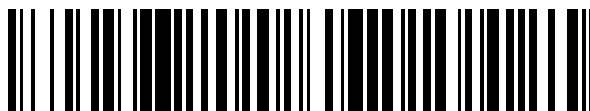


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 649**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/775 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2009** **E 09760175 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014** **EP 2350117**

54 Título: **Derivados peptídicos y su uso como vectores de moléculas en forma de conjugados**

30 Prioridad:

22.10.2008 FR 0857159

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2014

73 Titular/es:

VECT-HORUS (33.3%)
51 Boulevard Pierre Dramard Faculté de
Médecine Secteur Nord CS 80011
13344 Marseille Cedex 15 , FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (33.3%)

72 Inventor/es:

KHRESTCHATISKY, MICHEL;
DAVID, MARION;
MOLINO, YVES y
VLIEGHE, PATRICK

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 525 649 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

Derivados peptídicos y su uso como vectores de moléculas en forma de conjugados

La invención se refiere a derivados peptídicos (péptidos y pseudopéptidos) y a su uso como vectores de moléculas de interés. La invención también se refiere a conjugados que contienen un derivado peptídico de la invención unido a una molécula de interés. Los péptidos y los conjugados profármacos de la invención se pueden utilizar para el transporte de moléculas de interés farmacéutico o de diagnóstico, tales como por ejemplo moléculas terapéuticas, agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o sondas moleculares, a través de las membranas celulares, y en particular para favorecer su transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE).

Antecedentes de la invención

Según *IMS Health*, el mercado mundial de medicamentos destinados al tratamiento de patologías del sistema nervioso central (SNC, el cerebro y la médula espinal) era de aproximadamente 70 mil millones de dólares en el año 2007, representando cerca de 9 mil millones de dólares de esta cantidad los productos derivados de las tecnologías de *drug delivery* (Jain, 2008, *Jain PharmaBiotech Report, Drug Delivery in CNS disorders*). Por lo tanto, hasta la fecha el SNC forma parte de una de las 3 áreas terapéuticas más importantes, junto con la cardiovascular y la oncología. Aunque el número de personas que padecen trastornos y patologías del SNC en todo el mundo es mayor que el de personas con enfermedades cardiovasculares o cáncer, la neurología sigue siendo un mercado poco explotado. Esto se explica por el hecho de que el 98% de los fármacos potenciales para el tratamiento de patologías del SNC no atraviesan la barrera hematoencefálica o BHE (*Pardridge, 2003, Mol. Interv., 3, 90-105*).

De hecho, el cerebro está protegido contra sustancias potencialmente tóxicas por la presencia de dos sistemas principales de barreras fisiológicas: la BHE y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BS-LCR). La BHE se considera la principal vía para la captación de ligandos plasmáticos. Su superficie es aproximadamente 5000 veces mayor que la de la BS-LCR. La longitud total de los vasos sanguíneos que constituyen la BHE es de aproximadamente 600 km. Cada cm³ de la corteza cerebral contiene el equivalente a 1 km de vasos sanguíneos. La superficie total de la BHE se estima en 20 m² (*De Boer et al., 2007, Clin. Pharmacokinet., 46 (7), 553-576*). Por lo tanto, el endotelio cerebral, que forma la BHE representa un obstáculo importante para el uso de fármacos potenciales contra muchos trastornos del SNC, pero también una superficie importante de intercambio potencial entre la sangre y el tejido nervioso.

Generalmente, solo algunas pequeñas moléculas lipófilas de aproximadamente 450 a 600 Dalton pueden pasar a través de la BHE (solo el 2% de los fármacos candidatos), es decir, pasar desde la sangre hasta el cerebro. El peso molecular y el tamaño de muchos fármacos candidatos que muestran resultados prometedores en estudios con animales para el tratamiento de trastornos del SNC, son considerablemente más elevados. Por ello, la mayoría de las moléculas tales como los péptidos o proteínas terapéuticas generalmente se excluyen del paso/transporte desde la sangre al cerebro, debido a la baja permeabilidad de las células endoteliales de los capilares cerebrales (*brain capillary endothelial cells* o BCECs) para estos fármacos candidatos. Las BCECs organizadas en vasos están rodeadas por una lámina basal, pies de los astrocitos, pericitos y células de microglía y neuronales. La estrecha asociación de las células endoteliales con los pies de los astrocitos es responsable de desarrollar y mantener las propiedades de impermeabilidad de la BHE en la mayoría de las moléculas, lo que garantiza un control estricto y eficaz de los intercambios moleculares entre la sangre y el cerebro con el fin de mantener la homeostasis cerebral. Las BCECs están estrechamente unidas a través de uniones estrechas, en comparación con otras células endoteliales de otros órganos, que son fenestradas. Estas uniones estrechas impiden de este modo cualquier transporte paracelular a través de la BHE.

La BHE se considera como el mayor obstáculo a superar en el desarrollo de nuevas terapias para tratar las patologías cerebrales, en particular para el uso de moléculas capaces de tratar trastornos del SNC (*Neuwelt et al., 2008, Lancet Neurol., 7, 84-96*).

Una de las razones que pueden explicar por qué no está disponible actualmente ningún tratamiento eficaz para las principales patologías cerebrales (cáncer cerebral, enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, accidente cerebrovascular (ACV), etc.) es que las personas que desarrollan los fármacos candidatos destinados al tratamiento de patologías cerebrales, llevan a cabo programas de investigación internos (*brain drug-discovery programs*) invirtiendo pocos esfuerzos en la problemática de atravesar la BHE y en el direccionamiento preferencial del sistema nervioso central, y particularmente del cerebro (*brain drug-targeting programs*) (*Pardridge, 2003, Mol. Interv., 3, 90-105*). De hecho, un fármaco candidato debe cumplir ciertas normas estructurales, fisicoquímicas, farmacológicas y farmacológicas para tener todas las posibilidades de convertirse en un fármaco para tratar una patología o un trastorno del SNC (*Pajouhesh et al., 2005, NeuroRx, 2 (4), 541-553*). En el desarrollo de un fármaco candidato, la selectividad y la especificidad (perfil farmacológico) de una molécula hacia su diana son esenciales para su actividad terapéutica (eficacia). La biodisponibilidad y la toxicidad potencial (perfil farmacéutico) de una molécula son cruciales para su futuro como fármaco. En otras palabras, cualquier molécula capaz de convertirse en un fármaco con el fin de tratar una patología o un trastorno del SNC, por un lado tiene que pasar a través de la BHE, por otra parte, conservar su actividad biológica, y presentar buenas propiedades farmacocinéticas (PK), de adsorción, de metabolismo, de distribución y de excreción (ADME) y farmacodinámicas (PD), con baja toxicidad (Tox). Por ello,

para los químicos médicos en esta área terapéutica del SNC es particularmente difícil de lograr el equilibrio hidrófilo/lipófilo de la molécula en desarrollo.

Por tanto, el principal problema del tratamiento de trastornos y patologías del SNC radica en el hecho de que las moléculas administradas no pasan la BHE y por ello no pueden llegar a su(s) diana(s) en el SNC. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos y los capilares del CNS que constituyen la BHE son un obstáculo para las moléculas que no pueden pasar desde la sangre al tejido nervioso. De hecho, estas células endoteliales y los pies de los astrocitos que las rodean constituyen una barrera física ligada en particular a la existencia de uniones muy estrechas entre las células endoteliales que limitan/impiden cualquier paso/transporte por la vía paracelular, y también una barrera fisiológica, ya que estas células tienen sistemas de salida eficaces que restringen cualquier paso/transporte por la vía transcelular. Por tanto, estas propiedades limitan gravemente el paso de sustancias desde el plasma sanguíneo hacia el espacio extracelular cerebral.

De hecho, algunas moléculas que son capaces de atravesar la BHE, son expulsadas activamente desde el cerebro al sistema sanguíneo por proteínas de transporte *multidrug resistant* (MDR). Estos sistemas de salida por medio de transporte activo (*active efflux transport*, AET) generalmente controlan el flujo de salida activo de pequeñas moléculas desde el cerebro hasta el sistema sanguíneo. El modelo de sistema AET a nivel de BHE es la *ATP Binding Cassette* (ABC), a saber, la glicoproteína P (P-glicoproteína, P-gp); sin embargo, otros sistemas de AET están presentes a nivel de la BHE, tal como la *MDR-associated protein 1* (MRP1). La P-gp, que se localiza principalmente en la superficie luminal de las células endoteliales de los capilares cerebrales, es un elemento esencial en la función de barrera fisiológica de la BHE, evitando la entrada en el cerebro de la mayoría de los compuestos xenobióticos, y también de fármacos candidatos y otras moléculas de interés terapéutico que pueden ser activas en el SNC.

Una de las prioridades de la investigación para el descubrimiento de moléculas destinadas a tratar, diagnosticar o generar imágenes de trastornos o patologías cerebrales, es por ello encontrar medios que permitan aumentar la eficacia del paso de los principios activos a través de la BHE.

En este sentido, las estrategias para el transporte de moléculas a través de la BHE, estudiadas y utilizadas actualmente por las personas que desarrollan fármacos candidatos, con el fin de permitir que una molécula de interés terapéutico llegue al SNC, se pueden dividir en tres estrategias principales (Figura 1), (*Pardridge, 2007, Pharm. Res., 24 (9), 1733-1744; De Boer et al., 2007, Clin. Pharmacokinet., 46 (7), 553-576; De Boer et al., 2007, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 47, 327-355; Jones et al., 2007, Pharm. Res., 24 (9), 1759-1771*).

Metodologías neuroquirúrgicas

Las metodologías neuroquirúrgicas se pueden implementar mediante inyección intraventricular cerebral directa del principio activo, inyección intracerebral o infusión intratecal, o mediante interrupción de la BHE (ruptura temporal de la integridad de la BHE).

