

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 901**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/15** (2006.01)  
**C07K 14/81** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)  
**A61K 51/08** (2006.01)  
**A61K 49/14** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05770546 .9**  
96 Fecha de presentación: **21.07.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1859041**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54 Título: **Polipéptidos de aprotinina para transportar un compuesto a través de la barrera sangre-cerebro**

30 Prioridad:  
**18.02.2005 US 653928 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.06.2012**

73 Titular/es:  
**Angiochem Inc.**  
**201 President Kennedy Avenue Suite PK-R220**  
**Montréal, QC H2X 3Y7, CA**

72 Inventor/es:  
**BÉLIVEAU, Richard;**  
**DEMEULE, Michel;**  
**CHÉ, Christian y**  
**REGINA, Anthony**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 383 901 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

Polipéptidos de aprotinina para transportar un compuesto a través de la barrera sangre-cerebro

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a mejoras en el campo del suministro de fármacos, particularmente la invención se refiere a un péptido de la presente invención.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

En el desarrollo de una nueva terapia para patologías del cerebro, la barrera sangre-cerebro (BBB – siglas en inglés) se considera un obstáculo principal para el potencial uso de fármacos para tratar trastornos del sistema nervioso central (SNC). El mercado global para fármacos del SNC fue de 33 billones de \$ en 1998, lo cual fue aproximadamente la mitad del mercado global de fármacos cardiovasculares, a pesar de que en los Estados Unidos de América la población que padece trastornos del SNC es casi el doble que la que padece enfermedades cardiovasculares. La razón de este desequilibrio es que más del 98% de todos los fármacos del SNC potenciales no atraviesan la barrera sangre-cerebro. Además, más del 99% del desarrollo de fármacos para el SNC en el mundo está dedicado únicamente al descubrimiento de fármacos para el SNC, y menos de 1% está dirigido al suministro de fármacos para el SNC. Esta relación podría explicar el motivo por el que actualmente no hay ningún tratamiento eficaz disponible para las enfermedades neurológicas principales tales como tumores cerebrales, Alzheimer y apoplejía.

El cerebro está protegido frente a sustancias potencialmente tóxicas por la presencia de dos sistemas de barrera: la barrera sangre-cerebro (BBB) y la barrera sangre-fluido cerebroespinal (BCSFB – siglas en inglés). La BBB se considera que es la vía principal para la absorción de ligandos del suero, dado que su superficie específica es aproximadamente 5000 veces mayor que la de la BCSFB. El endotelio del cerebro, que constituye la BBB, representa el obstáculo principal para el uso de fármacos potenciales frente a muchos trastornos del SNC. Como norma general, sólo moléculas lipofílicas menores que aproximadamente 500 Dalton pueden atravesar la BBB, es decir, de la sangre al cerebro. Sin embargo, es considerablemente mayor el tamaño de muchos fármacos que muestran resultados prometedores en estudios en animales para tratar trastornos del SNC. Así, productos terapéuticos de péptidos y proteínas están generalmente excluidos del transporte de la sangre al cerebro, debido a la despreciable permeabilidad de la pared del endotelio capilar del cerebro a estos fármacos. Células endoteliales capilares cerebrales (BCECs – siglas en inglés) están estrechamente selladas por fuertes uniones, poseen unas pocas ventanas y unas pocas vesículas endocíticas en comparación con capilares de otros órganos. Las BCECs están rodeadas por una matriz extracelular, astrocitos, pericitos y células microgliales. La estrecha asociación de células endoteliales con los procesos del pie de astrocitos y la membrana basal de los capilares son importantes para el desarrollo y el mantenimiento de las propiedades de la BBB que permiten un estrecho control del intercambio sangre-cerebro.

La publicación internacional WO 2004/060403 describe una invención realizada por los sus autores que se refiere a moléculas para transportar un fármaco a través de la barrera sangre-cerebro. Por lo demás, hasta la fecha no existe ningún enfoque eficaz para el suministro de fármacos disponible para el cerebro. Métodos actualmente bajo investigación para el suministro de fármacos de péptidos y proteínas al cerebro se pueden dividir en tres estrategias principales. En primer lugar, procesos invasivos incluyen la administración intraventricular directa de fármacos por medio de cirugía, y la interrupción temporal de la BBB a través de infusión intracarótida de disoluciones hiperosmolares. En segundo lugar, la estrategia basada en la farmacología consiste en facilitar el paso a través de la BBB al aumentar la solubilidad en lípidos de péptidos o proteínas. En tercer lugar, estrategias basadas en fisiología explotan los diversos mecanismos del vehículo en la BBB que han sido caracterizados en los últimos años. En este enfoque, los fármacos son fijados a un vector de proteínas que se comporta como un vehículo de suministro dirigido a receptores en la BBB. Este enfoque es muy específico y presenta una elevada eficacia con una flexibilidad extrema para indicaciones clínicas con objetivos ilimitados. Esta última estrategia ha sido y sigue siendo investigada por los autores de la invención, quienes idearon las moléculas descritas en la publicación antes mencionada y las de la presente invención.

La patente de EE.UU. nº 5.807.980 describe inhibidores derivados del inhibidor de la tripsina pancreática bovina (aprotinina), así como un método para su preparación y uso terapéutico. Estos péptidos se utilizan para el tratamiento de un estado caracterizado por una aparición o cantidad anormal de factor tisular y/o factor VIIIa tal como trombosis anormal.

La patente de EE.UU. nº 5.780.265 describe inhibidores de serina proteasa que son capaces de inhibir la calicreína del plasma.

La patente de EE.UU. nº 5.118.668 describe variantes del inhibidor de la tripsina pancreática bovina.

5 Sería muy deseable proporcionar moléculas mejoradas que puedan actuar como vehículos o vectores para transportar un compuesto o fármaco a través de la BBB de un individuo.

### COMPENDIO DE LA INVENCION

10 Un objetivo consiste en proporcionar una mejora en el sector del suministro de fármacos.

Otro objetivo consiste en proporcionar un método no invasivo y flexible y un soporte para transportar un compuesto o fármaco a través de la barrera sangre-cerebro de un individuo.

15 La presente solicitud describe nuevas moléculas que pueden ser capaces, por ejemplo, de transportar compuestos deseables a través de la barrera sangre-cerebro.

Se describe un polipéptido biológicamente activo que puede ser capaz de cruzar (es decir, atravesar) una capa de células mimetizante (que mimetiza) una barrera sangre-cerebro de mamíferos en un ensayo *in vitro*, pudiendo estar seleccionado el polipéptido, por ejemplo, del grupo de

- 20 - aprotinina (SEQ ID NO: 98),
- un análogo de aprotinina,
- un fragmento de aprotinina que puede comprender (o puede consistir esencialmente en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 1,
- 25 - un análogo biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1,
- un fragmento biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1, y
- un fragmento biológicamente activo de un análogo de la SEQ ID NO: 1.

La presente invención se refiere a un péptido con la secuencia TFFYGGSRGKRNNFKTEEY.

30 Se describe un polipéptido biológicamente activo que puede ser capaz de cruzar (es decir, atravesar) una capa de células mimetizante (que mimetiza) una barrera sangre-cerebro de mamíferos en un ensayo *in vitro*, pudiendo estar seleccionado el polipéptido, por ejemplo, del grupo de

- un fragmento de aprotinina que puede comprender la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 1,
- 35 - un análogo biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1,
- un fragmento biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1, y
- un fragmento biológicamente activo de un análogo de la SEQ ID NO: 1.

40 Un fragmento de aprotinina descrito puede consistir en la secuencia definida en la SEQ ID NO: 1. Se describe, además, un fragmento de aprotinina que puede comprender la SEQ ID NO: 1 y que puede tener una longitud de aproximadamente 19 aminoácidos hasta aproximadamente 54 aminoácidos, p. ej. de 10 a 50 aminoácidos de longitud, de 10 a 30 aminoácidos de longitud, etc.

45 El análogo biológicamente activo de SEQ ID NO: 1 puede tener una longitud de aproximadamente 19 aminoácidos a aproximadamente 54 aminoácidos (p. ej., que incluye, por ejemplo, 21 a 23, 25 a 34, 36 a 50 y 52 a 54) o de aproximadamente 19 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, o de aproximadamente 19 aminoácidos a aproximadamente 34 aminoácidos (p. ej., 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34), de aproximadamente 19 aminoácidos a aproximadamente 23 aminoácidos o de aproximadamente 19, 20, 21, 22, 23, 24, 35, 51 aminoácidos.

50 Un fragmento biológicamente activo de un polipéptido (p. ej. de 19 aminoácidos) descrito en esta memoria puede incluir, por ejemplo, un polipéptido de aproximadamente 7, 8, 9 ó 10 a 18 aminoácidos. Por lo tanto, un fragmento biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1 o de un análogo de la SEQ ID NO: 1 puede tener una longitud de aproximadamente 7 a aproximadamente 18 aminoácidos o de aproximadamente 10 a aproximadamente 18.

55 La patente de EE.UU. nº 5.807.980 describe un polipéptido que se identifica en esta memoria como SEQ ID NO: 102.

60 La patente de EE.UU. nº 5.780.265 describe un polipéptido que se identifica en esta memoria como SEQ ID NO: 103.

La secuencia de aminoácidos de aprotinina (SEQ ID NO: 98), la secuencia de aminoácidos Angiopep-1, así como

algunas secuencias de análogos biológicamente activos se pueden encontrar, por ejemplo, en la solicitud internacional nº PCT/CA2004/000011, publicada el 22 julio de 2004 bajo el nº de publicación internacional WO2004/060403. Adicionalmente, la publicación internacional WO04/060403 describe un polipéptido que se identifica en esta memoria como SEQ ID N: 104.

5

La patente de EE.UU. nº 5.118.668 describe polipéptidos que tienen la secuencia ilustrada en la SEQ ID NO: 105.

Ejemplos de análogos de aprotinina se pueden encontrar realizando una explosión de proteínas (Genbank: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) de la secuencia de aprotinina sintética (o una porción de la misma) descrita en la solicitud internacional nº PCT/CA2004/000011. Análogos de aprotinina a modo de ejemplo se pueden encontrar, por ejemplo, bajo los nºs de acceso CAA37967 (GI: 58005), 1405218C (GI: 3604747), etc.

10

Se describe un polipéptido biológicamente activo que puede ser capaz de cruzar (es decir, atravesar) una capa de células mimetizante (que mimetiza) una barrera sangre-cerebro de mamíferos en un ensayo *in vitro*, pudiendo estar seleccionado el polipéptido, por ejemplo, del grupo de

15

- un fragmento de aprotinina de 19 a 54 (p. ej. 19-50) aminoácidos de longitud que puede comprender la SEQ ID NO: 1,
- un fragmento de aprotinina que consiste en la SEQ ID NO: 1,
- un análogo biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1 de aproximadamente 19 a 50 aminoácidos de longitud, y
- un fragmento biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1 (de 10 a 18 aminoácidos) o un fragmento biológicamente activo de un análogo de la SEQ ID NO: 1 (de aproximadamente 10 a 18 aminoácidos).

20

Se describe un análogo biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1 que se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en

25

- un análogo de la SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos una identidad del 35% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- un análogo de la SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos una identidad del 40% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- un análogo de la SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos una identidad del 50% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- un análogo de la SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos una identidad del 60% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- un análogo de la SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos una identidad del 70% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- un análogo de la SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos una identidad del 80% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- un análogo de la SEQ ID NO: 1 que puede comprender al menos una identidad del 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- un análogo de la SEQ ID NO: 1 que puede comprender una identidad de al menos el 95% (es decir, 96%, 97%, 98%, 99% y 100%) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

30

35

40

El análogo biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1 de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en una secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 97.

45

Se describe un análogo biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1 que puede comprender la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 67 (es decir, el polipéptido nº 67 que es una versión amidada de SEQ ID NO: 67 (Angiopep-1)).

50

Los polipéptidos descritos pueden estar amidados, es decir, pueden tener una secuencia de aminoácidos amidada. Por ejemplo, el polipéptido de SEQ ID NO: 67 puede estar amidado (polipéptido nº 67).

Se describe un polipéptido biológicamente activo que puede ser capaz de cruzar (es decir, atravesar) una capa de células mimetizante (que mimetiza) una barrera sangre-cerebro de mamíferos en un ensayo *in vitro*, pudiendo estar seleccionado el polipéptido, por ejemplo, del grupo de

55

- un fragmento de aprotinina de 19 a 54 (p. ej. 19-50) aminoácidos de longitud que puede comprender la SEQ ID NO: 1,
- un fragmento de aprotinina que consiste en la SEQ ID NO: 1,
- un análogo biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1 de aproximadamente 19 a 50 aminoácidos de longitud, con la condición de que dicho análogo no comprenda la SEQ ID NO: 102, 103, 104 ó 105, y con la condición de que cuando dicho análogo consista en la SEQ ID NO: 67, dicho análogo

60

- esté amidado,
- un fragmento biológicamente activo de la SEQ ID NO: 1 de 10 a 18 aminoácidos, y
- un fragmento biológicamente activo de un análogo de la SEQ ID NO: 1 de aproximadamente 10 a 18 aminoácidos.

5 El fragmento biológicamente activo descrito de la SEQ ID NO: 1 o el fragmento biológicamente activo de un análogo de la SEQ ID NO:1 puede comprender al menos 9 o al menos 10 aminoácidos (consecutivos o contiguos) de la SEQ ID NO: 1 o del análogo de la SEQ ID NO: 1.

10 Los polipéptidos descritos pueden tener una secuencia de aminoácidos que puede comprender entre 1 y 12 sustituciones de aminoácidos (es decir, SEQ ID NO: 91). Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos puede oscilar entre 1 y 10 sustituciones de aminoácidos o entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos.

La sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución de aminoácidos no conservativa o una sustitución de aminoácidos conservativa.

15 Por ejemplo, cuando un polipéptido descrito comprende aminoácidos que son idénticos a los de la SEQ ID NO: 1 y otros aminoácidos que no son idénticos (no idénticos), aquellos que son no idénticos pueden ser una sustitución de aminoácidos conservativa. La comparación de aminoácidos idénticos y no idénticos se puede realizar observando una localización correspondiente.

20 Ejemplos de análogos de la SEQ ID NO: 1 que pueden tener al menos una identidad del 35% incluyen, por ejemplo, un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 91 (identidad de aproximadamente 36,8%, es decir, 7 aminoácidos de los 19 aminoácidos de la SEQ ID NO: 91 son idénticos a la SEQ ID NO:1), un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 25 98 (identidad de aproximadamente 68,4%, es decir, 13 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO: 1), un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 67 (identidad de aproximadamente 73,7%, es decir, 14 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO: 1), un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 76 (identidad de aproximadamente 73,7%, es decir, 14 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO: 1) y un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 30 5 (identidad de aproximadamente 79%, es decir, 15 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO: 1).

35 Ejemplos de análogos de la SEQ ID NO: 1 que pueden tener al menos una identidad del 60% incluyen, por ejemplo, un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 98 (identidad de aproximadamente 68,4%, es decir, 13 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO:1), un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 67 (identidad de aproximadamente 73,7%, es decir, 14 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO: 1), un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 76 (identidad de aproximadamente 73,7%, es decir, 14 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO: 1) y un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 40 5 (identidad de aproximadamente 79%, es decir, 15 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO: 1).

45 Ejemplos de análogos de la SEQ ID NO: 1 que pueden tener al menos una identidad del 70% incluyen, por ejemplo, un polipéptido que comprende (consiste en) la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 67 (identidad de aproximadamente 73,7%, es decir, 14 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO:1), SEQ ID NO: 76 (identidad de aproximadamente 73,7%, es decir, 14 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 5 (identidad de aproximadamente 79%, es decir, 15 aminoácidos de los 19 aminoácidos son idénticos a la SEQ ID NO: 1).

50 De acuerdo con la presente invención, el soporte se selecciona del grupo que consiste en el péptido 97 (es decir, SEQ ID NO: 97 (Angiopep-2)). El soporte se puede utilizar, por ejemplo, para transportar un agente fijado al mismo a través de una barrera sangre-cerebro. El soporte puede ser capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro después de la fijación al agente y, por lo tanto, puede ser capaz de transportar el agente a través de la barrera sangre-cerebro. 55

El péptido puede estar en una forma aislada o en una forma sustancialmente purificada.

60 Más particularmente, se describe un soporte para transportar un agente fijado al mismo a través de una barrera sangre-cerebro, en donde el soporte puede ser capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro después de la fijación al agente y, con ello, transportar el agente a través de la barrera sangre-cerebro. El soporte puede comprender al menos un polipéptido descrito (con la condición de que cuando dicho polipéptido o soporte consista en SEQ ID NO.

67, dicho polipéptido esté modificado por un grupo, p. ej. amidado). Por ejemplo, el soporte se puede seleccionar de una clase de moléculas relacionadas con aprotinina.

5 La actividad de transporte realizada por el soporte no afecta a la integridad de la barrera sangre-cerebro. El transporte de un agente puede resultar, por ejemplo, en el suministro del agente al sistema nervioso central (SNC) de un individuo.

10 Ha de entenderse en esta memoria que el péptido de la presente invención se puede sintetizar por vía química (p. ej., síntesis en fase sólida) o se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante. Codones que codifican aminoácidos específicos son bien conocidos en la técnica y se comentan, por ejemplo, en Biochemistry (tercera edición; 1988, Lubert Stryer, Stanford University, W. H. Freeman and Company, Nueva York). Por lo tanto, en esta memoria se describe una secuencia de nucleótidos que codifica un soporte de la presente invención. Más particularmente, se describen secuencias de nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o derivados de los mismos) que codifican un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 97. Una secuencia de nucleótidos a modo de ejemplo que codifica un análogo de aprotinina se ilustra en SEQ ID NO: 106 y puede encontrarse en Gene Bank bajo el número de acceso X04666. Esta secuencia que codifica un análogo de aprotinina con una lisina en la posición 16 (con referencia a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 106) en lugar de una valina según se encuentra en la SEQ ID NO: 98. Una mutación en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 106 se puede introducir por métodos conocidos en la técnica para modificar la producción del péptido de SEQ ID NO: 98 que tiene una valina en la posición 16. Se pueden utilizar técnicas conocidas en la técnica para introducir mutaciones adicionales en la secuencia de nucleótidos para codificar análogos de la presente invención. Se pueden obtener fragmentos a partir de esta secuencia de nucleótidos mediante digestión enzimática o reacción en cadena de la polimerasa, etc. Alternativamente, una secuencia de nucleótidos deseada se puede sintetizar por vía química por métodos conocidos en la técnica.

25 Se describe un conjugado que puede comprender un soporte que consiste en el péptido de la presente invención, y un agente seleccionado del grupo que consiste, por ejemplo, en un fármaco (p. ej., un fármaco de moléculas pequeñas, p. ej., un antibiótico), una medicina, un marcador detectable, una proteína (p. ej., una enzima), un compuesto basado en proteínas (p. ej., un complejo de proteínas que comprende un polipéptido o una cadena de polipéptidos) y un polipéptido (péptido). El agente puede ser, más particularmente, una molécula que sea activa al nivel del sistema nervioso central. El agente puede ser cualquier agente para tratar o detectar una enfermedad neurológica.

35 El soporte que es parte del conjugado se selecciona de un péptido con la secuencia TFFYGGSRGKRNNFKTEEY.

El agente puede tener un peso molecular máximo de aproximadamente 160.000 Dalton.

40 La actividad de transporte se puede efectuar mediante transcitosis mediada por el receptor o transcitosis mediada por adsorción. El agente puede ser uno capaz de ser transportado por un mecanismo de este tipo.

El conjugado puede estar en forma de una proteína de fusión que puede tener un primer resto que consiste esencialmente en el soporte de la presente invención, y un segundo resto que consiste esencialmente en una proteína o agente basado en proteínas.

45 Enfermedades neurológicas a modo de ejemplo que pueden ser tratadas o detectadas por parte del soporte y/o conjugado es una enfermedad seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en un tumor cerebral, una metástasis del cerebro, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, apoplejía y disfunciones relacionadas con la barrera sangre-cerebro (p.ej., obesidad).

50 La disfunción relacionada con la barrera sangre-cerebro es la obesidad. El agente que puede estar conjugado con el soporte de la presente invención puede ser una leptina. En el tratamiento de la obesidad se puede utilizar, por ejemplo, un conjugado que comprende una leptina y un soporte.

55 El marcador detectable puede ser un agente de formación de radiomágenes. Ejemplo de un marcador que puede estar conjugado con el soporte de la presente invención incluye, por ejemplo, y sin limitación a un isótopo, un marcador fluorescente (p. ej. rodamina), una molécula informadora (p. ej., biotina), etc. Otros ejemplos de marcadores detectables incluyen, por ejemplo, una proteína verde fluorescente, biotina, una proteína His-Tag y  $\beta$ -galactosidasa.

60 Un ejemplo de una proteína o de un compuesto basado en proteínas que se puede conjugar con el soporte de la presente invención incluye, sin limitación, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (p. ej., un fragmento de unión a un anticuerpo tal como un fragmento Fv, F(ab)<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub> y Fab, y similares), un fármaco peptídico o basado en

proteínas (p. ej., un modulador farmacológico positivo (agonista) o un inhibidor farmacológico (antagonista)), etc. Otros ejemplos de agentes incluyen toxinas celulares (p. ej., monometilauristatina E (MMAE), toxinas procedentes de endotoxinas y exotoxinas bacterianas; toxinas diftérica, toxinas botulínicas, toxinas tetánicas, toxinas pertussis, enterotoxinas de *Staphylococcus*, toxina del síndrome de choque tóxico TSST-1, toxina de adenilato ciclasa, toxina shiga, enterotoxina cólera, y otras), y compuestos anti-angiogénicos (endostatina, catequinas, nutricéuticos, quemoquina IP-10, inhibidores de metaloproteínasa de la matriz (MMPs), anastelina, vironectina, antitrombina, inhibidores de tirosina-quinasa, inhibidores de VEGF, anticuerpos contra receptores, herceptina, avastina y panitumumab, y otros).

El agente puede ser un fármaco de moléculas pequeñas tal como un fármaco anticancerígeno (p. ej., para tratar un tumor cerebral). Un fármaco anticancerígeno puede incluir, por ejemplo, un fármaco que tenga un grupo que permita su conjugación al soporte de la presente invención. Ejemplos de fármacos anticancerígenos incluyen, por ejemplo, un fármaco que puede seleccionarse del grupo que consiste en paclitaxel (Taxol), vinblastina, vincristina, etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida, taxotere, melfalán, clorambucilo, y cualquier combinación.

El conjugado descrito puede comprender la fórmula R-L-M o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde R es una clase de molécula relacionada con aprotinina (p. ej. aprotinina, fragmento de aprotinina, Angiopep-1, Angiopep-2, análogos, derivados o fragmentos). Por ejemplo, R puede ser un soporte seleccionado de una clase de moléculas relacionada con aprotinina, capaces de atravesar la barrera sangre-cerebro después de la fijación a L-M y, con ello, transportar M a través de la barrera sangre-cerebro. L puede ser un enlazador o un enlace (enlace químico). M puede ser un agente seleccionado del grupo que consiste en un fármaco (p. ej., un fármaco de moléculas pequeñas), una medicina, un marcador (detectable), una proteína o un compuesto basado en proteínas (p. ej., anticuerpo, un fragmento de anticuerpo), un antibiótico, un agente anticancerígeno, un compuesto anti-angiogénico y un polipéptido o cualquier molécula activa al nivel del sistema nervioso central. Ha de entenderse en esta memoria que la fórmula R-L-M no pretende quedar limitada a un orden específico o relación específica. Tal como se ejemplifica en esta memoria, M puede encontrarse en varias relaciones frente a R.

Por ejemplo, conjugados de fórmula R-L-M o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos se puede utilizar para transportar M a través de una barrera sangre-cerebro, en que R puede ser, por ejemplo, un soporte seleccionado del grupo que consiste en los péptidos n<sup>os</sup>: 5, 67, 76, 91 y 97 según se describe en esta memoria. El soporte puede ser capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro después de la fijación a L-M y, por lo tanto, puede transportar M a través de la barrera sangre-cerebro.

M puede ser un agente útil para tratar o diagnosticar una enfermedad neurológica.

Ha de entenderse en esta memoria que cuando están disponibles o presentes más de un sitio de conjugación con el soporte, más de un fármaco o molécula de fármaco se puede conjugar al soporte de la presente invención. Por lo tanto, el conjugado puede comprender una o más moléculas de fármacos. El conjugado puede ser activo por sí mismo, es decir, el fármaco puede ser activo incluso cuando se asocia con el soporte.

El compuesto puede o puede no ser liberado del soporte, es decir, generalmente después del transporte a través de la barrera sangre-cerebro. Por lo tanto, el compuesto puede ser liberable del conjugado (o del soporte) y puede convertirse en activo después de ello. Más particularmente, el agente puede ser liberable del soporte después del transporte a través de la barrera sangre-cerebro.

Se describe un conjugado para transportar un agente a través de una barrera sangre-cerebro, el conjugado puede comprender: (a) un soporte; y (b) un agente fijado al soporte, en donde el conjugado es capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro y, con ello, transportar el agente a través de la barrera sangre-cerebro.

Se describe el uso de un soporte de la presente invención para transportar un agente a través de una barrera sangre-cerebro de un mamífero que lo necesite.

Se describe el uso de una clase de moléculas relacionadas con aprotinina para transportar un compuesto fijado a las mismas a través de la barrera sangre-cerebro de un paciente.

Se describe el uso de un soporte o un conjugado según se describe en esta memoria para el diagnóstico de una enfermedad neurológica o una enfermedad del sistema nervioso central. Por ejemplo, el soporte o conjugado puede utilizarse para la detección *in vivo* de una enfermedad neurológica.

El soporte se selecciona de un péptido con la secuencia TFFYGGSRGKRNNFKTEEY.

Se describe el uso de una clase de moléculas relacionadas con aprotinina en la fabricación de un medicamento.

Se describe el uso de una clase de moléculas relacionadas con aprotinina en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad neurológica, o para tratar un trastorno del sistema nervioso central.

5 Se describe el uso de un soporte o conjugado descrito en esta memoria, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad del cerebro (una enfermedad asociada al cerebro) o una enfermedad neurológica, para el diagnóstico de una enfermedad del cerebro o enfermedad neurológica o para transportar un agente a través de la barrera sangre-cerebro.

10 Se describe el uso de un soporte o conjugado de la presente invención para tratar un mamífero que tiene, por ejemplo, una enfermedad neurológica o para el diagnóstico de una enfermedad neurológica en un mamífero que lo necesite.

15 Enfermedad neurológica incluye, por ejemplo, un tumor cerebral, una metástasis del cerebro, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, apoplejía y disfunciones relacionadas con la barrera sangre-cerebro.

20 Se describe un método para transportar un agente a través de la barrera sangre-cerebro de un mamífero (ser humano, animal), que puede comprender la etapa de administrar al mamífero un compuesto que comprende el agente fijado a una clase de moléculas relacionadas con aprotinina.

25 Se describe un método para tratar una enfermedad neurológica de un paciente, que comprende administrar al paciente un medicamento que comprende una clase de moléculas relacionadas con aprotinina, y un compuesto adaptado para tratar la enfermedad, estando fijado el compuesto a la clase de moléculas relacionadas con aprotinina.

