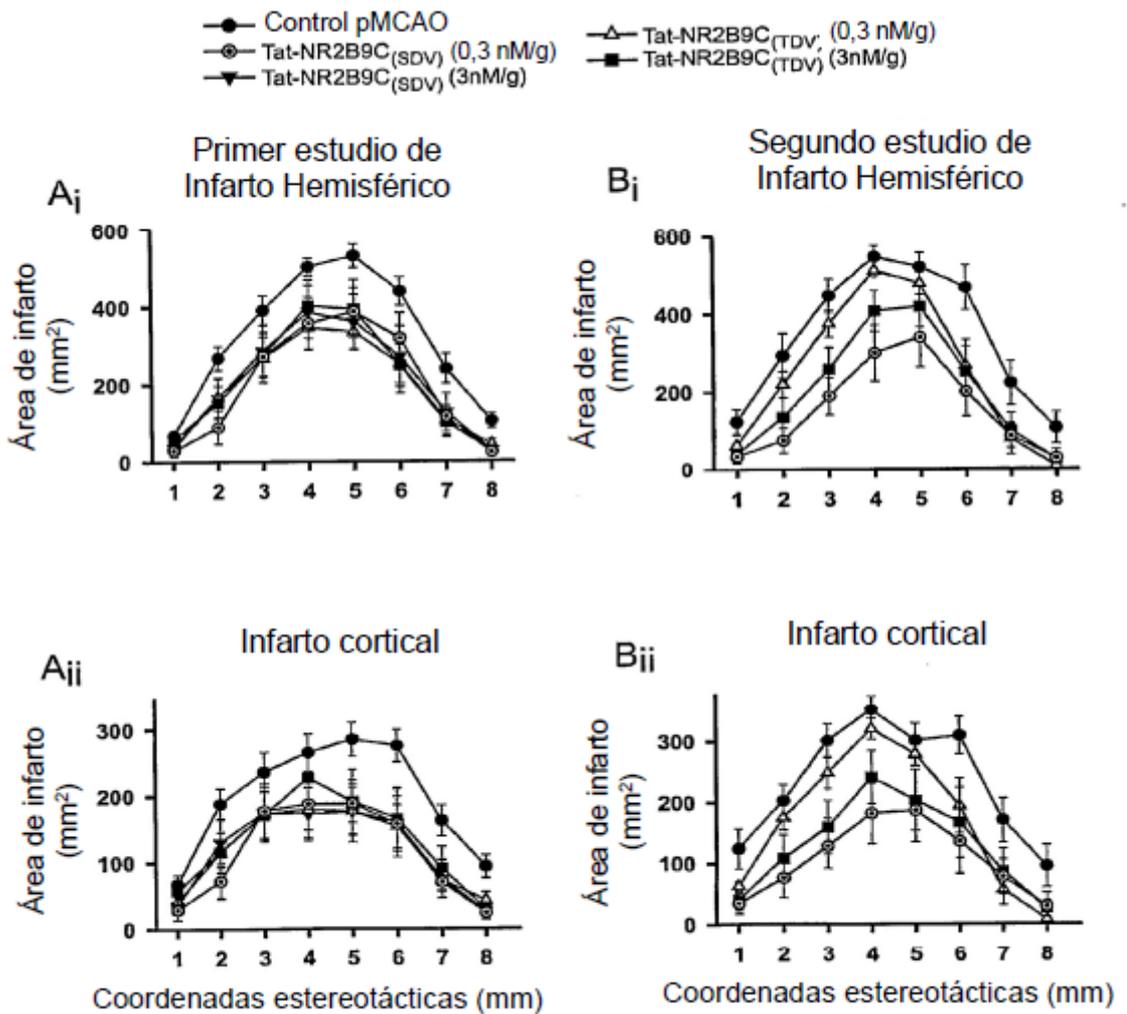




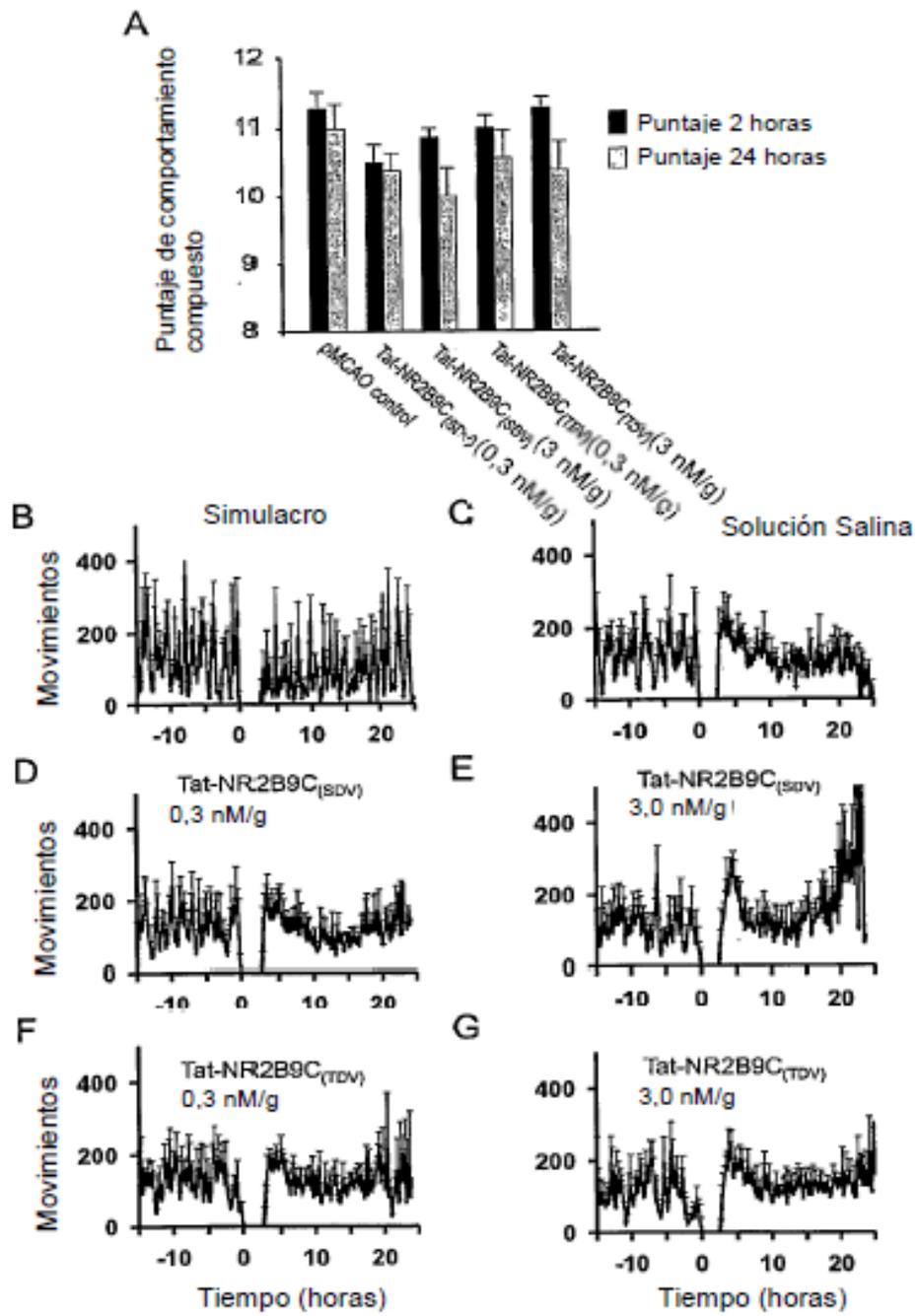
Sun y otros, Figura 4



Sun y otros, Figura 5



Sun y otros, Figura 6



Sun y otros, Figura 7