El principal problema de las metodologías neuroquirúrgicas mediante inyección intraventricular, aparte de los costes relacionados con el procedimiento neuroquirúrgico, es que el fármaco no se entrega directamente en el parénquima cerebral, sino en el líquido cefalorraquídeo. De hecho, la infusión intraventricular implica la colocación de un catéter en los ventrículos (*Aird, 1984, Exp. Neurol., 86, 342-358*). Esta técnica muy invasiva no es eficaz para el transporte de principios activos al parénquima cerebral. De hecho, el volumen de flujo desde el líquido cefalorraquídeo hasta el parénquima cerebral durante la administración de un fármaco por infusión intraventricular, se rige por una difusión anormalmente lenta de su convección (su transporte), debido a que el cerebro no posee un caudal volumétrico intraparenquimatoso.

Del mismo modo para la inyección intracerebral, la difusión de un principio activo en el cerebro disminuye muy rápidamente desde el sitio de la inyección hasta el sitio de la lesión. De hecho, la concentración cerebral de un principio activo se reduce en un 90% a una distancia de 500 µm desde su sitio de inyección.

La infusión intratecal implica la colocación de un catéter en el cerebro conectado a una bomba que libera el principio activo con un caudal predeterminado. Debido a que el cerebro es el único órgano que no tiene sistema linfático, que normalmente se utiliza para llevar de vuelta los fluidos extracelulares a la circulación general, la distribución de un principio activo mediante infusión intratecal en el cerebro es muy lenta. Esto disminuye la concentración del principio activo en el sitio de la lesión.

Además, los riesgos de infección son importantes en tales procedimientos neuroquirúrgicos, en particular por la presencia de un catéter. En estas condiciones, la comodidad del paciente no es óptima.

La interrupción temporal de la impermeabilidad de la BHE se asocia con una abertura transitoria de las uniones estrechas de las células endoteliales de los capilares cerebrales.

Este es el caso de sustancias vasoactivas como las bradicininas o leucotrienos (*Baba et al., 1991, J. Cereb. Blood Flow Metab., 11, 638-643*). Esta estrategia también es invasiva y requiere un acceso arterial a nivel de la carótida en sujetos/pacientes sedados. El principal problema encontrado por la interrupción temporal de la integridad de la BHE,

además de los gastos relacionados con el procedimiento del radiólogo para acceder a la carótida, es que la BHE permanece abierta durante un corto período de tiempo, limitando de hecho, la posibilidad de suministrar crónicamente un fármaco. Además, la interrupción temporal de la BHE permite que las proteínas plasmáticas entren en el cerebro (aunque esas proteínas pueden ser tóxicas para el cerebro) y también puede facilitar la entrada de agentes infecciosos. Este tipo de ruptura de la BHE puede conducir por tanto a alteraciones neuropatológicas crónicas y está asociada con un riesgo importante de infección (*Salahuddin et al., 1988, Acta Neuropathol., 76, 1-10*).

Metodologías farmacológicas de transporte

Las estrategias farmacológicas para el transporte de moléculas comprenden la difusión transcelular de moléculas que se han vuelto más lipófilas mediante la adición de grupos lipídicos al principio activo (*Transcellular Lipophilic Diffusion* o TLD) incluso el uso de liposomas (*Zhou et al., 1992, J. Control. Release, 19, 459-486*), y el transporte mediante adsorción iónica a través de moléculas vectores cargadas positivamente o mediante cationización de la molécula activa (*Adsorptive-Mediated Transport* o AMT).

La adición de un grupo lipídico permite la conversión química de moléculas hidrófilas en moléculas más lipófilas, en particular a través de metodologías profármacos. Sin embargo, la síntesis de tales compuestos conduce a moléculas que exceden el umbral de transporte óptimo para atravesar la BHE, especialmente en lo que respecta al peso molecular que se vuelve superior al límite óptimo de 450 Dalton (*Pajouhesh et al., 2005, NeuroRx, 2 (4), 541-553*). Por esta misma razón, los liposomas o incluso vesículas pequeñas o nanopartículas (micelas, nanoesferas, nanocápsulas) son generalmente demasiado grandes, no son suficientemente específicas para la BHE, y por lo tanto relativamente ineficaces para el transporte de moléculas de interés terapéutico (o agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o cualquier otra molécula como una sonda molecular) a través de la BHE (*Levin, 1980, J. Med. Chem., 23, 682-684; Schackert et al., 1989, Selective Cancer Ther., 5, 73-79*). Por lo tanto, los principales problemas encontrados por las tecnologías de lipidezación (TLD) son su baja especificidad para dirigirse y atravesar específicamente la BHE, en comparación con otras membranas celulares, la disminución de los valores plasmáticos del área bajo la curva del fármaco (AUC) y su utilización generalmente limitada al transporte de moléculas pequeñas.

En las metodologías de AMT, el principal problema encontrado es la baja especificidad para dirigirse y atravesar la BHE específicamente, en relación con otras membranas celulares. De hecho, el AMT se basa en la adsorción de moléculas catiónicas sobre células en las que la membrana está cargada negativamente, lo que es el caso de la mayoría de las células. La disminución de los valores plasmáticos del AUC del fármaco, su utilización generalmente limitada al transporte de pequeñas moléculas y su citotoxicidad, son todos factores que sancionan la metodología de transporte a través del AMT.

Metodologías fisiológicas de transporte

Las estrategias basadas en las metodologías fisiológicas de transporte consisten en explotar los diversos mecanismos de transporte natural a nivel de la BHE. Estos mecanismos de transporte activo de moléculas a través de la BHE se realizan ya sea a través del acoplamiento a un sustrato específico de un receptor o por mimetismo molecular con el sustrato específico de un receptor (*Carrier-Mediated Transport* o CMT) o por medio de acoplamiento o fusión a un ligando que se dirige específicamente a un receptor (*Receptor-Mediated Transport* o RMT).

A título de ejemplo, moléculas tales como la L-DOPA (enfermedad de Parkinson), el melfalán (cáncer cerebral), la α -metil-DOPA (hipertensión arterial) y la gabapentina (epilepsia) pasan al cerebro por CMT a través del *large neutral amino acid transporter* (LAT1) (*Pardridge, 2003, Mol. Interv., 3, 90-105*). Estas moléculas tienen estructuras químicas similares a la fenilalanina, uno de los sustratos naturales de LAT1. Sin embargo, los principales problemas que se encuentran las metodologías CMT son su alta selectividad/especificidad hacia los conjugados que imitan/mimetizan estrechamente el sustrato del receptor/transportador endógeno, y por lo tanto, su uso sigue estando limitado al transporte de moléculas pequeñas.

El RMT utiliza un sistema de transporte dependiente del receptor. El transporte se logra a través de mecanismos de endocitosis dirigiéndose a receptores/transportadores endógenos presentes en los capilares cerebrales. Entre los diferentes receptores humanos de la BHE implicados en el RMT, se distingue especialmente: el receptor de la transferrina (TfR), el receptor de la insulina (IR), los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que permiten el transporte del colesterol, en donde el receptor de la LDL (LDLR) y los miembros de la familia de *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP), o incluso el receptor de *insulin-like growth factor* (IGFR), el receptor de la toxina diftérica (DTR) o *heparin binding epidermal growth factor-like growth factor* (HB-EGF), así como los *scavenger receptors* (SCAV-Rs), uno de ellos el *scavenger receptor class B type I* (SR-BI). En el RMT, los receptores en la membrana de una célula endotelial de la BHE se unen a su ligando, causando la endocitosis del complejo constituido por el receptor/transportador y su ligando en una vesícula que se forma en la superficie de la célula y luego penetra en la célula endotelial de la BHE. El complejo ligando/receptor puede pasar a través de la célula endotelial (transcitosis) y por lo tanto atravesar la BHE para actuar en el tejido nervioso. Este proceso de RMT no depende del tamaño de lo que se endocita. Por lo tanto, el RMT es un mecanismo que permite el transporte

desde la sangre hasta el cerebro de moléculas tales como la insulina, proteínas transportadoras de hierro, colesterol, diversos derivados peptídicos y proteínas, etc. Por ejemplo, la transferrina se utiliza como vector ligando de TfR presente en la BHE (*Jefferies et al., 1984, Nature, 312, 162-163; Friden et al., 1983, Science, 259, 373-377; Friden, 1994, Neurosurgery, 35, 294-298*), y la molécula que se va a transportar (principio activo) se acopla a la transferrina (vector ligando). Aunque esta estrategia de transporte, con ayuda de una macromolécula, permite un aumento del paso de las moléculas de interés conjugadas a través de la BHE, tiene algunos inconvenientes. En primer lugar, el acoplamiento de la molécula con el vector se hace generalmente por métodos de expresión genética (fusión), lo que limita el número de moléculas que se van a transportar solamente a proteínas o polipéptidos. A continuación, el sistema de acoplamiento de la molécula con el vector es bastante complejo, un acoplamiento químico o bioquímico tradicional no permite obtener sistemas macromoleculares bien definidos desde un punto de vista estructural y molecular.

Compendio de la invención

La presente invención permite superar estos inconvenientes. La invención muestra que es posible diseñar péptidos o pseudopéptidos de tamaño reducido capaces de transportar a través de las membranas celulares, y más específicamente la BHE, sustancias de gran masa y/o volumen. La invención proporciona por lo tanto nuevos péptidos, conjugados y composiciones que permiten mejorar la biodisponibilidad de moléculas de interés, y en particular de mejorar su direccionamiento (targeting) al SNC.