30 Se describe un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central de un paciente, que comprende administrar al paciente un medicamento que comprende una clase de moléculas relacionadas con aprotinina, y un compuesto adaptado para tratar la enfermedad, estando fijado el compuesto a la aprotinina.

35 Se describe un método para transportar un agente a través de una barrera sangre-cerebro, que comprende la etapa de administrar a un individuo una composición farmacéutica descrita en esta memoria.

Se describe un método para tratar a un mamífero (p. ej. un paciente) que lo necesite (p. ej., un paciente con una enfermedad neurológica). El método puede comprender administrar un soporte de la presente invención al mamífero.

40 Se describe un método para (de) diagnosticar (es decir, un método de diagnóstico) una enfermedad neurológica en un mamífero (p. ej. un paciente) que lo necesite. El método puede comprender administrar un soporte de la presente invención al mamífero (individuo humano, paciente, animal).

45 La administración se puede realizar por vía intra-arterial, intranasal, intra-peritoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdermal o *per os*.

La composición farmacéutica puede administrarse al mamífero en una cantidad terapéuticamente eficaz.

50 Un mamífero en necesidad (individuo en necesidad) puede ser, por ejemplo, un mamífero que tenga o que esté en riesgo de tener una enfermedad neurológica, una enfermedad del sistema nervioso central, cáncer del cerebro, una metástasis del cerebro, etc.

55 Se describe una composición farmacéutica que comprende, por ejemplo:  
- un soporte de la presente invención;  
y  
- un soporte farmacéuticamente aceptable, p. ej. un excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 La composición farmacéutica puede utilizarse, por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad neurológica.

La composición farmacéutica puede utilizarse, por ejemplo, para el diagnóstico de una enfermedad neurológica.

65 La composición farmacéutica puede utilizarse, por ejemplo, para transportar un agente a través de una barrera sangre-cerebro.

La composición farmacéutica puede utilizarse, por ejemplo, para el suministro de un agente al SNC de un individuo.

La composición farmacéutica puede utilizarse, por ejemplo, para tratar un trastorno del sistema nervioso central de un mamífero que lo necesite.

5 La composición farmacéutica puede utilizarse para suministrar un agente al SNC de un individuo.

Ha de entenderse en esta memoria que se describen sales farmacéuticamente aceptables de un soporte (polipéptido) o de un conjugado.

10 Así, la composición (composición farmacéutica) puede comprender un medicamento fabricado según se describe en esta memoria, en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Para los fines de la presente invención, los términos o expresiones siguientes se definen a continuación.

15 El término “soporte” o “vector” pretende dar a entender un compuesto o molécula tal como un polipéptido que sea capaz de transportar un compuesto. Por ejemplo, el transporte puede producirse a través de la barrera sangre-cerebro. El soporte puede fijarse (de forma covalente o no) o conjugarse a otro compuesto o agente y, con ello, puede ser capaz de transportar al otro compuesto o agente a través de la barrera sangre-cerebro. Por ejemplo, el soporte puede unirse a receptores presentes en las células endoteliales del cerebro y, con ello, transportarse a través de la barrera sangre-cerebro mediante transcitosis. El soporte puede ser una molécula para la cual se puedan obtener altos niveles de transporte transendotelial, sin afectar la integridad de la barrera sangre-cerebro. El soporte es un péptido y puede producirse de forma natural o producirse mediante síntesis química o tecnología genética recombinante (ingeniería genética).

25 El término “conjugado” pretende dar a entender una combinación de un soporte y otro compuesto o agente. La conjugación puede ser de naturaleza química tal como a través de un enlazador, o de naturaleza genética, por ejemplo mediante tecnología genética recombinante tal como en una proteína de fusión, por ejemplo con una molécula informadora (p. ej. proteína fluorescente verde,  $\beta$ -galactosidasa, His-Tag, etc.).

30 La expresión “fármaco de moléculas pequeñas” pretende dar a entender un fármaco con un peso molecular de 1000 g/mol o menor.

Los términos “tratamiento”, “tratar” y similares pretenden dar a entender la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, p. ej. inhibición del crecimiento de células cancerígenas, la muerte de una célula cancerígena o la mejoría de una enfermedad o afección neurológica. El efecto puede ser profiláctico, en términos de prevenir de forma completa o parcial una enfermedad o síntoma de la misma, y/o puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento” tal como se utiliza en esta memoria, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca una enfermedad o afección (p. ej., prevenir el cáncer) en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que no ha sido todavía diagnosticado de tenerla; (b) inhibir una enfermedad (p. ej., detener su desarrollo); o (c) aliviar una enfermedad (p. ej., reducir los síntomas asociados con una enfermedad). “Tratamiento” tal como se utiliza en esta memoria, cubre cualquier administración de un agente o compuesto farmacéutico a un individuo para tratar, curar, aliviar, mejorar, disminuir o inhibir una afección en el individuo que incluye, sin limitación, administrar un conjugado de soporte-agente a un individuo.

45 El término “cáncer” pretende dar a entender cualquier malignidad celular, cuyo rasgo único es la pérdida de controles normales, lo que resulta en un crecimiento desregulado, carencia de diferenciación y capacidad de invadir tejidos locales de y de metastasizarse. El cáncer se puede desarrollar en cualquier tejido de cualquier órgano. Más específicamente, cáncer pretende incluir, sin limitación, cáncer del cerebro.

50 El término “administrar” y “administración” pretende dar a entender un modo de suministro que incluye, sin limitación, la vía intra-arterial, intra-nasal, intra-peritoneal, intravenosa, intramuscular, sub-cutánea, transdermal o *per os*. Una dosificación diaria se puede dividir en una, dos o más dosis en una forma adecuada a administrar de una, dos, o más veces en un período de tiempo.

55 La expresión “terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” pretende dar a entender una cantidad de un compuesto suficiente mejorar sustancialmente algún síntoma asociado con una enfermedad o una afección médica. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer o de una afección mental o neurológica o enfermedad del SNC, sería terapéuticamente eficaz un agente o compuesto que disminuya, prevenga, retarde, suprima o detenga cualquier síntoma de la enfermedad o afección. No se requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o compuesto para curar una enfermedad o afección, pero proporcionará un tratamiento para una enfermedad o afección tal que se retarda, impide o previene el brote de la enfermedad o afección, o se mejora la enfermedad o los

síntomas de la afección, o se cambia el término de la enfermedad o afección o, por ejemplo, es menos grave o se acelera la recuperación en un individuo.

5 El soporte de la presente invención se puede utilizar en combinación con cualesquiera métodos convencionales de tratamiento y/o terapia, o se puede utilizar por separado de métodos convencionales de tratamiento y/o terapia.

10 Cuando los conjugados descritos se administran en terapias de combinación con otros agentes, éstos se pueden administrar secuencial o concurrentemente a un individuo. Alternativamente, composiciones farmacéuticas pueden estar constituidas por una combinación de un conjugado de soporte-agente descrito en esta memoria en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como se describe en esta memoria, y otro agente terapéutico o profiláctico conocido en la técnica.

15 Sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables se pueden preparar por métodos conocidos y utilizados en la técnica.

20 La expresión “derivado funcional” pretende dar a entender un “derivado químico”, “fragmento” o “variante” de una secuencia o porción biológicamente activa de un soporte o agente o conjugado y una sal del mismo descritos en esta memoria. Un derivado funcional de un soporte puede ser capaz de ser fijado a o conjugado a otro compuesto o agente y atravesar la barrera sangre-cerebro y, con ello, ser capaz de transportar el otro compuesto o agente a través de la barrera sangre-cerebro.

25 La expresión “derivado químico” pretende dar a entender un soporte, un agente o un conjugado descrito en esta memoria, que contiene restos químicos adicionales que no son parte del soporte, agente o conjugado soporte-agente. Dentro del alcance de esta invención están incluidas modificaciones covalentes. Un derivado químico puede prepararse convenientemente mediante síntesis química directa utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Modificaciones de este tipo se pueden introducir, por ejemplo, en un soporte de proteína o péptido, agente o conjugado soporte-agente, haciendo reaccionar restos aminoácidos fijados como objetivo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados. Un derivado químico de soporte es capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro y fijarse a o conjugarse a otro compuesto o agente y, con ello, es capaz de transportar el otro compuesto o agente a través de la barrera sangre-cerebro. Se pueden obtener niveles muy elevados de transporte transendotelial a través de la barrera sangre-cerebro sin efectos algunos sobre la integridad de la barrera sangre-cerebro.

35 El término “agente” pretende dar a entender, sin distinción, un anticuerpo, un fármaco (tal como un fármaco medicinal) o un compuesto tal como un agente o un compuesto terapéutico, un marcador, un trazador o un compuesto formador de imágenes.

40 La expresión “agente terapéutico” o “agente” pretende dar a entender un agente y/o medicina y/o fármaco utilizado para tratar los síntomas de una enfermedad, afección física o mental, lesión o infección e incluye, pero no se limita a antibióticos, agentes anticancerígenos, agentes anti-angiogénicos y moléculas activas al nivel del sistema nervioso central. Paclitaxel, por ejemplo, se puede administrar por vía intravenosa para tratar cáncer de cerebro.

45 El término “afección” pretende dar a entender cualquier situación que cause dolor, desasosiego, malestar, enfermedad o discapacidad (mental o física) a o en un individuo, incluida enfermedad, lesión, infección neurológica o dolor crónico o agudo. Enfermedades neurológicas que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a tumores cerebrales, metástasis del cerebro, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y apoplejía.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, “composición farmacéutica” significa cantidades terapéuticamente eficaces del agente junto diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o soportes farmacéuticamente aceptables. Una “cantidad terapéuticamente eficaz”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y régimen de administración dados. Composiciones de este tipo son líquidas o formulaciones liofilizadas o secadas de otro modo, e incluyen diluyentes de un contenido en diversos tampones (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y resistencia iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para prevenir la absorción a superficies, detergentes (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares). Agentes solubilizantes (p. ej., glicerol, polietilen-glicerol), anti-oxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (p. ej., timerosal, alcohol bencílico, parabeno), sustancias conferidoras de consistencia o modificadores de la tonicidad (p. ej., lactosa, manitol), fijación covalente de polímeros tales como polietilenglicol a la proteína, formación de complejos con iones de metales o incorporación del material en o sobre preparados en partículas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos. Composiciones de este tipo influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, tasa de liberación in vivo y tasa de

5 aclaramiento in vivo. Composiciones de liberación controlada o retardada incluyen la formulación en depósitos lipofílicos (p. ej., ácidos grasos, ceras, aceites). También están comprendidas por la invención composiciones en partículas revestidas con polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas). También se describen revestimientos protectores de formas en partículas, inhibidores de proteasa o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluidas las vías parenteral, pulmonar, nasal, oral, vaginal, rectal.

La composición farmacéutica se puede administrar por vía parenteral, paracanceral, transmucosal, transdermal, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal e intratumoral.

10 Además, tal como se utiliza en esta memoria “soporte farmacéuticamente aceptable” o “soporte farmacéutico” son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a tampón fosfato 0,01-0,1 M o 0,05 M, o solución salina al 0,8%. Adicionalmente, soportes farmacéuticamente aceptables de este tipo pueden ser disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Soportes acuosos  
15 incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidas solución salina y medios tamponados. Vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, aceites de Ringer o fijados lactados. Vehículos intravenosos incluyen agentes de reposición de fluidos y nutrientes, agentes de reposición de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos,  
20 antioxidantes, agentes de clasificación, gases inertes y similares.

Un “análogo” ha de entenderse en esta memoria como un polipéptido que procede de una secuencia original o de una parte de una secuencia original y que puede comprender una o más modificaciones; por ejemplo, una o más  
25 modificaciones en la secuencia de aminoácidos (p. ej., una delección, inserción, sustitución, etc. de aminoácidos), una o más modificaciones en la cadena principal o cadena lateral de uno o más aminoácidos, o una adición de un grupo u otra molécula a uno o más aminoácidos (cadenas laterales o cadena principal). Un “análogo” ha de entenderse, por lo tanto, en esta memoria como una molécula con una actividad biológica y estructura química (o una parte de su estructura) similar a la de un polipéptido descrito en esta memoria. Un análogo comprende un polipéptido que puede tener, por ejemplo, uno o más inserciones de aminoácidos, ya sea en uno o en los dos extremos del polipéptido y/o  
30 dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Un “análogo” puede tener una similitud de secuencia y/o identidad de secuencia con la de una secuencia original o una parte de una secuencia original, y también puede tener una modificación de su estructura según se discute en esta memoria. El grado de similitud entre dos secuencias se basa en porcentaje de identidades (aminoácidos  
35 idénticos) y de una sustitución conservativa.

La similitud o identidad se puede comparar, por ejemplo, frente a una región de 2, 3, 4, 5, 10, 19, 20 aminoácidos o más (y cualquier número entre ellos). La identidad puede incluir en esta memoria aminoácidos que son idénticos al péptido original y que pueden ocupar la misma posición o similar cuando se comparan con el polipéptido original. Un  
40 análogo que tiene, por ejemplo, una identidad del 50% con un polipéptido original puede incluir, por ejemplo, un análogo que comprende el 50% de la secuencia de aminoácidos del polipéptido original y una similitud con los otros porcentajes. Ha de entenderse en esta memoria que pueden encontrarse huecos entre los aminoácidos de análogos que son idénticos o similares a aminoácidos del péptido original. Los huecos pueden no incluir aminoácido alguno, uno o más aminoácidos que no son idénticos o similares al péptido original. Se describen en esta memoria análogos biológicamente activos de los soportes (polipéptidos) de la presente invención.  
45

El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, con n algoritmos GAP, BESTFIT, o FASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics Release 7.0, utilizando pesos de huecos por defecto.