Más particularmente, los inventores han desarrollado derivados peptídicos capaces de unirse al LDLR humano. Los inventores han mostrado que estos derivados eran capaces de atravesar la BHE. Los inventores también han mostrado que estos derivados permitían transportar, a las células de la BHE, moléculas de interés terapéutico o de diagnóstico. Además, los inventores han desarrollado péptidos capaces de unirse al LDLR sin competir con el ligando natural, y por tanto sin interferencia con el transporte de LDL. Por tanto, estos derivados peptídicos representan nuevos productos (vectores) particularmente ventajosos para el diseño y el transporte de fármacos o agentes de diagnóstico, especialmente para llegar al CNS.

Un objeto de la invención reside pues en un péptido o un pseudopéptido tal y como se define en las reivindicaciones. La invención describe de este modo péptidos o pseudopéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos naturales y/o no naturales, caracterizados por que contienen como máximo 30 residuos de aminoácidos, y por que se unen al LDLR humano en la superficie de membranas celulares. Los péptidos comprenden al menos 5 residuos de aminoácidos, preferiblemente al menos 6, 7 u 8. En una realización preferida, los péptidos de la invención también se unen al LDLR murino. De forma muy particularmente ventajosa y preferida, los péptidos de la invención tienen la capacidad de atravesar la BHE y potencialmente las membranas de células cancerosas o infecciosas.

Otro objeto de la invención se refiere a un conjugado que comprende un péptido o un pseudopéptido tal y como se ha definido anteriormente, acoplado a una sustancia de interés. Como se indicará en lo sucesivo, el acoplamiento es preferentemente covalente y se puede realizar de manera que se disocia después de cruzar las membranas celulares, con el fin de liberar la sustancia de interés en un sitio de interés. Dependiendo de la naturaleza del acoplamiento, la liberación de la sustancia se puede realizar, por ejemplo, de manera pasiva o bajo la acción de enzimas o de condiciones fisiológicas determinadas.

Otro objeto de la invención se refiere a un método para preparar un conjugado tal como se ha definido anteriormente.

Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un conjugado de la invención.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un péptido o pseudopéptido, o un conjugado tal como se han definido anteriormente, para la preparación de un fármaco, un agente de diagnóstico o de formación de imágenes.

Otro objeto de la invención se refiere a un método para mejorar o permitir el paso de una molécula a través de la BHE, que comprende acoplar esta molécula con un péptido o un pseudopéptido como se ha definido anteriormente.

Otro objeto de la invención reside en un método mejorado de tratamiento de una patología en un sujeto con un fármaco, consistiendo la mejoría en acoplar ese fármaco a un péptido o un pseudopéptido como se ha definido anteriormente.

La invención se puede emplear en cualquier mamífero, en particular en un ser humano.

Leyendas de las Figuras

Figura 1

Esquema que ilustra los diferentes modos de hacer pasar moléculas naturales o farmacológicas a través de la BHE, adaptado a partir de *Abbott y Romero, 1996, Mol. Med. Today, 2 (3), 106-113*.

Figura 2

Esquema comparativo de la síntesis en tándem y de la síntesis a través de un enlazador de un conjugado vector/molécula de interés terapéutico.

Figura 3

A - Esquema del plásmido utilizado para la clonación de los hLDLR y mLDLR.

5 B - Esquema que representa la proteína de fusión expresada por las células transfectadas.

Figura 4

Transferencia Western realizada en líneas celulares CHO que expresan constitutivamente las proteínas de fusión hLDLR-GFP o GFP (utilizada como testigo). Se detectó una banda de 190 kDa correspondiente al tamaño de la proteína de fusión hLDLR-GFP con el anticuerpo anti-hLDLR.

10 Figura 5

Inmunocitoquímica sobre células CHO no permeabilizadas, que expresan de forma estable o bien A - la GFP sola (testigo), o B - la estructura artificial hLDLR-GFP. Los núcleos celulares se marcan con Hoechst (azul, A1 y B1). La fluorescencia de GFP es visible en verde (A2 y B2), la del marcado del dominio extracelular de hLDLR con el anticuerpo anti-hLDLR es visible en rojo (A3 y B3) y la superposición de los marcados rojos y verdes es visible en amarillo/naranja (A4 y B4). Hay que tener en cuenta que solo las células transfectadas de forma estable con la estructura artificial hLDLR-GFP expresan el receptor de membrana (B3).

15

Figura 6

A - Células de la línea CHO-hLDLR-GFP que expresan hLDLR-GFP (verde) incubadas con Dil-LDL (rojo), la superposición de los marcados rojo y verde es visible en amarillo/naranja, hay que tener en cuenta que las células están fuertemente marcadas.

20

B - Células de una línea CHO-TfR-GFP que expresan hTfR-GFP (verde) incubadas con Dil-LDL (rojo): ausencia de unión y de endocitosis de Dil-LDL.

C - Células de la línea CHO-hLDLR-GFP que expresan hLDLR-GFP (verde) incubadas con transferrina acoplada a *Texas Red* (rojo): ausencia de unión y de endocitosis del ligando Tf.

25 Obsérvese la diferencia de la intensidad del marcado entre A por un lado, B y C por el otro lado, en donde solo se detecta el marcado de los receptores hTfR y hLDLR fusionados con GFP.

Figura 7

Líneas CHO que expresan de manera estable A - solo GFP (verde) y B - hLDLR-GFP (verde), y la inmunotinción con un anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica de un clon de virus bacterianos que presenta un péptido (SEQ ID NO: 1) con afinidad hacia hLDLR (puntos rojos). Los núcleos celulares se marcan con Hoechst (azul, A1 y B1). La fluorescencia de GFP es visible en verde (A2 y B2), la del marcado de la envuelta vírica del virus bacteriano con el anticuerpo anti-proteína vírica es visible en rojo (A3 y B3) y la superposición de los marcados rojos y verdes es visible en amarillo/naranja (A4 y B4). Obsérvese que las células que no expresan hLDLR en A no fijan los virus bacterianos.

30

Figura 8

Comparación mediante inmunocitoquímica de la unión de virus bacterianos testigos (A-C) y de virus bacterianos que presentan péptidos que tienen afinidad hacia hLDLR (SEQ ID NO: 1), (B, D) sobre fibroblastos humanos (A-B) y sobre células endoteliales microvasculares de cerebro porcino (C-D). Los virus bacterianos se visualizan con un anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica.

35

Figura 9

Evaluación mediante FACS de la interacción entre células CHO-hLDLR-GFP y un clon de virus bacterianos que presenta el péptido SEQ ID NO: 11 con afinidad hacia el hLDLR, en comparación con virus bacterianos testigos que no presentan péptidos con afinidad hacia ese receptor. La señal en Q2 muestra una combinación de dos señales sobre las células que son positivas por un lado si se expresa hLDLR-GFP (fluorescencia GFP, eje horizontal) y por otro lado si los virus bacterianos con afinidad hacia ese receptor están unidos a las células a través de los péptidos que presentan (marcado mediante inmunocitoquímica, eje vertical).

40

45

A - Células CHO-hLDLR-GFP incubadas con el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica y su anticuerpo secundario APC.

B - Células CHO-hLDLR-GFP incubadas con virus bacterianos testigos (negativos), el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica y su anticuerpo secundario APC.

C - Células CHO-hLDLR-GFP incubadas con un clon de virus bacterianos que presenta un péptido con afinidad hacia el hLDLR (SEQ ID NO: 11), el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica y su anticuerpo secundario APC. Se observa un desplazamiento elevado de la señal en Q2.

Figura 10

- 5 Evaluación por FACS de la interacción entre fibroblastos humanos y un clon de virus bacterianos que presenta el péptido SEQ ID NO: 12 con afinidad hacia el hLDLR, en comparación con virus bacterianos testigos que no presentan afinidad hacia ese receptor. La señal en Q2 muestra en una combinación de dos señales sobre las células que son positivas por un lado si se expresa el hLDLR (marcado por inmunocitoquímica, eje horizontal) y por otra parte, si los virus bacterianos con afinidad hacia ese receptor se unen con células a través de los péptidos que presentan (marcado por inmunocitoquímica, eje vertical).

A - Fibroblastos humanos incubados con el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica y su anticuerpo secundario APC.

B - Fibroblastos humanos incubados con el anticuerpo anti-LDLR y su anticuerpo secundario Alexa 488.

- 15 C - Fibroblastos humanos incubados con virus bacterianos testigos (negativos), el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, el anticuerpo anti-LDLR y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488.

D - Fibroblastos humanos incubados con un clon de virus bacterianos que presenta el péptido SEQ ID NO: 12 con afinidad hacia hLDLR, el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, el anticuerpo anti-LDLR y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488. Se observa un desplazamiento elevado de la señal en Q2.

Figura 11

- 20 Evaluación por FACS de la interacción entre células endoteliales HUVEC y 2 clones de virus bacterianos que presentan los péptidos, uno cíclico (SEQ ID NO: 11), el otro lineal (SEQ ID NO: 21), con afinidad hacia el hLDLR, en comparación con virus bacterianos testigos que no presentan péptidos con afinidad hacia ese receptor.

A - Células endoteliales HUVEC incubadas con el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica y su anticuerpo secundario APC.

- 25 B - Células endoteliales HUVEC incubadas con el anticuerpo anti-LDLR y su anticuerpo secundario Alexa 488.

C - Células endoteliales HUVEC incubadas con virus bacterianos testigos (negativos), el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, el anticuerpo anti-LDLR y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488.

- 30 D - Células endoteliales HUVEC incubadas con un clon de virus bacterianos que presenta el péptido cíclico (SEQ ID NO: 11) con afinidad hacia el hLDLR, el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, el anticuerpo anti-LDLR y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488. Se observa un desplazamiento elevado de la señal en Q2.

E - Células endoteliales HUVEC incubadas con un clon de virus bacterianos que presenta el péptido lineal (SEQ ID NO: 21) con afinidad hacia el hLDLR, el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, el anticuerpo anti-LDLR y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488. Se observa un desplazamiento elevado de la señal en Q2.

Figura 12

- 35 Evaluación por FACS en células HUVEC de la competencia entre los péptidos presentados por los virus bacterianos con afinidad hacia LDLR y su ligando natural LDL.

A - Células endoteliales HUVEC incubadas con el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica y su anticuerpo secundario APC.

B - Células endoteliales HUVEC incubadas con el anticuerpo anti-LDLR y su anticuerpo secundario Alexa 488.

- 40 C - Células endoteliales HUVEC incubadas con virus bacterianos testigos (negativos), el anticuerpo anti-proteína de la envoltura vírica, el anticuerpo anti-LDLR y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488.

D - Células endoteliales HUVEC incubadas con virus bacterianos testigos (negativos), el anticuerpo anti-proteína de la envoltura vírica, el LDL y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488. No se observa ningún efecto debido a la presencia de LDL.

- 45 E - Células endoteliales HUVEC incubadas con un clon de virus bacterianos que presenta el péptido lineal (SEQ ID NO: 21) con afinidad hacia hLDLR, el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, el anticuerpo anti-LDLR y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488.

F - Células endoteliales HUVEC incubadas con un clon de virus bacterianos que presenta el péptido lineal (SEQ ID NO: 21) con afinidad hacia hLDLR, el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, el anticuerpo anti-LDLR, el LDL y

los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488. El LDL reduce fuertemente la unión de los péptidos SEQ ID NO: 21 presentados por los virus bacterianos.

5 G - Células endoteliales HUVEC incubadas con un clon de virus bacterianos que presenta el péptido cíclico (SEQ ID NO: 11) con afinidad hacia hLDLR, el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, el anticuerpo anti-LDLR y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488

H - Células endoteliales HUVEC incubadas con un clon de virus bacterianos que presenta el péptido cíclico (SEQ ID NO: 11) con afinidad hacia hLDLR, el anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, el anticuerpo anti-LDLR, el LDL y los anticuerpos secundarios APC y Alexa 488. No se observa ningún efecto debido a la presencia de LDL.

10 I - Gráfico que representa el porcentaje de desplazamiento de la señal de fluorescencia en la zona Q2 de los gráficos A-H obtenidos por FACS. No se mide ningún desplazamiento en Q2 para los virus bacterianos testigos que no presentan péptidos con afinidad hacia el hLDLR. Para los virus bacterianos que presentan el péptido SEQ ID NO: 21, más del 55,8% de la señal se desplaza en Q2 indicando una afinidad de los péptidos presentados por esos virus bacterianos hacia el hLDLR de las células HUVEC. La adición de LDL conlleva una pérdida de señal en Q2 del 85% a nivel de los virus bacterianos testigos, lo que indica una competencia entre el virus bacteriano que se corresponde a la secuencia peptídica SEQ ID NO: 21 y el LDL a nivel del sitio de unión de LDL a hLDLR. La señal en Q2 de los virus bacterianos que presentan el péptido SEQ ID NO: 11 igual de fuerte (desplazamiento superior al 70% en relación con los virus bacterianos testigos) no se desplaza apenas (17%) con la adición de LDL.

Figura 13

20 Doble marcado con inmunofluorescencia de secciones congeladas de cerebro de ratones C57BL6, 2 h después de una inyección en la vena de la cola de los ratones, de virus bacterianos testigos (A-B) y de virus bacterianos que presentan un péptido (SEQ ID NO: 1) con afinidad hacia hLDLR y mLDLR (C-D). Los vasos cerebrales están marcados con una IgG anti-ratón, en verde (A-C), los virus bacterianos se marcan con un anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica, en rojo (B-D).

Figura 14

25 Esquema general de los péptidos sintetizados conjugados con rodamina o S-Tag con el brazo espaciador en C-terminal (C-term).

Figura 15

30 Evaluación mediante fluorescencia e inmunocitoquímica de la unión y la endocitosis de los péptidos con afinidad hacia hLDLR (SEQ ID NO: 1/rodamina en A, SEQ ID NO: 2/S-Tag en C) en células de la línea CHO-hLDLR-GFP, en comparación con un péptido testigo (en B). La fluorescencia de la GFP es visible en verde (A1, B1 y C1), la que está unida a los péptidos, visualizada gracias a la rodamina o por unión de un anticuerpo anti-S-Tag acoplado a Alexa594, es visible en rojo (A2, B2 y C2), y la superposición de los marcados rojo y verde es visible en amarillo/naranja (A3, B3 y C3). Obsérvense los altos niveles de marcado intracelular en rojo con los péptidos SEQ ID NO: 1/rodamina en A2 y SEQ ID NO: 2/S-Tag en C2, y la superposición del marcado hLDLR-GFP (verde, A1, C1) con los péptidos unidos o internalizados por endocitosis (A2, C2).

Figura 16

Cuantificación de las tasas de unión (A-C) y de endocitosis (B-D) de los péptidos SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 2 y de un péptido testigo sobre la línea CHO-hLDLR-RFP (A-B) y sobre fibroblastos humanos (C-D) respectivamente.

Figura 17

40 Evaluación mediante inmunocitoquímica de la interacción entre células CHO-hLDLR-GFP y el péptido SEQ ID NO: 11 con afinidad hacia hLDLR, conjugado con S-Tag, en comparación con un péptido testigo conjugado también con S-Tag. La señal en Q2 muestra una combinación de 2 señales en las células que son positivas si por un lado se expresa hLDLR-GFP (fluorescencia GFP, eje horizontal) y por otro lado, si el péptido testigo y el péptido SEQ ID NO: 11 con afinidad hacia ese receptor, está ligado a las células (marcado inmunocitoquímico, eje vertical).

45 A - Células incubadas con el anticuerpo secundario APC.

B - Células incubadas con el péptido testigo conjugado con S-Tag, anticuerpo S-Tag y anticuerpo secundario APC.

C - Células incubadas con el péptido SEQ ID NO: 11 con afinidad hacia LDLR, conjugado con S-Tag, anticuerpo anti-S-Tag y anticuerpo secundario APC. Se observa un desplazamiento elevado de la señal en Q2.

Figura 18

50 Evaluación de la toxicidad de los péptidos sobre una barrera de células endoteliales en el modelo de BHE *in vitro* mediante coincubación con *Lucifer Yellow* (LY, análisis fluorimétrico) y análisis de la tasa de paso de LY en función

del tiempo y en ausencia o presencia de un péptido testigo y el péptido SEQ ID NO: 1, ambos conjugados con rodamina.

Figura 19

5 Evaluación después de la lisis de las células y análisis mediante fluorometría de las tasas de unión a las células endoteliales en un modelo de BHE *in vitro* y/o internalización en esas células, de los péptidos testigos y SEQ ID NO: 1, ambos conjugados con rodamina.

Figura 20

10 Evaluación fluorimétrica de las tasas de paso (Permeabilidad, Pe) a través de las células endoteliales de un modelo de BHE *in vitro* de los péptidos testigos y SEQ ID NO: 1, ambos conjugados con rodamina. La medición de la Pe de LY permite verificar la integridad de los modelos de BHE *in vitro*.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a derivados peptídicos capaces de unirse al LDLR humano y a su uso en el campo farmacéutico, en particular para transportar, en las células de la BHE, moléculas de interés terapéutico o de diagnóstico.

15 El LDLR humano es una proteína transmembranal de 839 aminoácidos que comprende tres regiones: la región extracelular (1-768), la región transmembranal (768-790) y la región citoplásmica (790-839). La región extracelular se divide en dos subregiones: la de unión a LDL (1-322) y la de fuera de la zona de unión a LDL (322-768) (véase el documento WO2007/014992).

20 El cerebro tiene una gran necesidad de LDL para tener un buen funcionamiento. Los ligandos naturales de LDLR son LDL y más particularmente la apolipoproteína B (ApoB) y la apolipoproteína E (ApoE), constitutivas de las partículas de LDL, que permiten de este modo el transporte de colesterol, contenido en estas partículas, a través de las membranas celulares y más particularmente de la BHE.

25 Por ello, se ha mostrado que el LDLR permitía la transcitosis de partículas de LDL a través de la BHE (*Dehouck et al., 1997, J. Cell Biol., 138 (4), 877-889*), a través de un proceso de RMT en vesículas endosómicas particulares que impiden la fusión con el lisosoma. Estas lipoproteínas, una vez que han pasado la BHE por transcitosis, son captadas a continuación por las neuronas y/o astrocitos (*Spencer et al., 2007, Natl. Proc. Acad. Sci. USA., 104 (18), 7594-7599*). Esta propiedad se ha utilizado para transportar moléculas de interés terapéutico con nanopartículas sobre las que se conjugan apolipoproteínas completas (constitutivas del LDL) (*Kreuter et al., 2007, J. Control. Release, 118, 54-58*). En este estudio, sin embargo, se utilizó una apolipoproteína completa, y en forma acoplada a una nanopartícula con el fin de imitar la estructura de la partícula LDL. El documento WO99/47566 menciona péptidos susceptibles de unirse a LDL.