50 Por ejemplo, un análogo descrito puede comprender o tener una identidad del 50% con una secuencia de aminoácidos original, y una parte de los aminoácidos restantes que ocupa una posición similar puede ser, por ejemplo, una sustitución de aminoácidos no conservativa o conservativa.

Por lo tanto, se describen análogos que pueden tener al menos una similitud de la secuencia del 90% con una  
55 secuencia original o una parte de una secuencia original. Un “análogo” puede tener, por ejemplo, una similitud de la secuencia de al menos 35%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% (96%, 97%, 98%, 99% y 100%) con una secuencia original o una parte de una secuencia original. También un “análogo” puede tener, por ejemplo, una similitud de la secuencia de al menos 35%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% (96%, 97%, 98%, 99% y 100%) con una secuencia original con una combinación de una o más modificaciones en una cadena principal o cadena lateral de un  
60 aminoácido, o una adición de un grupo u otra molécula, etc. Aminoácidos a modo de ejemplo que pretenden ser similares (un aminoácido conservativo) a otros son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los listados en la Tabla 1.

- Análogos descritos comprenden también aquellos que pueden tener al menos una identidad de la secuencia de al menos 35%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% (96%, 97%, 98%, 99% y 100%) con una secuencia original o una parte de una secuencia original. También un "análogo" puede tener, por ejemplo, una
- 5 identidad (de la secuencia) de 35%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% con una secuencia original (es decir, un análogo que es al menos un 35%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% idéntico a un péptido original) con una combinación de una o más modificaciones en una cadena principal o cadena lateral de un aminoácido, o una adición de un grupo u otra molécula, etc.
- 10 Un "fragmento" ha de entenderse en esta memoria como un polipéptido que procede de una parte de una secuencia original o parental o de un análogo de dicha secuencia parental. Fragmentos comprenden polipéptidos con truncamientos de uno o más aminoácidos, en donde el truncamiento puede proceder del extremo amino (extremo N), del extremo carboxi (extremo C) o del interior de la proteína. Un fragmento puede comprender la misma secuencia que la parte correspondiente de la secuencia original.
- 15 Así, se describen en esta memoria polipéptidos biológicamente activos en forma de los polipéptidos originales, fragmentos (modificados o no), análogos (modificados o no), derivados (modificados o no), homólogos (modificados o no) del soporte.
- 20 Por lo tanto, se describe cualquier polipéptido con una modificación en comparación con un polipéptido original que no destruya significativamente una actividad biológica deseada. Es bien conocido en la técnica que se puede realizar un cierto número de modificaciones a los polipéptidos de la presente invención, sin afectar de manera perjudicial a su actividad biológica. Por otra parte, estas modificaciones pueden mantener o incrementar la actividad biológica del polipéptido original o pueden optimizar una o más de las particularidades (p. ej., estabilidad, biodisponibilidad, etc.)
- 25 de los polipéptidos. En algunos casos puede ser necesario o deseable. Polipéptidos descritos comprenden, por ejemplo, los que contienen las secuencias de aminoácidos modificadas por procesos naturales tales como tratamiento post-traducción, o mediante técnicas de modificación química que son conocidas en la técnica. Se pueden producir modificaciones en cualquier lugar en un polipéptido que incluye la cadena principal del polipéptido, las cadenas laterales de aminoácidos y el extremo amino o carboxi. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o en grados variables en varios sitios en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de una ubicuidad y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Polipéptidos cíclicos, ramificados y ramificados cíclicos pueden resultar de procesos naturales post-traducción o pueden producirse por métodos sintéticos. Modificaciones comprenden, por ejemplo, sin limitación, pegilación, acetilación, acilación, adición de un
- 35 grupo acetomidometilo (Acm), ribosilación de ADP, alquilación, amidación, biotinilación, carbamoilación, carboxietilación, esterificación, fijación covalente a flavina, fijación covalente a un resto hemo, fijación covalente de un nucleótido o derivados de nucleótido, fijación covalente de fármacos, fijación covalente de un marcador (p. ej., fluorescente, radiactivo, etc.), fijación covalente de un lípido o derivado lipídico, fijación covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de ancla GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, tratamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación, adición, mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubicuidad, etc.
- 40 Tal como se discute arriba, las modificaciones de polipéptidos pueden comprender, por ejemplo, inserción de aminoácidos (es decir, adición), delección y sustitución (es decir, reemplazo), ya sea de forma conservativa o no conservativa (p. ej., D-aminoácidos, desaminoácidos) en la secuencia del polipéptido en donde cambios de este tipo no alteran sustancialmente la actividad biológica global del polipéptido.
- 45 Ejemplos de sustituciones pueden ser aquellas que son conservativas (es decir, en donde un residuo es reemplazado por otro del mismo tipo o grupo general) o cuando se desea, no conservativas (es decir, en donde un residuo es reemplazado por un aminoácido de otro tipo). Además, un aminoácido que se produce de forma natural puede ser sustituido por un aminoácido que se produce de forma no natural (es decir, sustitución de aminoácidos conservativa que se produce de forma no natural o una sustitución de aminoácidos no conservativa que se produce
- 50 de forma no natural).
- 55 Tal como se entiende, aminoácidos que se producen de forma natural se pueden sub-clasificar como de carácter ácido, básico, neutro y no polar. Además, tres de los aminoácidos codificados son aromáticos. Puede ser útil que los polipéptidos codificados que difieren del polipéptido descrito determinado contengan codones sustituidos para aminoácidos que son del mismo tipo o grupo que los del aminoácido a reemplazar. Así, en algunos casos, los aminoácidos de carácter básico Lys, Arg y His pueden ser intercambiables; los aminoácidos de carácter ácido Asp y Glu pueden ser intercambiables; los aminoácidos neutros polares Ser, Thr, Cys, Gln y Asn pueden ser
- 60

intercambiables; los aminoácidos alifáticos no polares Gly, Ala, Val, Ile y Leu son intercambiables pero, debido al tamaño, Gly y Ala están más estrechamente relacionados, y Val, Ile y Leu están más estrechamente relacionados uno con otro, y los aminoácidos de carácter aromático Phe, Trp y Tyr pueden ser intercambiables.

5 Debe señalarse, además, que si los polipéptidos se preparan de modo sintético, también se pueden realizar sustituciones por aminoácidos que no son codificados de forma natural por ADN (aminoácidos que no se producen de forma natural o no naturales).

10 Un aminoácido que se produce de forma no natural ha de entenderse en esta memoria como un aminoácido que no se produce o encuentra en un mamífero de forma natural. Un aminoácido que se produce de forma no natural comprende un D- aminoácido, un aminoácido con un grupo acetilaminometilo fijado a un átomo de azufre de una cisteína, un aminoácido pegilado, etc. La inclusión de un aminoácido que se produce de forma no natural en una secuencia de polipéptidos definida generará, por lo tanto, un derivado del polipéptido original. Aminoácidos (residuos) que se producen de forma no natural incluyen también los aminoácidos omega de la fórmula  
15  $NH_2(CH_2)_nCOOH$ , en donde n es 2-6, aminoácidos neutros no polares tales como sarcosina, t-butil-alanina, t-butil-glicina, N-metil-isoleucina, norleucina, etc. Trp, Tyr o Phe pueden sustituir a fenilglicina; citrulina y sulfóxido de metionina son neutros no polares, el ácido cisteico es de carácter ácido, y ornitina es de carácter básico. Prolina puede estar sustituida con hidroxiprolina y puede conservar las propiedades conferidoras de la conformación.

20 Se conoce en la técnica que se pueden generar análogos mediante mutagénesis sustitucional y se puede conservar la actividad biológica de los polipéptidos descritos. Estos análogos tienen al menos un residuo aminoácido en la molécula de la proteína separada y un residuo diferente insertado en su lugar. Ejemplos de sustituciones identificadas como "sustituciones conservativas" se muestran en la Tabla 1. Si sustituciones de este tipo resultan en un cambio no deseado, entonces se introducen otro tipo de sustituciones, denominadas "sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente en esta memoria con referencia a clases de aminoácidos, y se rastrean los productos.

30 En algunos casos puede ser interesante modificar la actividad biológica de un polipéptido mediante sustitución, inserción o delección de aminoácidos. Por ejemplo, la modificación de un polipéptido puede resultar en un incremento de la actividad biológica del polipéptido, puede modular su toxicidad, puede resultar en cambios en la biodisponibilidad o en la estabilidad, o puede modular su actividad inmunológica o identidad inmunológica. Modificaciones sustanciales en la función o la identidad inmunológica se consiguen seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto al mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo como una conformación laminar o helicoidal, (b) el cambio o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Residuos que se producen de forma natural se dividen en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 40 (1) hidrofóbicos: norleucina, metionina (Met), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), histidina (His), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe)  
 (2) hidrofílicos neutros: cisteína (Cys), serina (Ser), treonina (Thr)  
 (3) de carácter ácido/cargados negativamente: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu)  
 (4) de carácter básico: asparagina (Asn), glutamina (Gln), histidina (His), lisina (Lys), arginina (Arg)  
 (5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: glicina (Gly), prolina (Pro)  
 (6) aromáticos: triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His)  
 45 (7) polares: Ser, Thr, Asn, Gln  
 (8) de carácter básico cargados positivamente: Arg, Lys, His, y  
 (9) cargados: Asp, Glu, Arg, Lys, His

50 Sustituciones no conservativas supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otro. Una sustitución conservativa supondrá intercambiar un miembro de uno de estos grupos por otro miembro de estos grupos. Alternativamente, en la Tabla 1 se listan otras sustituciones de aminoácidos conservativas.

Tabla 1. Sustitución de aminoácido

Residuo original	Sustitución a modo de ejemplo	Sustitución conservativa
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro

His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu

Un análogo biológicamente activo puede ser, por ejemplo, un análogo que tenga al menos una sustitución de aminoácidos (es decir, no conservativa o conservativa) en la secuencia original. Un análogo biológicamente activo también puede ser, por ejemplo, un análogo que tenga una inserción de uno o más aminoácidos.

5

Otros análogos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo:

- un análogo de la SEQ ID NO: 1 que puede tener la fórmula I:  $X_1$ -SEQ ID NO: 1- $X_2$

- un análogo de Angiopep-1 que puede tener la fórmula II:  $X_1$ -Angiopep- 1- $X_2$  y

- un análogo de Angiopep-2 que puede tener la fórmula III:  $X_1$ -Angiopep-2- $X_2$

10

$X_1$  y  $X_2$  pueden ser, independientemente, una secuencia de aminoácidos entre 0 y aproximadamente 100 (p. ej., entre 0 y aproximadamente 30 a 50) aminoácidos.  $X_1$  y  $X_2$  se pueden derivar de aminoácidos consecutivos de aprotinina o análogos de aprotinina (secuencia de aminoácidos homóloga) o puede ser cualquier otra secuencia de aminoácidos (secuencia de aminoácidos heteróloga). Un compuesto de la fórmula I, II o III también puede comprender una sustitución, delección o inserción de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de Angiopep-1, Angiopep-2 o SEQ ID NO. 1. Sin embargo, el análogo será preferiblemente biológicamente activo según se determina por uno de los ensayos descritos en esta memoria o por cualquier ensayo similar o equivalente.

15

Un polipéptido biológicamente activo (p. ej. soporte) se puede identificar utilizando uno de los ensayos o métodos descritos en esta memoria. Por ejemplo, un soporte candidato se puede producir por síntesis de péptidos convencional, conjugar con Taxol según se describe en esta memoria y someter a ensayo en un modelo *in vivo* según se describe en esta memoria. Un soporte biológicamente activo se puede identificar, por ejemplo, en base a su eficacia para aumentar la supervivencia de un animal al que se le han inyectado células tumorales y se ha tratado con el conjugado en comparación con un control que no ha sido tratado con un conjugado. También, un soporte biológicamente activo se puede identificar en base a su localización en el parénquima en un ensayo de perfusión cerebral *in situ*.

20

25

### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

30 Fig. 1 ilustra un ejemplo de un análisis utilizando geles de tricina;

Fig. 2 ilustra el método de fijación del soporte de la presente invención a paclitaxel;

35 Fig. 3 ilustra el efecto del tratamiento del modelo de glioblastoma en ratas Lewis con paclitaxel conjugado a aprotinina.

Fig. 4 ilustra el efecto del tratamiento del modelo glioblastoma en ratones inmunodeficientes con paclitaxel conjugado a Angiopep-1;

40 Fig. 5 ilustra el protocolo utilizado para conjugar aprotinina con IgG utilizando el agente reticulante BS<sup>3</sup>,

Fig. 6 ilustra el protocolo utilizado para conjugar aprotinina con IgG utilizando el agente reticulante sulfo-EMCS;

Fig. 7 ilustra la penetración en el cerebro para conjugados de IgG-aprotinina;

45

Fig. 8 ilustra el efecto del tratamiento del conjugado de Taxol-Angiopep-2 sobre la supervivencia de ratones a los que se les ha implantado glioblastoma (atímicos, ratones inmunodeficientes) y;

Fig. 9 ilustra la estructura de polipéptidos a modo de ejemplo de la presente invención.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a una molécula que puede actuar como vectores o soportes para transportar un agente, medicina u otra molécula al cerebro y/o sistema nervioso central (SNC). Agentes, medicinas u otras moléculas que son incapaces o ineficaces para atravesar la barrera sangre-cerebro por sí mismos, serán transportados a través de la barrera sangre-cerebro cuando se fijan o acoplan (conjugan) al vector o soporte. Alternativamente, un agente que es capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro por sí mismo también puede ver aumentado su transporte cuando se conjuga al soporte de la presente invención. Conjugados de este tipo pueden estar en forma de una composición tal como una composición farmacéutica, para el tratamiento de una afección o enfermedad.