35 La presente invención muestra por primera vez, que es posible diseñar péptidos pequeños capaces de unirse al LDLR y pasar a través de la BHE. La invención ofrece muchas ventajas en relación con las estrategias de la técnica anterior, que son el resultado en particular de la elección del receptor, de la estrategia para el diseño de los péptidos y de su naturaleza. La invención muestra que tales péptidos o seudopéptidos son selectivos para ciertas membranas celulares y se pueden utilizar para entregar tanto moléculas químicas pequeñas (sean lipófilas o no) como macromoléculas tales como proteínas de interés terapéutico. Los péptidos o seudopéptidos vectores se pueden sintetizar químicamente con facilidad, y la mayoría de las moléculas de interés terapéutico o agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, se pueden acoplar al péptido o seudopéptido vector de una forma simple y eficaz a través de una estrategia profármaco, mediante un brazo espaciador (síntesis a través de enlazador) o mediante acoplamiento directo (síntesis en tándem) entre las dos entidades (Figura 2). Los péptidos y seudopéptidos de la invención se pueden diseñar de modo que adopten una configuración cíclica y, por lo tanto, más resistente a la proteólisis. Además, los péptidos y seudopéptidos de la invención se pueden diseñar de modo que se unan al LDLR sin competir con el ligando natural. La invención ha permitido de este modo el descubrimiento de un nuevo sitio de unión en el LDLR, diferente del sitio de unión del LDL. Por lo tanto, el uso de péptidos y seudopéptidos de la invención dirigidos a ese sitio permite un transporte eficaz, sin una alteración sustancial de la unión del ligando natural.

45 Las investigaciones llevadas a cabo en el contexto de la presente invención han permitido que el solicitante muestre que los péptidos o seudopéptidos lineales o cíclicos que ha desarrollado se pueden utilizar como vectores de moléculas de interés terapéutico, o de agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o de cualquier otra molécula como una sonda molecular, en el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías neurológicas así como patologías infecciosas o cancerosas cerebrales o no.

55 Los péptidos o seudopéptidos lineales o cíclicos descritos en la presente invención tienen la capacidad de dirigirse a receptores/transportadores celulares, a tipos de células particulares y/o atravesar las membranas celulares en particular las de las barreras fisiológicas del cerebro y más particularmente la BHE o la barrera hemato-retiniana (BSR).

Los péptidos o seudopéptidos lineales o cíclicos descritos en la presente invención tienen la capacidad de dirigirse a receptores/transportadores celulares, a tipos de células particulares en particular las células cancerosas, del tejido nervioso o no, y/o de atravesar las membranas celulares en particular las de las barreras fisiológicas del SNC y más particularmente la barrera hemato-tumoral (BHT) a nivel de tumores del tejido nervioso.

- 5 Los péptidos o seudopéptidos lineales o cíclicos descritos en la presente invención tienen la capacidad de dirigirse a receptores/transportadores celulares, a tipos de células particulares y/o atravesar las membranas celulares, en particular las de las barreras fisiológicas del SNV, para tratar más particularmente patologías infecciosas cerebrales u otras, de tipo bacteriano, vírico, fúngico o parasitario.

- 10 Los péptidos o seudopéptidos lineales o cíclicos descritos en la presente invención tienen la capacidad de fijarse a un LDLR murino o humano de la membrana celular y atravesar dicha membrana gracias a este receptor mediante transcitososis.

Los péptidos o seudopéptidos lineales o cíclicos descritos en la presente invención tienen la capacidad de fijarse en el LDLR en la superficie de membranas celulares de barreras fisiológicas del cerebro de tipo murino y humano, y atravesar dicha barrera fisiológica gracias al LDLR mediante RMT.

- 15 Por consiguiente, la invención se refiere más particularmente a péptidos y seudopéptidos que muestran afinidad hacia el LDLR, y a su uso como vectores de moléculas de interés terapéutico o de agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o de cualquier otra molécula como una sonda molecular. Dichos péptidos se pueden utilizar en numerosas indicaciones, especialmente en el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías neurológicas, así como patologías infecciosas o cancerosas, cerebrales o no.
- 20 Un objeto de la invención reside, por tanto, en un péptido o seudopéptido tal como se define en las reivindicaciones. En el sentido de la invención, el término péptido o seudopéptido se refiere a una molécula que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos, que pueden ser naturales o no, opcionalmente modificados o funcionalizados, y unidos entre sí por enlaces peptídicos, no peptídicos o peptídicos modificados. Los péptidos pueden ser cíclicos o no, y presentar, en su caso, uno o varios extremos protegidos.
- 25 Un objeto preferido de la invención reside en un péptido o seudopéptido tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que tiene la capacidad de atravesar la BHE.

En una primera realización, los péptidos o seudopéptidos de la invención tienen la siguiente fórmula general (I):



en la que:

- 30 - X es un grupo de fórmula $(Xaa)_iZ(Xaa)_j$ e Y es un grupo de fórmula $(Xaa)_kW(Xaa)_l$, en donde Xaa representa un aminoácido natural o no y comprende un aminoácido de configuración D, un aminoácido no codificado o un aminoácido que contiene un enlace peptidomimético, Z y W representan dos aminoácidos idénticos o diferentes que permiten ciclar el péptido, e i, j, k y l son números enteros, idénticos o diferentes, comprendidos entre 0 y 5;

- M indica metionina o uno de sus isómeros o uno de sus análogos,

- 35 - P indica prolina o uno de sus isómeros o uno de sus análogos y

- R indica arginina o uno de sus isómeros o uno de sus análogos.

La invención es el resultado en particular de la identificación, mediante estrategias de comparación de la secuencia de péptidos ligandos, de motivos que aseguran la unión y el transporte con el LDLR, pero sin competir con el ligando natural. La ausencia de competencia con el ligando natural muestra que los motivos de unión descubiertos por los inventores implican un nuevo sitio de unión en el LDLR, lo que constituye un descubrimiento inesperado y particularmente ventajoso en el contexto del transporte de compuestos *in vivo*.

- 40 Los aminoácidos naturales o no, que constituyen los grupos X e Y de los péptidos o seudopéptidos de la invención puede ser idénticos o diferentes y se seleccionan entre:

- 45 - glicina (Gly, G) o ácido 2-aminoetanoico, sarcosina (Sar) o N-metilglicina (MeGly), N-etilglicina (EtGly), alilglicina (allylGly) o ácido 2-aminopent-4-enoico, 2-ciclopentilglicina (Cpg), 2-ciclohexilglicina (Chg), 2,2-dipropilglicina (Dpg), 2-(3-indolil)glicina (IndGly), 2-indanilglicina (Igl), 2-neopentilglicina (NptGly), 2-octilglicina (OctGly), 2-propargilglicina (Pra) o ácido 2-amino-pent-4-inoico, 2-fenilglicina (Phg), 2-(4-clorofenil)glicina, azaglicina (AzGly) o glicinol o 2-aminoetanol,

- 50 - alanina (Ala, A) o ácido 2-aminopropanoico, beta-alanina (β -Ala) o ácido 3-aminopropanoico, deshidroalanina, N-metilalanina, 3-ciclopropilalanina (Cpa), 3-ciclohexilalanina (Cha), 3-ciclopentilalanina, 3-(1-naftil)alanina (1Nal), 3-(2-naftil)alanina (2Nal), 3-(3-piridil)alanina, 3-(2-tienil)alanina (Thi), alaninol o 2-aminopropanol,

- valina (Val, V) o ácido 2-amino-3-metilbutanoico, N-metilvalina (MeVal), norvalina (Nva) y sus derivados metilados y/o hidroxilados, 5-hidroxinorvalina (Hnv) y sus derivados, 3-mercaptopalmina (penicilamina, Pen), valinol o 2-amino-3-metilbutanol,
- 5 - leucina (Leu, L) o ácido 2-amino-4-metilpentanoico, norleucina (Nle) o ácido 2-aminohexanoico, 3-hidroxileucina, 6-hidroxinorleucina, terc-leucina (Tle) o ácido 2-amino-3,3-dimetilbutanoico, homoleucina o ácido 3-amino-5-metilhexanoico, 2,3-deshidroleucina, leucinol o 2-amino-4-metilpentanol,
- isoleucina (Ile, I) o ácido 2-amino-3-metilpentanoico, alo-isoleucina (alle), N-metilisoleucina (Melle), isoleucinol o 2-amino-3-metilpentanol,
- 10 - ácido aspártico (Asp, D) o ácido 2-aminobutanodioico y sus derivados esterificados o amidados lateralmente, ácido 3-metilaspártico, aspartinol,
- asparagina (Asn, N) o ácido 2-amino-3-carbamoilpropanoico o ácido 2-aminosuccinámico y sus derivados N-sustituidos, N-etilasparagina (EtAsn), asparaginol,
- 15 - ácido glutámico (Glu, E) o ácido 2-aminopentanodioico y sus derivados esterificados o amidados lateralmente, ácido piroglutámico (Pyr) o ácido pídólico o 5-oxoprolina, ácido gamma-carboxiglutámico o ácido 4-carboxiglutámico (Gla), glutarinol,
- glutamina (Gln, Q) o ácido 2-amino-4-carbamoilbutanoico y sus derivados N-sustituidos, glutaminol,
- ácido diaminoetanoico, ácido 2,3-diaminopropanoico (Dpr o Dap), ácido 3-mercaptopropanoico (Mpa), ácido 2-amino-3-guanidinopropanoico (Agp), ácido 2-aminobutanoico (Abu), ácido 4-aminobutanoico (4Abu) o GABA, ácido 2-aminoisobutanoico (Aib), ácido 3-aminoisobutanoico (bAib), ácido 2,4-diaminobutanoico (Dab), ácido 3,4-diaminobutanoico (Dbu), ácido 2-amino-4-cianobutanoico (Cba), ácido 2-amino-4-guanidinbutanoico (Agb), ácido 5-aminopentanoico (Ava), ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico (AHPPA), ácido 4-amino-5-ciclohexil-3-hidroxipentanoico (ACHPA), ácido 6-aminohexanoico (Acp o Ahx), ácido para-aminobenzoico (PABA), ácido meta-aminometilbenzoico o ácido 3-aminometilbenzoico, ácido para-aminometilbenzoico (PAMBA) o ácido 4-aminometilbenzoico, ácido 2-aminoadípico (Aad) o ácido 2-aminohexanodioico, ácido 3-aminoadípico (bAad) o ácido 3-aminohexanodioico, ácido 2-aminopimélico (Apm) o ácido 2-aminoheptanodioico (Ahe), ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico o estatina (Sta), ácido 2,2-diaminopimélico (Dpm) o ácido 2,2-diaminoheptanodioico, desmosina (Des) o ácido 2-amino-6-[4-(4-amino-4-carboxibutil)-3,5-bis-(3-amino-3-carboxipropil)piridin-1-il]hexanoico, isodesmosina (Ide) o ácido 2-amino-6-[2-(4-amino-4-carboxibutil)-3,5-bis-(3-amino-3-carboxipropil)-piridin-1-il]hexanoico,
- 20 - ornitina (Orn) o ácido 2,5-diaminopentanoico y sus derivados aminados o amidados en épsilon, canalina o ácido 2-amino-4-(aminooxi)butanoico, ornitinol,
- lisina (Lys, K) o ácido 2,6-diaminohexanoico y sus derivados aminados o amidados en épsilon, homolisina o ácido 2,7-diaminoheptanoico (hLys), 5-hidroxilisina (Hyl) o ácido 2,6-diamino-5-hidroxihexanoico, alo-hidroxilisina (aHyl), 6-N-metillisina (MeLys), S-aminoetilcisteína o ácido 2-amino-3-(2-aminoetiltio)propanoico, 3-metil-S-aminoetilcisteína o ácido 2-amino-3-(2-aminoetiltio)butanoico, lisinol,
- 35 - arginina (Arg, R) o ácido 2-amino-5-guanidinopentanoico o ácido 2-amino-5-(diaminometiliden amino)pentanoico, homoarginina o ácido 2-amino-6-guanidinoheptanoico, N-hidroxiarginina, citrulina (Cit) o ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)pentanoico, ácido 2-amino-5-(4-carbamimidoilfenil)pentanoico, ácido 2-amino-5-(1H-imidazol-2-ilamino)pentanoico, canavanina o ácido 2-amino-4-(guanidinooxi)butanoico, argininol,
- 40 - histidina (His, H) o ácido 2-amino-3-(1H-imidazol-4-il)propanoico y sus derivados sustituidos en N, histinidol,
- serina (Ser, S) o ácido 2-amino-3-hidroxipropanoico y sus derivados sustituidos en O (éteres, etc.), ácido 2-amino-4-hidroxibutanoico u homoserina (Hse) y sus derivados sustituidos en O (éteres, etc.), serinol o 2-amino-propan-1,3-diol,
- 45 - treonina (Thr, T) o ácido 2-amino-3-hidroxibutanoico y sus derivados sustituidos en O (éteres, etc.), alo-treonina (allo-Thr) y sus derivados sustituidos en O (éteres, etc.), treoninol (Thol),
- fenilalanina (Phe, F) o ácido 2-amino-3-fenilpropanoico, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina, 4-fluorofenilalanina, 3,4-difluorofenilalanina, pentafluorofenilalanina, 2-clorofenilalanina, 3-clorofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 3,4-diclorofenilalanina, 4-bromofenilalanina, 3-yodofenilalanina, 4-yodofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 2-metoxifenilalanina, 3-metoxifenilalanina, 4-metilfenilalanina, 4-aminofenilalanina, 4-guanidinofenilalanina, 3,4-dihidroxifenilalanina o DOPA, ácido 2-amino-4-fenilbutanoico u homofenilalanina, 4-bifenililalanina (Bip), 4-benzoilfenilalanina (Bpa), fenilalaninol (Phol)
- 50 - tirosina (Tyr, Y) o ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propanoico y sus derivados sustituidos en O (éteres, etc.), 3-yodotirosina, 3,5-diyodotirosina, 2-bromotirosina, 3,5-dibromotirosina, 2,6-dimetiltirosina, 3-nitrotirosina, 3-sulfotirosina, tirosinol o 2-amino-4-hidroxibenzopropanol,

- triptófano (Trp, W) o ácido 2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoico y sus derivados sustituidos en N, 2-metiltriptófano, 5-hidroxitriptófano (5-HTP), triptofanol,

- cisteína (Cys, C) o ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico y sus derivados sustituidos en S, S-acetilcisteína o ácido 2-amino-3-(acetiltio)propanoico, selenocisteína (Sec, U) o ácido 2-amino-3-(seleno)propanoico, cisteinol,

- metionina (Met o M) o ácido 2-amino-4-(metiltio)butanoico, homometionina o ácido 3-amino-5-(metiltio)pentanoico, metioninol,

- prolina (Pro, P) o ácido pirrolidin-2-carboxílico, homoprolina o ácido 2-(2-pirrolidinil)etanoico, 3-hidroxiprolina (3Hyp), 4-hidroxiprolina (4Hyp), 3-metilprolina, 3,4-deshidroprolina, 3,4-metanoprolina, 4-aminoprolina, 4-oxoprolina, tioprolina o ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz), ácido 2-oxotiazolidin-4-carboxílico, ácido indolin-2-carboxílico (Idc), ácido piperidínico (Pip) o ácido piperidin-2-carboxílico, ácido nipecótico (Nip) o ácido piperidin-3-carboxílico, ácido 4-oxopiperidínico, ácido 4-hidroxipiperidínico, ácido amino-1-ciclohexano carboxílico, prolinol.

Como se ha mencionado, se prefieren los péptidos que comprenden al menos 1, preferiblemente 2 residuos de aminoácidos que permiten ciclar el péptido. Estos aminoácidos se seleccionan típicamente entre Cys, Mpa, Pen, deshidroalanina o allylGly.

La ciclación se consigue típicamente mediante la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína (o Pen), uno presente en el grupo X y el otro en el grupo Y. Por otro lado, una cisteína en posición N-terminal (N-term) también se puede sustituir por un Mpa para la ciclación a través de un puente disulfuro.

Un residuo de cisteína se puede sustituir igualmente por deshidroalanina, para la ciclación a través de un puente de lantionina, o por allylGly para una ciclación por metátesis a través de un puente dicarba.

Un puente lactama se puede crear entre la función ácido lateral de un residuo Glu (o Asp) y una función amino lateral sobre una Lys o una amina N-term. Del mismo modo, se puede realizar una ciclación entre la función amino N-term y la función ácido C-terminal o C-term (cabeza/cola) a través de un enlace amida, como la ciclación entre la función amino lateral de una Lys y la función ácido C-term del péptido.

Preferiblemente, en los péptidos o seudopéptidos de fórmula (I), al menos uno de los grupos X e Y contiene un residuo de cisteína.

En una realización particularmente preferida, los residuos Z y W representan cada uno una cisteína.

Como se ha indicado, M representa un residuo de metionina, o uno de sus isómeros o uno de sus análogos. Los isómeros o análogos de metionina se seleccionan preferiblemente entre Nle, homometionina, Pen, Mpa.

Como se ha indicado, P representa un residuo de prolina, o uno de sus isómeros o uno de sus análogos. Los isómeros o análogos de prolina se seleccionan preferentemente entre los isómeros ciclopenténicos, 3,4-deshidroprolina, 3,4-metanoprolina, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, 3-metilprolina, 4-aminoprolina, 4-oxoprolina, Thz, ácido 2-oxotiazolidin-4-carboxílico, Idc, Pip, Nip, ácido 4-oxopiperidínico, ácido 4-hidroxipiperidínico, ácido amino-1-ciclohexano carboxílico.

Como se ha indicado, R representa un residuo de arginina, o uno de sus isómeros o uno de sus análogos. Los isómeros o análogos de la arginina se seleccionan preferiblemente entre homoarginina, N-hidroxiarginina, Agp Agb, Cit, ácido 2-amino-5-(4-carbamimidofenil)pentanoico, ácido 2-amino-5-(1H-imidazol-2-ilamino)pentanoico, Orn, Lys y sus isómeros/análogos, S-aminoetilcisteína, 3-metil-S-aminoetilcisteína, hLys, Hyl, aHyl, MeLys y sus isómeros/análogos, Nle, ácido diaminoetanoico, Dpr, Dbu.

Entre los péptidos o seudopéptidos de fórmula (I), se prefieren particularmente aquellos en los que:

- i es un número entero seleccionado entre 0, 1, 3 o 4; y/o

- j es un número entero seleccionado entre 0, 3 o 4; y/o

- k es un número entero seleccionado entre 0, 1 o 3; y/o

- l es un número entero seleccionado entre 0, 1 o 3.

Los péptidos o seudopéptidos preferidos en el sentido de la invención tienen la fórmula general (Xaa)_i-Cys(Xaa)_j-Met-Pro-Arg(Xaa)_k-Cys(Xaa)_l, en donde Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural e i, j, k y l son números enteros, iguales o diferentes, comprendidos entre 0 y 5. Preferiblemente, i = 0, 1, 3 o 4; j = 0, 3 o 4; k = 0, 1 o 3; y/o l = 0, 1 o 3.