Diseño de moléculas candidato como vectores de soporte

15 En la publicación internacional nº WO 2004/060403, los autores de la invención han descrito que AngioPep-1 (SEQ ID NO: 67), y aprotinina (SEQ ID NO: 98) son vectores eficaces para transportar moléculas deseables a través de la barrera sangre-cerebro. Los autores de la presente invención demuestran también podrían utilizarse otras moléculas como soportes para transportar un agente a través de la barrera sangre-cerebro. Por consiguiente, péptidos con dominios similares que aprotinina y Angiopep-1 y una forma modificada de Angiopep-1 (amidada, péptido nº 67) fueron concebidos, por lo tanto, como potenciales vectores de soporte. Estos péptidos derivados se asemejan a aprotinina y Angiopep-1, pero comprenden diferentes inserciones de aminoácidos y portan diferentes cambios. Hasta ahora, 96 péptidos presentados en la Tabla 2 así como péptidos adicionales listados en el listado de secuencias fueron sometidos a ensayo en cuanto a su potencial como soporte.

20

25 Ha de entenderse en esta memoria que en los experimentos que siguen, los péptidos han sido seleccionados en base a su mayor actividad en comparación con otros.

**Tabla 2** Diseño de 96 péptidos de dominios similares a aprotinina y a Angiopep-1 con diferentes cargas e inserciones de aminoácidos

		96 PÉPTIDOS SOLICITADOS A SYNPEP (California, EE.UU.)																							
		#Pep	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Proteínas Aprot-sinl. Blaunin HI-30 Amaloide Inhibido de Kunitz 1 Péptidos CARGA (+6)	Características	1	T	F	V	Q	F	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
		2	T	F	F	F	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
		3	P	F	F	F	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
		4	S	F	F	F	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
		5	T	F	F	F	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
		6	T	F	F	F	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
		7	T	F	F	F	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
		8	T	F	F	F	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
		9	T	F	F	Q	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
		10	T	F	F	Q	Y	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
CARGA (+5)		11	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	K	R	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		12	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	K	R	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		13	P	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	K	R	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		14	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	K	R	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		15	P	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	K	R	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		16	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	K	R	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		17	P	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	K	R	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		18	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	K	R	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
CARGA (+4)		19	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	R	A	A	K	Y	
		20	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	R	A	A	K	Y	
		21	P	F	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	R	A	A	K	Y	
		22	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	R	A	A	K	Y	
		23	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	R	A	A	K	Y	
		24	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	R	A	A	K	Y	
CARGA (+3)		25	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	R	A	A	K	Y	
		26	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	N	G	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		27	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	N	G	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		28	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	N	G	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		29	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	N	G	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		30	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	N	G	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		31	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	N	G	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
CARGA (+2)		32	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	N	G	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		33	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	G	G	N	G	N	N	F	K	R	A	A	K	Y	
		34	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	A	A	K	Y	
		35	P	F	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	A	A	K	Y	
		36	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	A	A	K	Y	
		37	S	F	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	A	A	K	Y	
		38	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	A	A	K	Y	
CARGA (+1)	HUMANO	39	T	F	F	F	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	V	R	R	R	K	Y	
	HUMANO	40	T	F	F	F	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	V	R	R	R	K	Y	
	HUMANO	41	P	F	F	F	Y	G	G	C	L	L	G	N	G	N	N	F	V	V	R	R	R	K	
	HUMANO	42	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	L	G	N	G	N	N	F	V	V	R	R	R	K	
	HUMANO	43	T	F	F	F	Y	G	G	C	L	L	G	N	G	N	N	F	V	V	R	R	R	K	
		44	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	G	N	G	N	N	F	L	T	A	A	K	Y	
		45	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	G	N	G	N	N	F	L	T	A	A	K	Y	
CARGA (+0)		46	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
		47	P	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
		48	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
		49	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
	HUMANO	50	P	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
	HUMANO	51	S	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
	HUMANO	52	P	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
	HUMANO	53	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
	HUMANO	54	S	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
	HUMANO	55	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	N	F	L	T	A	A	A	K	Y	
APROTININA FRENTE A APROTININA TÉRMINO M (1 hélice α, término A) (2 hélices β, término Y) (1 α, 1 β)		56	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	L	G	N	G	N	N	F	V	T	S	R	R	Y	
		57	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	L	G	N	G	N	N	F	V	T	S	R	R	Y	
		58	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	L	G	N	G	N	N	F	V	T	S	R	R	Y	
		59	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	L	G	N	G	N	N	F	V	T	S	R	R	Y	
ANGIOPEP AngioPep-1 AngioPEP1 (disina) AngioPEP (4Y) puente cys cys-N-terminal cys-C-terminal cys-N-terminal cys-C-terminal pro carga (+3) carga (+3)-cys carga (+4) carga (+4)-cys carga (+5) carga (+6) carga (+7) carga (0) permut (+4) permut cys(+) carga (-4) Q en lugar de F mezcla de ANGIOPEP		60	K	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	G	K	R	N	N	F	K	K	Y	E	E	Y	
		61	P	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	G	K	R	N	N	F	K	K	Y	E	E	Y	
		62	P	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	G	K	R	N	N	F	K	K	Y	E	E	Y	
		63	H	R	P	D	F	C	L	E	Y	P	A	N	Y	T	A	G	P	L	V	Q	D	R	
		64	A	R	I	I	R	A	K	P	P	N	N	Y	T	A	G	P	L	V	Q	D	R		
		65	Y	G	F	C	L	E	R	A	K	P	P	N	Y	T	A	G	P	L	V	Q	D	R	
		66	P	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	L	L	R	R	R	
		67	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	L	L	R	R	R	
		68	K	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	L	L	R	R	R	
		69	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	L	L	R	R	R	
	70	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	L	L	R	R	R		
TFPI TFPI (dominio simlar) carga +5 (HUMANO) carga +5 (HUMANO) TFPI (C-terminal) (2Y) TFPI (C-terminal truncado)		71	C	T	F	F	Y	G	G	C	R	R	G	K	R	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y	
		72	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
		73	C	T	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
		74	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
		75	P	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
		76	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
		77	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
		78	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
		79	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
		80	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
Péptidos Básicos	SynB1	81	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
	SynB3	82	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
	Penetratina (pAntp43-68)	83	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
		84	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y
	85	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y	
	86	T	F	F	F	Y	G	G	C	R	R	L	G	N	G	N	N	F	F	K	Y	E	E	Y	
	87	T	F	F	F	Y	G	G	C																

Selección con un modelo *in vitro*

Se utilizó un modelo *in vitro* para el ensayo de rastreo y para estudios mecanísticos del transporte de fármacos al cerebro. Este eficaz modelo *in vitro* de la barrera sangre-cerebro fue desarrollado por la compañía CELLIAL™ Technologies. Al proporcionar resultados reproducibles, el modelo *in vitro* se utilizó para evaluar la capacidad de diferentes soportes de alcanzar el cerebro. El modelo consiste en un co-cultivo de células endoteliales capilares del cerebro bovinas y células glia de rata. Presenta rasgos ultra-estructurales característicos del endotelio del cerebro, incluidas uniones estrechas, carencia de fenestración, carencia de canales transendoteliales, baja permeabilidad para moléculas hidrofílicas y una elevada resistencia eléctrica. Además de ello, este modelo ha demostrado un buen coeficiente de correlación entre el análisis *in vitro* e *in vivo* de una amplia gama de moléculas sometidas a ensayo. Hasta la fecha, todos los datos obtenidos demuestran que este modelo de la BBB mimetiza estrechamente la situación *in vivo* al reproducir alguna de las complejidades del entorno celular que existen *in vivo*, al tiempo que conserva las ventajas experimentales asociadas con el cultivo de tejidos. Muchos estudios han validado este co-cultivo de células como uno de los modelos *in vitro* más reproducibles de la BBB.

El modelo *in vitro* de la BBB se estableció utilizando un co-cultivo de BBCECs y astrocitos. Antes del cultivo celular, insertos de placas (Millicell-PC 3,0 µM; diámetro de 30 mm) se revistieron sobre la cara superior con colágeno de la cola de rata. Después, se dispusieron en microplacas de seis pocillos que contenían los astrocitos y BBCECs se extendieron sobre la cara superior de los filtros en 2 mL de medio de co-cultivo. Este medio de BBCEC se cambió tres veces durante una semana. Bajo estas condiciones, BBCECs diferenciadas formaron una monocapa confluyente 7 días más tarde. Los experimentos se realizaron entre 5 y 7 días después de haber alcanzado la confluencia. Se midió el coeficiente de permeabilidad para sacarosa para verificar la permeabilidad endotelial.

Cultivos primarios de astrocitos mixtos se prepararon a partir de córtex del cerebro de rata neonata (Dehouck M.P., Meresse S., Delorme P., Fruchart J. C., Cecchelli, R. An Easier, Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood-Brain Barrier In Vitro. *J. Neurochem.* 54, 1798-1801, 1990). En síntesis, después de separar las meninges, el tejido del cerebro se obligó a pasar suavemente a través de un tamiz de nilón de 82 µm. Los astrocitos se extendieron en microplacas de seis pocillos a una concentración de  $1,2 \times 10^5$  células/mL en 2 mL de medio de cultivo óptimo (DMEM) suplementado con suero de bovino fetal inactivado por calor al 10%. El medio se cambió dos veces por semana.

Células endoteliales capilares del cerebro bovino (BBCECs – siglas en inglés) se obtuvieron de Cellial Technologies. Las células se cultivaron en presencia de medio DMEM suplementado con suero de caballo al 10% (v/v) y suero de ternero inactivado por calor al 10%, 2 mM de glutamina, 50 µg/mL de gentamicina y 1 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos de carácter básico, añadido en días alternos.

Originalmente, a un primer nivel de selección, 96 péptidos como los descritos en la Tabla 2 se sometieron a ensayo como soporte con el modelo *in vitro* de la BBB. Cada uno de los péptidos se añadió a la cara superior de los insertos cubiertos o no cubiertos de células endoteliales durante 90 minutos a 37°C. Después de la incubación, los péptidos en la cara inferior de las cámaras se resolvieron mediante electroforesis. Geles de electroforesis se tiñeron con azul Coomassie para visualizar los péptidos según se ilustra con algunos péptidos (sin limitación) en la Fig. 1. AngioPep-1 (ya sea SEQ ID NO: 67 o el péptido nº 67 (forma amidada)) se utiliza a menudo en esta memoria como una referencia o para fines comparativos. En la Fig. 1, cada uno de los péptidos iniciales aplicados a la cara superior de los filtros se cargaron sobre gel de electroforesis (ini) como control. Después de transcitosis durante 90 minutos, un volumen de 50 µl procedente de la cara basolateral de los filtros cubierta con células endoteliales (+) o no cubierta (-) también se cargó sobre geles de tricina. Para visualizar los péptidos, los geles se tiñeron con azul Coomassie.

Después del primer nivel de rastreo, péptidos detectados en la cara inferior de las cámaras mediante tinción con azul Coomassie (5, 8, 45, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 90 y 91) se seleccionaron para el estudio ulterior con los péptidos yodados. En síntesis, los péptidos seleccionados de yodaron con procesos convencionales utilizando perlas de yodo de Sigma. Para cada una de las proteínas se utilizaron dos perlas de yodo. Estas perlas se lavaron dos veces con 3 ml de tampón fosfato (PB) en un filtro Whatman™ y se resuspendieron en 60 µl de PB. <sup>125</sup>I (1 mCi) de Amersham-Pharmacia Biotech se añadió a la suspensión de perlas durante 5 min a la temperatura ambiente. La yodación para cada uno de los péptidos se inició añadiendo 100 µg (80-100 µl) de la suspensión de perlas. Después de incubación durante 10 min a temperatura ambiente, los sobrenadantes se aplicaron sobre una columna desalinizante pre-empaquetada con 5 ml de dextran™ reticulado de Pierce y <sup>125</sup>I-proteínas se eluyeron con 10 ml de PBS. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se midió la radiactividad en 5 µl de cada una de las fracciones. Fracciones correspondientes a proteínas con <sup>125</sup>I se agruparon y dializaron frente a tampón de Ringer/Hepes, pH 7,4. La eficacia del radiomarcaje se encontraba entre  $0,6 - 1,0 \times 10^8$  cpm/100 µg de proteína.

Los péptidos yodados también se investigaron con el modelo *in vitro* de la BBB. Cada uno de los péptidos se añadió a la cara superior de los insertos cubiertos o no cubiertos de células endoteliales durante 90 minutos a 37°C.

Después de la incubación, péptidos en la cara inferior de las cámaras se precipitaron con TCA. Los resultados se expresaron como relaciones en cpm. Para cada uno de [<sup>125</sup>I]-péptidos, el número de cpm en la cámara inferior se dividió por el número total de cpm añadido al filtro cubierto de células endoteliales (células +/inicial) o no cubierto (células -/inicial). También se calculó (células +/células -) la relación entre el número de [<sup>125</sup>I]-péptidos encontrados en la cámara del fondo de filtros cubiertos con o sin células endoteliales. Una relación células -/inicial muy baja indica que los filtros pueden interferir con los péptidos (péptidos 5 y 8). Una relación elevada de células +/inicial y células +/células - indica un mejor paso de los péptidos a través de las células endoteliales del cerebro. En la Tabla 3 se muestran los resultados de los 18 péptidos previamente seleccionados.