Ejemplos particulares de péptidos de acuerdo con la invención que tienen la fórmula (I) se describen en las

secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 30 a SEQ ID NO: 65, a continuación:

- SEQ ID NO: 1, HLDCMPRGCFRN;
- SEQ ID NO: 2, ACQVKSMPRC;
- SEQ ID NO: 3, ACTTPMPRLC;
- 5 SEQ ID NO: 4, ACKAPQMPC;
- SEQ ID NO: 5, ACLNPSMPC;
- SEQ ID NO: 6, ACLVSSMPC;
- SEQ ID NO: 7, ACLQPMPC;
- SEQ ID NO: 8, ACPVSSMPC;
- 10 SEQ ID NO: 9, ACQSPMPC;
- SEQ ID NO: 10, ACLTPMPC;
- SEQ ID NO: 11, DSGLCMPRLRGCDPR;
- SEQ ID NO: 30, ACPRLRGCA;
- SEQ ID NO: 31, ASGLCMPRLRGCDPR;
- 15 SEQ ID NO: 32, DAGLCMPRLRGCDPR;
- SEQ ID NO: 33, DSALCMPRLRGCDPR;
- SEQ ID NO: 34, DSGACMPRLRGCDPR;
- SEQ ID NO: 35, DSGLCMPRARGCDPR;
- SEQ ID NO: 36, DSGLCMPRLAGCDPR;
- 20 SEQ ID NO: 37, DSGLCMPRLRACDPR;
- SEQ ID NO: 38, DSGLCMPRLRGCAPR;
- SEQ ID NO: 39, DSGLCMPRLRGCDAR;
- SEQ ID NO: 40, DSGLCMPRLRGCDPA;
- SEQ ID NO: 41, SGLCMPRLRGCDPR;
- 25 SEQ ID NO: 42, GLCMPRLRGCDPR;
- SEQ ID NO: 43, CMPRLRG;
- SEQ ID NO: 44, CMPRARG;
- SEQ ID NO: 45, CMPRLAG;
- SEQ ID NO: 46, CMPRLRAC;
- 30 SEQ ID NO: 47, CMPRLKGC;
- SEQ ID NO: 48, (D)-CMPRLRG;
- SEQ ID NO: 49, CMPR-(D)-LRG;
- SEQ ID NO: 50, CMPRL-(D)-RG;
- SEQ ID NO: 51, CMPRLRG-(D)-C;
- 35 SEQ ID NO: 52, (D)-CMPRLRG-(D)-C;
- SEQ ID NO: 53, (D)-CMPRLRSarC;
- SEQ ID NO: 54, (D)-CMPRKRGC;

SEQ ID NO: 55, (D)-CMPRLRCG;

SEQ ID NO: 56, (D)-CMPRLCRG;

SEQ ID NO: 57, (D)-CMPRCLRG;

SEQ ID NO: 58, CMPRGC;

5 SEQ ID NO: 59, PenMPRLRG;

SEQ ID NO: 60, (D)-PenMPRLRG;

SEQ ID NO: 61, (D)-CMPRLRGPen;

SEQ ID NO: 62, PenMPRLRGPen;

SEQ ID NO: 63, (D)-PenMPRLRGPen;

10 SEQ ID NO: 64, (D)-PenMPRLRG-(D)-Pen;

SEQ ID NO: 65, MpaMPRLRG.

Como se ilustra en la sección experimental, estos péptidos se unen con el LDLR sin competir con LDL, tienen alta afinidad, son capaces de atravesar la BHE y de transportar moléculas de interés.

15 En una realización particularmente preferida, se prefieren los péptidos de fórmula (I) que tienen una configuración cíclica. Se prefiere particularmente el péptido que comprende SEQ ID NO: 11, o una secuencia derivada de la misma, por ejemplo, SEQ ID NO: 30 y 48.

Según otra variante, los péptidos o pseudopéptidos de la invención se seleccionan entre los péptidos de secuencia SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 29 siguientes:

SEQ ID NO: 12, MTVMPTGLWNPLIPS;

20 SEQ ID NO: 13, SASWFAVPIPLRLE;

SEQ ID NO: 14, MTPMSTPRMLPVYVA;

SEQ ID NO: 15, MTATHLSTLFQPLTY;

SEQ ID NO: 16, MSPIPPAASTWANTL;

SEQ ID NO: 17, MTANPLQNAPGPLSL;

25 SEQ ID NO: 18, MQTAPPPPLTRVQWS;

SEQ ID NO: 19, GTPRMHIPLNVDHLP;

SEQ ID NO: 20, LTLPPISGLSSYPLP;

SEQ ID NO: 21, TPSAHAMALQSLSVG;

SEQ ID NO: 22, LTLPPISGLSSYPLP;

30 SEQ ID NO: 23, MGTLNAPTAYPQDSL;

SEQ ID NO: 24, LTNPAYLPQNTDPH;

SEQ ID NO: 25, MGLPLPYIQTILHTP;

SEQ ID NO: 26, SAALIAMSSFKSITA;

SEQ ID NO: 27, SGFAFARSVPTESRR;

35 SEQ ID NO: 28, MTSPYMSLPPSTDDM;

SEQ ID NO: 29, LTNPAYLPQNTDPH.

40 Como se ha indicado anteriormente, los péptidos o pseudopéptidos lineales o cíclicos de la invención pueden comprender enlaces peptídicos, no peptídicos y/o peptídicos modificados. En un modo preferido, los péptidos o pseudopéptidos comprenden al menos un enlace peptidomimético, seleccionado preferiblemente entre la intercalación de un grupo metileno (-CH₂-) o fosfato (-PO₂-), amina secundaria (-NH-) u oxígeno (-O-), alfa-

azapéptidos, alfa-alquilpéptidos, N-alquilpéptidos, fosfonamidatos, depsipéptidos, hidroximetilenos, hidroxietilenos, dihidroxietilenos, hidroxietilaminas, retro-inverso, metilenoxi, cetometileno, ésteres, fosfinatos, fosfínicos, fosfonamidas, análogos carba.

5 Por otra parte, en una realización particular, los péptidos o pseudopéptidos de la invención comprenden una función N-term y/o C-term, respectivamente protegida, por ejemplo, mediante acilación o mediante amidación o esterificación.

Los péptidos o pseudopéptidos de la invención se pueden sintetizar mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica (síntesis química, biológica, genética, etc.). Se pueden almacenar tal cuales o formularlos en presencia de una sustancia de interés o de cualquier excipiente aceptable.

10 Para las síntesis químicas, se utilizan aparatos comerciales que permiten incorporar tanto aminoácidos naturales como no naturales, tales como enantiómeros D y residuos que tienen cadenas laterales con hidrofobicidades e impedimentos estéricos diferentes de los de sus homólogos naturales (aminoácidos denominados exóticos, es decir no codificados), o una secuencia peptídica que contiene uno o varios enlaces peptidomiméticos que pueden incluir especialmente la intercalación de un grupo metileno (-CH₂-) o fosfato (-PO₂-), una amina secundaria (-NH-) o un
15 oxígeno (-O-).

Durante la síntesis, es posible introducir diversas modificaciones químicas, tales como, por ejemplo, poner en el N-term, C-term o en una cadena lateral, un derivado lipídico (o fosfolipídico) o un componente de una nanopartícula, a fin de poder incorporar el péptido o pseudopéptido de la invención en el seno de una membrana lipídica, tal como la de un liposoma constituido por una o varias capas o bicapas lipídicas, o de una nanopartícula.

20 También se pueden obtener los péptidos de la invención, o parte de los mismos de naturaleza proteica, a partir de una secuencia de ácido nucleico que los codifica. La presente invención también tiene por objeto una molécula de ácido nucleico que comprende, o consiste en, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido como se ha definido anteriormente. Más particularmente, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia que codifica un compuesto de fórmula general (I) o que se corresponde a una
25 de las secuencias SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 29 o a una parte del mismo de naturaleza proteínica. Estas secuencias de ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN y pueden estar asociadas a secuencias testigo y/o estar insertadas en vectores de expresión biológicos.

El vector de expresión biológico utilizado se selecciona dependiendo del hospedador al que será transferido. Puede ser por ejemplo un plásmido, cósmido, virus, etc. Estos ácidos nucleicos y vectores de expresión biológicos constituyen objetos particulares de la invención, y son útiles para producir los péptidos de la invención, o parte de los
30 mismos de naturaleza proteica, en un hospedador celular. La preparación de estos vectores de expresión biológicos así como la producción o la expresión en un hospedador de los péptidos, se pueden realizar por técnicas de biología molecular y de ingeniería genética bien conocidas por los expertos en la técnica.

35 Como se ha indicado, los péptidos de la invención son particularmente útiles para formular sustancias de interés terapéutico o de diagnóstico, y en particular para favorecer su biodistribución y/o su paso a través de la BHE.

En este sentido, un objeto de la invención es el uso de un péptido o pseudopéptido lineal o cíclico tal y como se ha definido anteriormente, como vector para la transferencia/transporte de moléculas de interés terapéutico, o de agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o cualquier otra molécula.

40 Otro objeto de la invención consiste en el uso de un péptido o pseudopéptido lineal o cíclico tal como se ha definido anteriormente para la preparación de un fármaco capaz de atravesar la BHE.

Otro objeto de la invención se refiere a un método para mejorar o permitir el paso de una molécula a través de la BHE, que comprende acoplar la molécula a un péptido o pseudopéptido de la invención.

Los péptidos o pseudopéptidos lineales o cíclicos de la invención permiten que un principio activo cruce la BHE que no pasa esta barrera o la pasa poco. Por tanto, se pueden utilizar en el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de
45 cualquier enfermedad que afecta al SNC, y también como transportadores de material biológico (biotransportadores) en el contexto de estudios realizados sobre diversas familias de moléculas con modelos de membranas celulares y más particularmente de BHE.

A este respecto, la presente solicitud describe diferentes compuestos conjugados profármacos que comprenden un péptido o pseudopéptido como se ha definido anteriormente. El término "conjugado" se refiere a una molécula
50 resultante de la combinación de uno o varios péptidos o pseudopéptidos de la invención y una o varias moléculas de interés. Como se describirá con más detalle a continuación, la conjugación puede ser de naturaleza química, tal como a través de un brazo espaciador (enlazador o espaciador), o de naturaleza genética, como por ejemplo la tecnología de recombinación genética, tal como en una proteína de fusión, por ejemplo, con una molécula marcadora o trazadora (por ejemplo, GFP, β-galactosidasa, etc.) o una molécula terapéutica (por ejemplo, un factor
55 de crecimiento, factor neurotrófico, etc.).