**Tabla 3**  
**Resultados del rastreo de péptidos después del segundo nivel de rastreo**

Nº de péptidos	células -/inicial	Relaciones células +/inicial	células +/células -
5	0,111	0,051	0,46
8	0,086	0,039	0,46
45	0,163	0,049	0,30
67	0,403	0,158	0,39
70	0,143	0,032	0,23
71	0,072	0,027	0,37
72	0,209	0,029	0,014
73	0,056	0,017	0,30
74	0,146	0,036	0,24
75	0,207	0,087	0,42
76	0,222	0,084	0,38
77	0,224	0,063	0,28
78	0,125	0,075	0,60
79	0,194	0,078	0,40
81	0,203	0,088	0,43
82	0,120	0,043	0,36
90	0,284	0,134	0,47
91	0,406	0,158	0,30
Aprotinina	0,260	0,022	0,08

A partir de estos resultados, se seleccionaron 12 péptidos con relaciones células +/ células - generalmente superiores a 0,35, a saber: 5, 8, 67 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 90 y 91. Los péptidos nº 91 y nº 77 se seleccionaron también para la investigación ulterior debido a sus relaciones de células + / células - (> 0,2).

Los 12 péptidos seleccionados se investigaron luego confirmando sus coeficientes de permeabilidad utilizando el modelo de la BBB *in vitro*. El efecto de cada uno de los péptidos seleccionados a 250 nM sobre la integridad de la BBB se determinó midiendo la permeabilidad de [<sup>14</sup>C]-sacarosa en el modelo de BBB sobre monocapas de BBCEC desarrolladas sobre filtros en presencia de astrocitos. Para lograr este ensayo, monocapas de células endoteliales del cerebro desarrolladas sobre insertos se transfirieron a placas de 6 pocillos que contenían 2 mL de Ringer-Hepes por pocillo (compartimiento basolateral) durante dos horas a 37°C. La disolución de Ringer-Hepes estaba constituida por NaCl 150 mM, KCl 5,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 6 mM, Hepes 5 mM, Hepes 2,8 mM, pH 7,4. En cada una de las cámaras apicales, el medio de cultivo fue reemplazado por 1 mL de Ringer-Hepes que contenía la [<sup>14</sup>C]-sacarosa marcada. En diferentes instantes, los insertos se colocaron en otro pocillo. El paso de [<sup>14</sup>C]-sacarosa se midió a 37°C sobre filtros sin células, o con filtros revestidos con células BBCEC. Los péptidos se añaden al comienzo del experimento en el instante cero. Los resultados se representaron como el aclaramiento de sacarosa (µl) en función del tiempo (min).

$$\text{Aclaramiento } (\mu\text{l}) = \frac{[\text{C}]\text{A} \times \text{VA}}{[\text{C}]\text{L}}$$

[C]A = concentración abluminal de trazador  
VA = volumen de la cámara abluminal  
[C]L = concentración luminal de trazador

La pendiente de la variación lineal (µl/min) es el coeficiente de permeabilidad de sacarosa para el filtro sin células (Psf) y uno revestido con células BBCEC (PSt) en presencia del péptido.

El coeficiente de permeabilidad (Pe) se calculó como:

$$1/Pe = (1/PS_t - 1/PS_f) / \text{área del filtro (4,2 cm}^2)$$

Se seleccionaron los péptidos con el Pe más elevado: 67, 76, 90, 91,5, 79,8 y 78.

5 La perfusión cerebral *in situ* (en ratones) se utilizó como el cuarto nivel de selección para seleccionar los péptidos mejores. Este proceso distingue también entre compuestos que permanecen en el compartimiento vascular del cerebro de los que han cruzado la membrana endotelial abluminal para penetrar en el parénquima del cerebro. De hecho, la técnica de agotamiento capilar post-perfusión permite medir si la molécula atraviesa realmente el endotelio para penetrar en el parénquima del cerebro. Al utilizar esta técnica, se demuestra en esta memoria que péptidos  
10 específicos tienden a acumularse en la fracción del parénquima del cerebro (véase la Tabla 4).

**Tabla 4**

Nº de péptidos	Producto homogeneizado (ml/100 g)		Volumen de distribución (perfusión 5 min)			
			Capilares (ml/100 g) %		Parénquima (ml/100 g) %	
15	5	312	217	73	95	27
	8	250	204	82	46	18
	25	1141	1082	95	60	5
20	67	38	13	34	25	65
	76	40	16	40	24	60
	78	198		181	90	16
	79	70	52	74	18	26
	90	87	76	88	11	12
25	91	47	24	59	23	41

30 Cuatro péptidos, a saber 5, 67, 76 y 91, mostraron los niveles más elevados de distribución en el parénquima con un volumen superior a 20 ml/100 g y que representa al menos el 25% del volumen encontrado para el cerebro total (producto homogeneizado), mostrando así el potencial más elevado como soporte para uso como vectores de transporte. El péptido 79 se eliminó debido a su menor volumen de distribución en el parénquima del cerebro (18 ml/100 g). El péptido 67 representa la forma amidada de AngioPep-1 descrita en la solicitud previa que presentaron los autores de esta invención. La amidación de un péptido afecta a la carga global del péptido. Como resulta evidente en las Tablas 2 y 3, dos péptidos con una carga diferente no tienen necesariamente que tener la misma  
35 actividad.

El vector o soporte descrito puede, así, utilizarse en un método para transportar un agente a través de la barrera sangre-cerebro, que comprende administrar a un individuo un agente que comprende un ingrediente activo o un agente farmacéutico fijado a un soporte tal como aprotinina o un derivado funcional del mismo (es decir, un análogo de aprotinina, un fragmento de aprotinina, un derivado de aprotinina, un análogo de un fragmento de aprotinina).  
40

El soporte y conjugado se pueden administrar al paciente por vía intra-arterial, intra-nasal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdermal o *per os*. El agente puede ser, por ejemplo, un compuesto anti-angiogénico. El agente puede tener un peso máximo de 160.000 Dalton. Tal como se comenta en esta memoria, el agente puede ser un marcador o un fármaco tal como un fármaco de moléculas pequeñas, una proteína, un péptido o una enzima. El fármaco puede estar adaptado para tratar, por ejemplo, una enfermedad neurológica o un trastorno del sistema nervioso central de un paciente. El fármaco puede ser un fármaco citotóxico, y el marcador puede ser un marcador detectable tal como un marcador radiactivo, una proteína fluorescente verde, una proteína His-Tag o  $\beta$ -galactosidasa. El agente se puede suministrar, por ejemplo, al sistema nervioso central de un paciente.  
50

Los usos, métodos, compuestos, agentes, fármacos o medicamentos mencionados en esta memoria pueden no alterar la integridad de la barrera sangre-cerebro del paciente.

El péptido de la invención se selecciona de un péptido definido en SEQ ID NO: 97.

55 Péptido 97: se puede utilizar al enlazarlo a un agente o a un compuesto para transportar el agente o compuesto a través de la barrera sangre-cerebro de un paciente. El agente o compuesto se puede adaptar para tratar una enfermedad neurológica o para tratar un trastorno del sistema nervioso central.

60 El soporte de la presente invención, péptido 97, se puede enlazar a o marcar con un marcador detectable tal como un agente formador de radioimágenes tal como los que emiten radiación, para la detección de una enfermedad o afección, por ejemplo mediante el uso de un conjugado de agente formador de radioimágenes-soporte de anticuerpo,

en donde el anticuerpo se une a un antígeno específico para la enfermedad o afección. También se describen en esta memoria otras moléculas de unión, además de anticuerpos, y que son conocidos y utilizadas en la técnica. Alternativamente, el soporte de la presente invención se puede enlazar a un agente terapéutico para tratar una enfermedad o afección, o se puede enlazar a o marcar con mezclas de los mismos. El tratamiento se puede efectuar administrando un conjugado de soporte-agente a un individuo bajo condiciones que permiten el transporte del agente a través de la barrera sangre-cerebro.

Un agente terapéutico tal como se utiliza en esta memoria puede ser un fármaco, una medicina, un agente emisor de radiación, una toxina celular (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) y/o un fragmento biológicamente activo del mismo, y/o mezclas de los mismos para permitir el exterminio de la célula, o puede ser un agente para tratar, curar, aliviar, mejorar, disminuir o inhibir una enfermedad o afección en un individuo tratado. Un agente terapéutico puede ser un producto sintético o un producto de origen fúngico, bacteriano o de otro microorganismo tal como micoplasma, viral, etc., animal, tal como reptil, o vegetal. Un agente terapéutico y/o fragmento biológicamente activo del mismo puede ser un agente enzimáticamente activo y/o un fragmento del mismo, o puede actuar inhibiendo o bloqueando una vía celular importante y/o esencial, o compitiendo con un componente celular que aparece en la naturaleza importante y/o esencial.

Ejemplos de agentes formadores de radioimágenes que emiten radiación (radiomarcadores detectables) que pueden ser adecuados se ejemplifican por indio-111, tecnecio-99 o yodo-131 de dosis baja.

Marcadores detectables, o marcadores, para el uso descrito pueden ser un radiomarcador, un marcador fluorescente, un marcador activo de resonancia magnética nuclear, un marcador luminiscente, un marcador cromóforo, un isótopo emisor de positrones para el escáner PET, marcador de quimioluminiscencia o un marcador enzimático. Marcadores fluorescentes incluyen la proteína fluorescente verde (GFP), fluoresceína y rodamina. Marcadores de quimioluminiscencia incluyen luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa. Marcadores enzimáticos incluyen peroxidasa y fosfatasa. Una His-Tag también puede ser un marcador detectable.

Se contempla que un agente puede ser liberable del soporte después del transporte a través de la barrera sangre-cerebro, por ejemplo mediante escisión enzimática o rotura de un enlace químico entre el soporte y el agente. El agente de liberación puede luego actuar en su capacidad pretendida en ausencia del soporte.

### **EJEMPLO 1**

#### **Estrategias para la conjugación de fármacos (paclitaxel)**

Para la conjugación, paclitaxel (TAXOL™) tiene 2 posiciones estratégicas (posición C2' y C7). La Fig. 2 ilustra el método de fijación del vector o soporte de la presente invención a paclitaxel. En síntesis, paclitaxel se hace reaccionar con piridina y anhídrido succínico durante 3 horas a temperatura ambiente para fijar un grupo succinilo en posición 2'. Paclitaxel 2'-succinilo de este tipo tiene un enlace éster escindible en la posición 2' que, tras la escisión, puede liberar simplemente el ácido succínico. Este enlace éster escindible puede utilizarse adicionalmente para diversas modificaciones con enlazadores, si se desea. El 2'-O-succinil- paclitaxel resultante se hace luego reaccionar con EDC/NHS en DMSO durante 9 horas a la temperatura ambiente, seguido de la adición del soporte o vector en Ringer/DMSO durante un tiempo de reacción adicional de 4 horas a la temperatura ambiente. La reacción de conjugación representada en la Fig. 2 es vigilada mediante HPLC. Cada uno de los productos intermedios tales como paclitaxel, 2'-O-succinil-paclitaxel y 2'-O-NHS-succinil-paclitaxel se purifica y valida utilizando diferentes enfoques tales como HPLC, cromatografía líquida fina, RMN (intercambio de  $^{13}\text{C}$  o  $^1\text{H}$ ), punto de fusión, espectrometría de masas. El conjugado final se analiza por espectrometría de masas y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Esto permite determinar el número de moléculas de paclitaxel conjugadas en cada vector.

Se determinó la capacidad de transcitosis de conjugado de aprotinina-paclitaxel y se reseña más abajo en la Tabla 5

**Tabla 5**

#### **Determinación de la capacidad de transcitosis del conjugado de aprotinina-Taxol a través de la BBB**

	Transcitosis (Pe $10^{-3}$ cm/min)	Integridad de sacarosa (Pe $10^{-3}$ cm/min)
Control		
Aprotinina	0,2	0,28
Aprotinina-Taxol	0,21	0,24
		0,22

- La conjugación no afecta a la capacidad de la aprotinina de atravesar la barrera
- También se mantiene la integridad de la barrea

5

Tal como se observa en la Tabla 5, la conjugación de paclitaxel a aprotinina seguía siendo capaz de atravesar el modelo *in vitro* de la barrera de sangre-cerebro sin afectar a la integridad de sacarosa, demostrando así que la molécula (a la que se alude también en esta memoria como vector o soporte) aprotinina sigue conservando su actividad cuando se conjuga a un entidad química grande tal como paclitaxel.

10

Después se realizó el estudio de supervivencia en el modelo del tumor de cerebro de rata para verificar si el paclitaxel, que estaba conjugado, seguía siendo activo *in vivo*. Para el modelo del tumor de cerebro en rata, las ratas recibieron un implante intra-cerebral de 50.000 células de glioma CNS-1. Tres (3) días después, los animales recibieron tratamiento con vehículo (aprotinina), Paclitaxel (5 mg/kg) o Paclitaxel-Aprotinina (5 mg/kg) mediante inyección intravenosa. El tratamiento se administró luego cada semana hasta que se sacrificó al animal (véase la Fig. 3). Las ratas fueron vigiladas cada día en cuanto a síntomas clínicos y pérdida de peso. De acuerdo con el protocolo de buena práctica animal, los animales fueron sacrificados cuando se observó una pérdida de peso durante 3 días consecutivos o antes de que la pérdida de peso fuese más del 20% del peso inicial del animal.

15

20

Utilizando el mismo protocolo experimental, el paclitaxel, cuando se inyecta solo a la dosis tolerada máxima (54 mg/kg), era incapaz de aumentar la supervivencia de los ratones (Laccabue et al., 2001, Cancer, 92 (12): 3085-92).

25

El estudio de supervivencia también se realizó en ratones a los que se implantó un xenoinjerto de tumor de cerebro humano. Para el modelo de tumor de cerebro de ratones, los ratones recibieron un implante intra-cerebral de 500.000 células de glioma U87 humanas. 3 días después del implante, los animales recibieron tratamiento con Paclitaxel-Angiopep1 (5 mg/kg) o vehículo mediante inyección intravenosa. El tratamiento se administró luego cada semana hasta el sacrificio del animal. Los ratones se vigilaron cada día en cuanto a síntomas clínicos y pérdida de peso. De acuerdo con el protocolo de buena práctica animal, los animales fueron sacrificados cuando se observó una pérdida de peso durante 3 días consecutivos o antes de que la pérdida de peso fuese más del 20% del peso inicial del animal. Se observó ahora que la supervivencia media para el grupo control era de  $19 \pm 2$  días. Para el análisis estadístico, se consideró significativo un aumento del 20% en la supervivencia. Como puede observarse en la Fig. 4, el conjugado de Paclitaxel-Angiopep-1 retuvo su actividad, con un efecto estadísticamente significativo. El tiempo de supervivencia de los animales tratados con paclitaxel-angioPep1 se amplía significativamente cuando se compara con el grupo control ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ).

30

35

## EJEMPLO II

### Estrategias para la conjugación de anticuerpos

40

Dado que proteínas tienen varios grupos amino disponibles para la conjugación, se utiliza el acoplamiento de aminas utilizando la activación sulfo-NHS/EDC para reticular anticuerpos terapéuticos con vectores (soportes) descritos. Se eligió este enfoque, debido a que es una técnica de acoplamiento rápida, simple y reproducible, ya que el conjugado resultante es estable al tiempo que sigue conservando la actividad biológica del anticuerpo y tiene una elevada capacidad de conjugación que puede controlarse de manera fiable y una baja interacción no específica durante los procesos de acoplamiento.

45

Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (Fab y Fab'<sub>2</sub>) han sido conjugados con el vector para aumentar su suministro al cerebro. Se han utilizado diversos enfoques de conjugación para conjugar primero IgGs con aprotinina, habiendo demostrado que los soportes descritos se comportan exactamente como la aprotinina.

50

Para la conjugación de IgG se han sometido a ensayo diferentes reticulantes tales como BS<sup>3</sup> [bis(sulfosuccinimidil)suberato], NHS/EDC (N-hidroxisuccinimida y N-etil-N'-(dimetilaminopropil)carbodiimida o Sulfo-EMCS (hidrazida de [ácido N-e-maleimidocaproico]). BS<sup>3</sup> es un éster de N-hidroxisuccinimida homobifuncional que fija como objetivo aminas primarias accesibles. NHS/EDC crea una conjugación de grupos amina primarios con grupos carboxilo. Sulfo-EMCS son grupos reactivos heterobifuncionales (maleimida y éster de NHS) que son reactivos hacia: grupos sulfhidrilo y amino.

55

Primero se confirmó la conjugación de IgG con aprotinina utilizando el agente reticulante BS<sup>3</sup> (Fig. 5) o sulfo-EMCS (Fig. 6).

60

Luego se sometió a ensayo el transporte de IgG o conjugados de IgG a través de la BBB. Se midió la absorción de

5  $[^{125}\text{I}]\text{-IgG}$  a la cara luminal de capilares del cerebro de ratón utilizando el método de perfusión del cerebro *in situ* adaptado en el laboratorio de los autores de la invención para el estudio de la absorción de fármacos en el cerebro de ratones (Dagenais et al. 2000, J. Cereb. Blood Flow Metab. 20(2): 381-386). Las constantes de transporte de la BBB se determinaron como se describe previamente por Smith (1996, Pharm. Biotechnol. 8:285-307). La absorción de IgG se expresó como el volumen de distribución (Vd) a partir de la siguiente ecuación:

$$Vd = Q*br/C*pf$$

10 en que Q\*br es la cantidad calculada de  $[^{125}\text{I}]\text{-IgG}$  o conjugado de  $[^{125}\text{I}]\text{-IgG}$ -aprotinina por gramo del hemisferio derecho del cerebro, y C\*pf es la concentración de trazador marcado, medida en el material perfundido.

Los resultados de este experimento indican que existe una absorción del cerebro mayor para el conjugado de  $[^{125}\text{I}]\text{-IgG}$ -aprotinina que la de  $[^{125}\text{I}]\text{-IgG}$  no conjugada (véase la Fig. 7).

15 La conjugación de IgGs con aprotinina aumenta su acumulación en el parénquima del cerebro *in vivo*.

### EJEMPLO III

#### **Efecto del conjugado de Taxol-Angiopep-2 sobre la supervivencia de ratones**

20 Este estudio con Taxol-Angiopep-2 (al que se alude en esta memoria como péptido nº 97 (**angiopep2 no está amidado**)) se realizó para determinar si la conjugación de Taxol a Angiopep-2 podría aumentar la supervivencia de ratones. La estructura de Angiopep-2 se ilustra en SEQ ID NO: 97. Para este experimento, ratones recibieron un implante intra-cerebral de 500.000 células de glioma U87 humanas. 3 días después del implante, los animales fueron tratados con el vehículo (DMSO/Ringer-Hepes 80:20 v/v (es decir, control)) o conjugado de Taxol-Angiopep-2 (3:1, es decir relación de 3 moléculas de Taxol para cada uno de los péptidos; Txlan2 (5 mg/kg)) mediante inyecciones en la vena de la cola (Fig. 8). Los ratones fueron vigilados cada día en cuanto a síntomas clínicos y pérdida de peso. Los tratamientos se administraron hasta que se sacrificó a los animales. Tal como se muestra en la Tabla 6, los autores de la invención observaron que la supervivencia mediana era de 18 días para el grupo control, mientras que la supervivencia mediana para ratones que recibían el conjugado de Taxol-Angiopep-2 era de 21 días (Fig. 8). La curva de supervivencia obtenida para ratones tratados con el conjugado de Taxol-Angiopep-2 (en rojo) indica que la supervivencia mediana se incrementaba significativamente en un 17% (Fig. 8). El análisis estadístico presentado también en la Tabla 6 indica que la administración de conjugado de Taxol-Angiopep-2 aumentaba significativamente la supervivencia en un 17% (valores  $p = 0,048$ ).

35 **Tabla 6. Compendio de resultados del estudio de supervivencia**

40	a. Supervivencia mediana	Días	Incremento (%)	Ratones (n)
	Control	18,0	-	7
	Conjugado de Txlan2	21,0	+ 17	7
45	b. Análisis estadístico	(valores p)	Diferencias estadísticas	
	Control frente a conjugado de Txlan2	$p = 0,048$	Sí	

SECUENCIAS

SEQ ID

NO.:

1 T F V Y G G C R A K R N N F K S A E D  
 2 T F Q Y G G C M G N G N N F V T E K E  
 3 P F F Y G G C G G N R N N F D T E E Y  
 4 S F Y Y G G C L G N K N N Y L R E E E  
 5 T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y

5 El péptido nº 5 comprende la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO.: 5 y está amidado en su extremo C (véase, por ejemplo, la Fig. 9)

6 T F F Y G G C R G K R N N F K R A K Y  
 7 T F F Y G G C R A K K N N Y K R A K Y  
 8 T F F Y G G C R G K K N N F K R A K Y  
 9 T F Q Y G G C R A K R N N F K R A K Y  
 10 T F Q Y G G C R G K K N N F K R A K Y  
 11 T F F Y G G C L G K R N N F K R A K Y  
 12 T F F Y G G S L G K R N N F K R A K Y  
 13 P F F Y G G C G G K K N N F K R A K Y  
 14 T F F Y G G C R G K G N N Y K R A K Y  
 15 P F F Y G G C R G K R N N F L R A K Y  
 16 T F F Y G G C R G K R N N F K R E K Y  
 17 P F F Y G G C R A K K N N F K R A K E  
 18 T F F Y G G C R G K R N N F K R A K D  
 19 T F F Y G G C R A K R N N F D R A K Y  
 20 T F F Y G G C R G K K N N F K R A E Y  
 21 P F F Y G G C G A N R N N F K R A K Y  
 22 T F F Y G G C G G K K N N F K T A K Y  
 23 T F F Y G G C R G N R N N F L R A K Y  
 24 T F F Y G G C R G N R N N F K T A K Y  
 25 T F F Y G G S R G N R N N F K T A K Y  
 26 T F F Y G G C L G N G N N F K R A K Y  
 27 T F F Y G G C L G N R N N F L R A K Y

ES 2 383 901 T3

28 T F F Y G G C L G N R N N F K T A K Y  
29 T F F Y G G C R G N G N N F K S A K Y  
30 T F F Y G G C R G K K N N F D R E K Y  
31 T F F Y G G C R G K R N N F L R E K E  
32 T F F Y G G C R G K G N N F D R A K Y  
33 T F F Y G G S R G K G N N F D R A K Y  
34 T F F Y G G C R G N G N N F V T A K Y  
35 P F F Y G G C G G K G N N Y V T A K Y  
36 T F F Y G G C L G K G N N F L T A K Y  
37 S F F Y G G C L G N K N N F L T A K Y  
38 T F F Y G G C G G N K N N F V R E K Y  
39 T F F Y G G C M G N K N N F V R E K Y  
40 T F F Y G G S M G N K N N F V R E K Y  
41 P F F Y G G C L G N R N N Y V R E K Y  
42 T F F Y G G C L G N R N N F V R E K Y  
43 T F F Y G G C L G N K N N Y V R E K Y  
  
44 T F F Y G G C G G N G N N F L T A K Y  
45 T F F Y G G C R G N R N N F L T A E Y  
46 T F F Y G G C R G N G N N F K S A E Y  
47 P F F Y G G C L G N K N N F K T A E Y  
48 T F F Y G G C R G N R N N F K T E E Y  
49 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E D  
50 P F F Y G G C G G N G N N F V R E K Y  
51 S F F Y G G C M G N G N N F V R E K Y  
52 P F F Y G G C G G N G N N F L R E K Y  
53 T F F Y G G C L G N G N N F V R E K Y  
54 S F F Y G G C L G N G N N Y L R E K Y  
55 T F F Y G G S L G N G N N F V R E K Y  
56 T F F Y G G C R G N G N N F V T A E Y  
57 T F F Y G G C L G K G N N F V S A E Y  
58 T F F Y G G C L G N R N N F D R A E Y  
59 T F F Y G G C L G N R N N F L R E E Y  
60 T F F Y G G C L G N K N N Y L R E E Y  
61 P F F Y G G C G G N R N N Y L R E E Y

62 P F F Y G G S G G N R N N Y L R E E Y  
 63 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I  
 64 A R I I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G  
 65 Y G G C R A K R N N Y K S A E D C M R T C G  
 66 P D F C L E P P Y T G P C V A R I I R Y F Y  
 67 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y

El péptido nº 67 comprende la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO.: 67 y está amidado en su extremo C (véase, por ejemplo, la Fig. 9)

68 K F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 69 T F Y Y G G C R G K R N N Y K T E E Y  
 70 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 71 C T F F Y G C C R G K R N N F K T E E Y  
 72 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y C  
 73 C T F F Y G S C R G K R N N F K T E E Y  
 74 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C  
 75 P F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 76 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y

5 El péptido nº 76 comprende la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO.: 76 y está amidado en su extremo C (véase, por ejemplo, la Fig. 9)

77 T F F Y G G K R G K R N N F K T E E Y  
 78 T F F Y G G C R G K R N N F K T K R Y  
 79 T F F Y G G K R G K R N N F K T A E Y  
 80 T F F Y G G K R G K R N N F K T A G Y  
 81 T F F Y G G K R G K R N N F K R E K Y  
 82 T F F Y G G K R G K R N N F K R A K Y  
 83 T F F Y G G C L G N R N N F K T E E Y  
 84 T F F Y G C G R G K R N N F K T E E Y  
 85 T F F Y G G R C G K R N N F K T E E Y  
 86 T F F Y G G C L G N G N N F D T E E E  
 87 T F Q Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 88 Y N K E F G T F N T K G C E R G Y R F

89 R F K Y G G C L G N M N N F E T L E E  
 90 R F K Y G G C L G N K N N F L R L K Y  
 91 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y

10 El péptido nº 91 comprende la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO.: 91 y está amidado en su extremo C (véase, por ejemplo, la Fig. 9)

ES 2 383 901 T3

92 K T K R K R K K Q R V K I A Y E E I F K N Y  
93 K T K R K R K K Q R V K I A Y  
94 R G G R L S Y S R R F S T S T G R  
95 R R L S Y S R R R F  
96 R Q I K I W F Q N R R M K W K K  
97 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
98 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I  
I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G G  
C R A K R N N F K S A E D C M R T C G G A

99 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y  
100 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y  
101 T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y  
102 N A K A G L C Q T F V Y G G C L A K R N N F  
E S A E D C M R T C G G A

103 Y G G C R A K R N N F K S A E D C M R T C G  
G A

104 G L C Q T F V Y G G C R A K R N N F K S A E  
105 L C Q T F V Y G G C E A K R N N F K S A

SEQ ID NO.: 106

atgagaccag atttctgcct cgagccgccg tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcatc  
cgttacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgcagacct tcgtatacgg cggctgcaga  
gctaagcgta acaacttcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgccg tgggtgcttag

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido con la secuencia TFFYGGSRGKRNNFKTEEY.

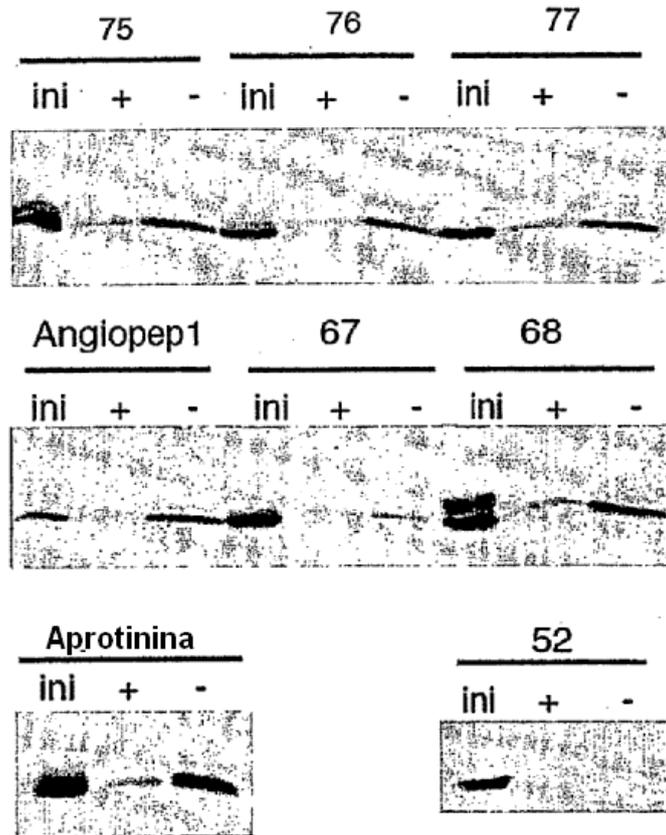


Fig. 1

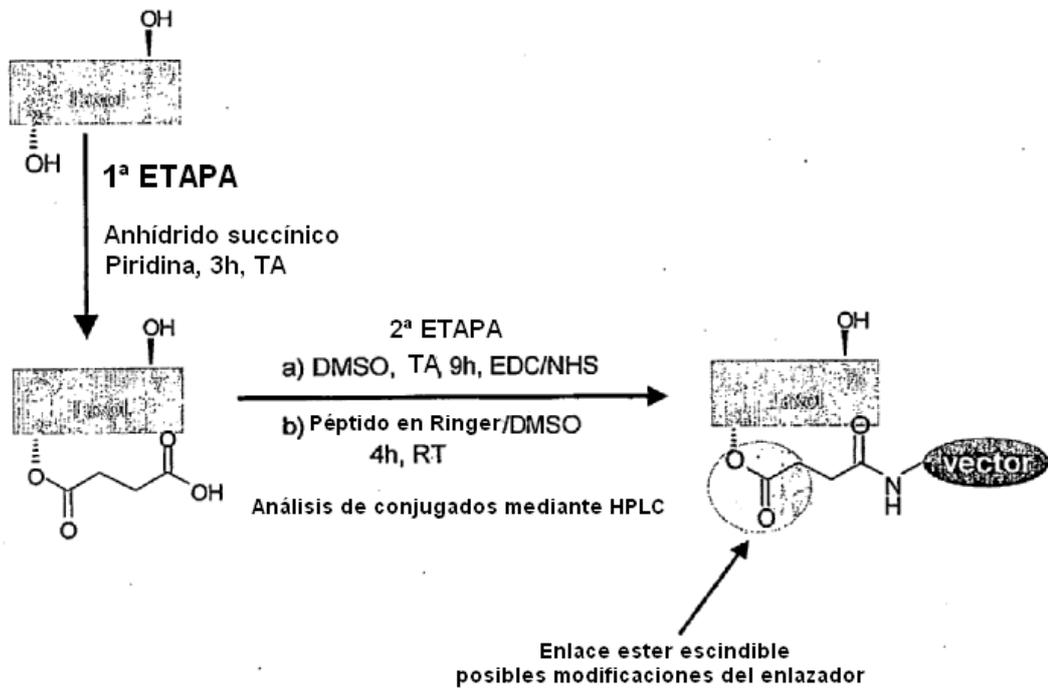


Fig. 2

Estudio de supervivencia 1: modelo de glioblastoma CNS-1 en ratas Lewis  
 Efecto del tratamiento con taxol y taxol-aprotinina (inyección iv)  
 (abril 04)

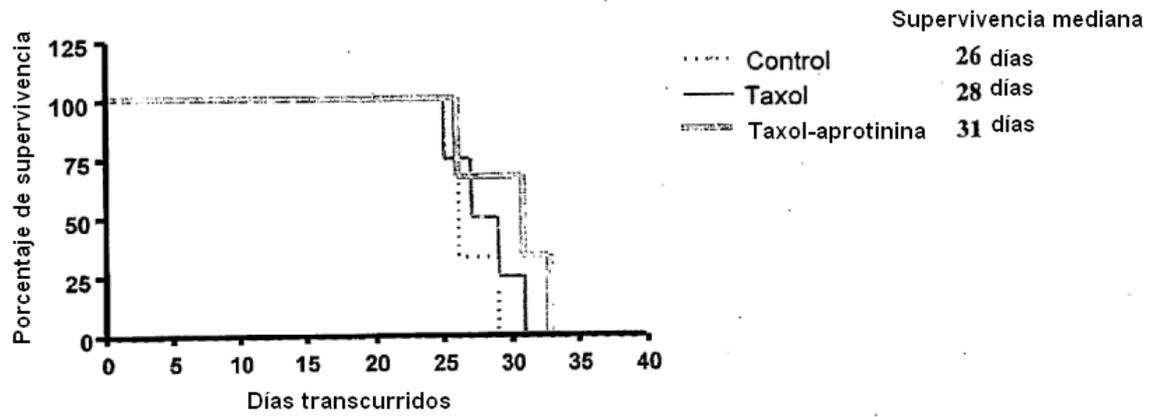


Fig. 3

Estudio de supervivencia 2: modelo de glioblastoma humano U87 en ratones inmunodeficientes  
Efecto del tratamiento con taxol-Angiopep1 (inyección iv)  
(mayo 04)

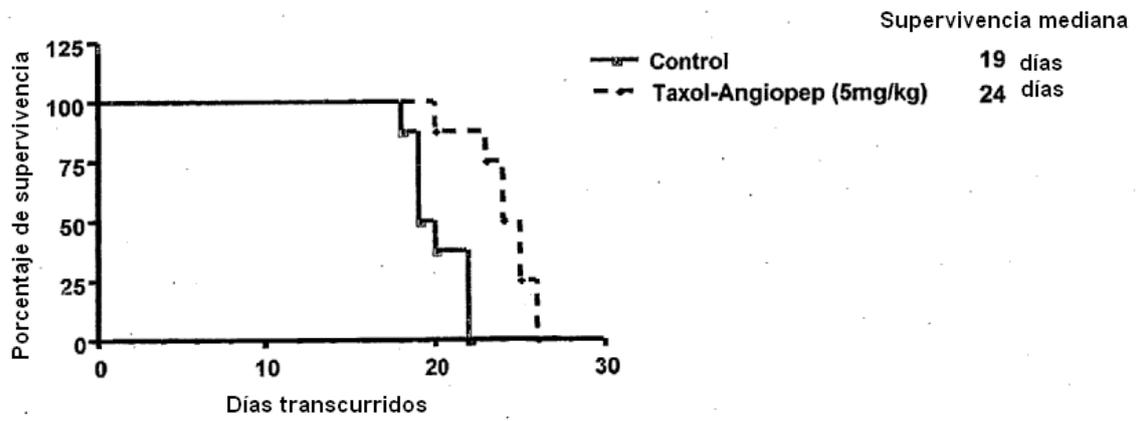


Fig. 4



## Agente reticulante : sulfo-EMCS

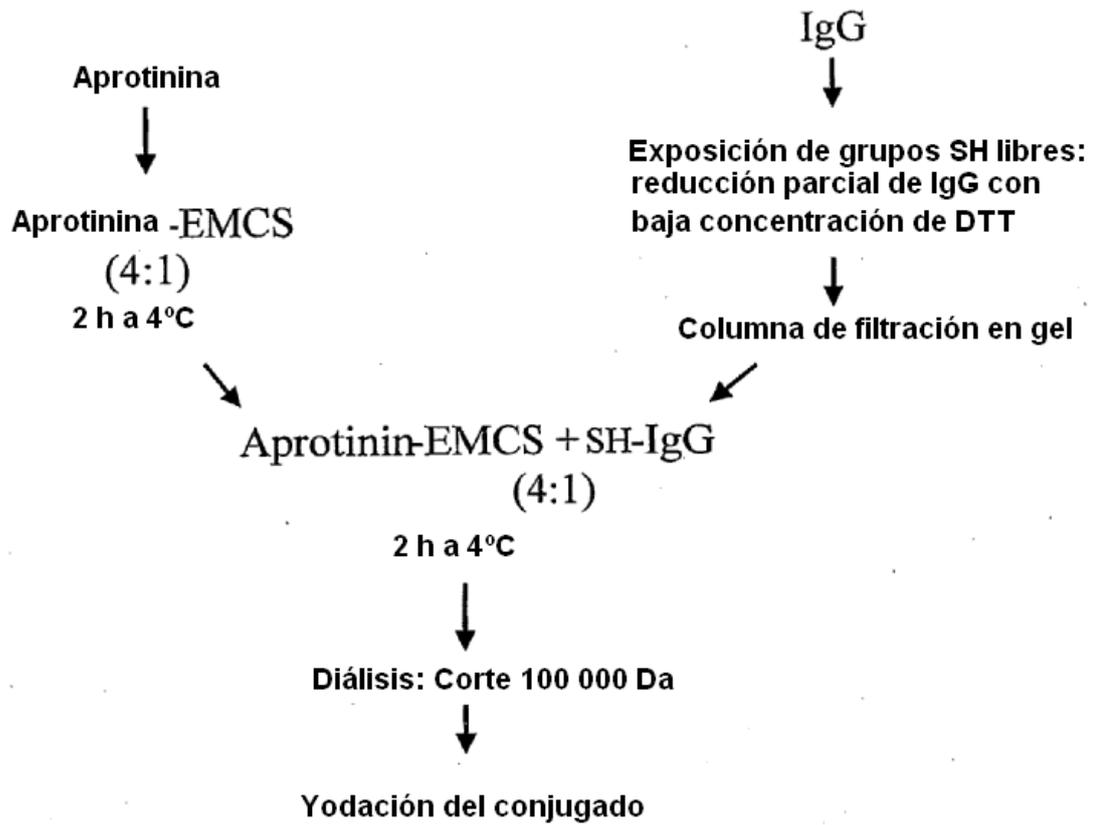


Fig. 6

Mayor penetración en el cerebro para conjugados de IgG-aprotinina

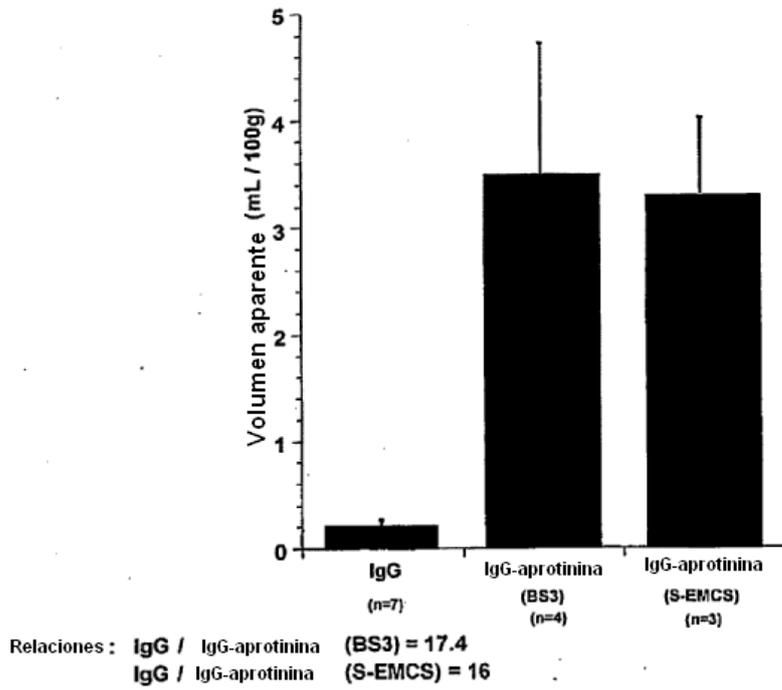


Fig. 7

**Estudio de supervivencia 4: Efecto del conjugado de Taxol-Angiopep-2 (5 mg/kg)**

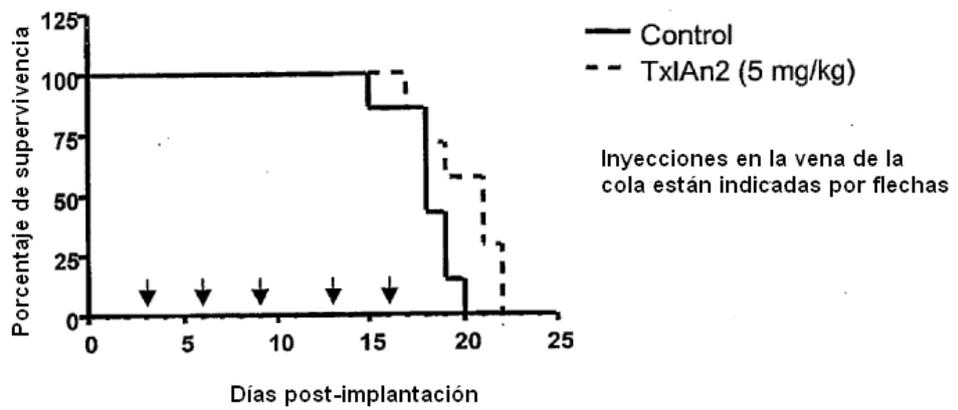


Fig. 8

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Carga
Angiopep	TFFYGGCRGKRNNFKTEEY	+2
# 67	TFFYGGCRGKRNNFKTEEY-amida	+2
# 76	TFFYGGCRGKRNNFKTKEY-amida	+3
# 91	RFKYGGCLGNKNNYLRLKY-amida	+5
# 5	TFFYGGCRAKRNNFKRAKY-amida	+6

Carga +: Lisina (K), arginina (R)

Carga -: ácido glutámico (E), ácido aspártico (D)

Fig. 9