Por lo tanto, un objeto particular de la invención se refiere a un compuesto conjugado de fórmula (II) siguiente:



en la que V representa un péptido o pseudopéptido lineal o cíclico de la invención, D representa un principio activo o de interés, y x e y son números enteros comprendidos entre 1 y 5. En una realización particular, x e y son iguales a 1 o x es mayor que y.

A título de ejemplo, se ha sintetizado el conjugado en el que V = cMPRLRGC, x = 1, D = Y-(D)-AGFLR e y = 1. En este caso, el principio activo es un péptido terapéutico analgésico, la dalargina. El acoplamiento directo (síntesis en tándem) de este péptido terapéutico en el N-term del péptido vector SEQ ID NO: 48 proporciona el conjugado SEQ ID NO: 66, Y-(D)-AGFLR-(D)-CMPRLRGC.

Otro objeto particular de la invención se refiere a un compuesto conjugado de fórmula (III) siguiente:



en la que V representa un péptido o pseudopéptido lineal o cíclico de la invención, L representa un brazo espaciador, D representa un principio activo o de interés, x e y son números enteros comprendidos entre 1 y 5, y z es un número entero comprendido entre 1 y 10. En una realización particular, x=y=z= 1 o x= z>y o z>x>y.

A título de ejemplo, las síntesis de los conjugados a través de enlazadores en donde V = cMPRLRGC (con x = 1) y D = Y-(D)-AGFLR (con y = 1) se realizaron con L = GGG o GFLG o ALAL o β-Ala o Ahx o GFAL (con z = 1).

SEQ ID NO: 67, Y-(D)-AGFLRGGG-(D)-CMPRLRGC

SEQ ID NO: 68, Y-(D)-AGFLRGFLG-(D)-CMPRLRGC

SEQ ID NO: 69, Y-(D)-AGFLRALAL-(D)-CMPRLRGC

SEQ ID NO: 70, Y-(D)-AGFLR-β-Ala-(D)-CMPRLRGC

SEQ ID NO: 71, Y-(D)-AGFLR-Ahx-(D)-CMPRLRGC

SEQ ID NO: 72, Y-(D)-AGFLRGFAL-(D)-CMPRLRGC

Los ejemplos contenidos en la presente solicitud muestran, en experimentos de perfusión cerebral en ratones, que estos conjugados son capaces de atravesar la BHE, lo que ilustra el mecanismo de acción de los péptidos vectores de la invención.

El principio activo o de interés puede ser cualquier molécula de interés farmacéutico, en particular un agente terapéutico, de diagnóstico o diagnóstico por imágenes, o una sonda molecular. Se puede tratar especialmente de cualquier entidad química que tenga interés biológico, tal como una molécula química pequeña (antibiótica, antivírica, inmunomoduladora, anticancerosa, antiinflamatoria, etc.), un péptido o polipéptido, una proteína (enzima, hormona, citocina, apolipoproteína, factor de crecimiento, antígeno, anticuerpo o un parte de anticuerpo), un ácido nucleico (ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico de origen humano, vírico, animal, eucariota o procariota, vegetal, sintético, etc.), que puede tener un tamaño variable que va desde un simple oligonucleótido a un genoma o un fragmento de genoma), un genoma vírico o un plásmido, una ribozima, un marcador o un trazador. En general, la "sustancia de interés" puede ser cualquier principio activo de un fármaco, pudiendo ser una sustancia química, bioquímica, natural o sintética. La expresión "molécula química pequeña" significa una molécula de interés farmacéutico que tiene un peso molecular de 1000 Dalton como máximo, típicamente entre 300 y 700 Dalton.

Otro objeto particular de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (IV) siguiente:



en la que V representa un péptido cíclico o pseudopéptido lineal o cíclico de la invención, L representa un brazo espaciador, x es un número entero comprendido entre 1 a 5 y z es un número entero comprendido entre 1 y 10. En una realización particular, x = z = 1 o z>x.

En los compuestos conjugados de la invención, el acoplamiento entre V y D o entre V y L y por un lado y entre L y D, por otro lado, se puede realizar con cualquier medio de unión aceptable, teniendo en cuenta la naturaleza química, las dimensiones y el número de sustancias activas y de péptidos o pseudopéptidos asociados. El acoplamiento se puede realizar de este modo a través de uno o varios enlaces covalentes, hidrófobos o iónicos, escindibles o no en el medio fisiológico o en el interior de las células. Además, D puede estar acoplado a V, opcionalmente a través de L, a nivel de diferentes grupos reactivos, y en particular de un extremo N-term y/o C-term o varios extremos de V, y/o a nivel de uno o varios grupos reactivos transportados por las cadenas laterales de aminoácidos naturales o no, constitutivos de V.

El acoplamiento se puede efectuar en cualquier sitio del péptido o pseudopéptido, en el que los grupos funcionales

tales como -OH, -SH, -CO₂H, -NH₂, -SO₃H, -PO₂H están presentes naturalmente o se han introducido. Por lo tanto, una molécula de agente terapéutico, o un agente de diagnóstico (o de diagnóstico por imágenes) u otra molécula como una sonda molecular, se puede unir (acoplar) al vector peptídico o seudopeptídico lineal o cíclico de la invención a través de un enlace covalente, ya sea a nivel de los extremos N-term o C-term, ya sea a nivel de los grupos reactivos transportados por las cadenas laterales de aminoácidos de origen natural o no, de esta secuencia peptídica.

Del mismo modo, el acoplamiento se puede efectuar en cualquier sitio del principio activo o de interés (molécula de agente terapéutico, agente de diagnóstico o de diagnóstico por imágenes, cualquier otra molécula como una sonda molecular) en donde, por ejemplo, grupos funcionales tales como -OH, -SH, -CO₂H, -NH₂, -SO₃H, -PO₂H están presentes de forma natural o se han introducido.

Se prefiere que la interacción sea lo suficientemente fuerte para que el péptido no se disocie del principio activo antes de haber alcanzado su sitio de acción. Por esta razón, el acoplamiento preferido según la invención es un acoplamiento covalente, pero sin embargo, podría ser un acoplamiento no covalente. La sustancia de interés puede estar acoplada directamente al péptido (síntesis en tándem) o bien a uno de sus extremos terminales (N-term y C-term) o a nivel de una cadena lateral de uno de los aminoácidos que constituyen la secuencia (Figura 2). La sustancia de interés también se puede acoplar indirectamente a través de un brazo de unión o espaciador (síntesis a través de un enlazador), bien a de uno de los extremos terminales de los péptidos, o a nivel de una cadena lateral de uno de los aminoácidos que constituyen la secuencia (Figura 2). Se pueden citar como medios de acoplamiento químico covalente, que emplean un brazo espaciador o no, los seleccionados entre los agentes bifuncionales o multifuncionales que contienen grupos alquilo, arilo o peptídico por ésteres, aldehídos o ácidos de alquilo o arilo, grupos anhídrido, sulfhidrilo o carboxilo, grupos derivados de bromuro o cloruro de cianógeno, carbonildiimidazol, ésteres de succinimida o haluros sulfónicos.

En este sentido, un objeto de la invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto conjugado tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que comprende una etapa de acoplamiento entre un péptido o pseudopéptido V y una sustancia D, opcionalmente a través de L, preferiblemente por vía química, bioquímica, enzimática, o mediante ingeniería genética.

Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica caracterizada por que comprende al menos un compuesto conjugado tal como se ha definido anteriormente y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la invención se refiere a una composición de diagnóstico caracterizada por que comprende un agente de diagnóstico o de diagnóstico por imágenes constituido por un compuesto conjugado tal como se ha definido anteriormente.

El conjugado se puede utilizar en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable. Por sales farmacéuticamente aceptables se entiende, por ejemplo y de manera no limitativa, sales de adición básicas o ácidas farmacéuticamente aceptables, hidratos, ésteres, solvatos, precursores, metabolitos o estereoisómeros, de dichos vectores o conjugados cargados con al menos una sustancia de interés.

La expresión sales farmacéuticamente aceptables se refiere a sales no tóxicas que se pueden preparar generalmente haciendo reaccionar una base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Tales sales conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres. Como ejemplos representativos de tales sales se pueden citar las sales hidrosolubles y no hidrosolubles, tales como acetatos, N-metilglucamin amonio, ansonatos (4,4-diaminoetilbenenos-2,2'-disulfonatos), benzosulfonatos, benzonatos, bicarbonatos, bisulfatos, bitartratos, boratos, bromuros, bromhidratos, buriratos, camsilatos, carbonatos, clorhidratos, cloruros, citratos, clavulatos, dihidrocloratos, difosfatos, edetatos, edetatos de calcio, edisilatos, estolatos, esilatos, fumaratos, gluceptatos, gluconatos, glutamatos, glicolilarsanilatos, hexafluorofosfatos hexilresorcinatos, hidrabaminas, hidroxinaftoatos, yoduros, isotionatos, lactatos, lactobionatos, lauratos, malatos, maleatos, mandelatos, mesilatos, metilbromuros, metilnitratos, metilsulfatos, mucatos, napsilatos, nitratos, 3-hidroxi-2-naftoatos, oleatos, oxalatos, palmitatos, pamoatos (1,1-metilen-bis-2-hidroxi-3-naftoatos o emboatos), pantotenatos, fosfatos, picratos, poligalacturonatos, propionatos, p-toluenosulfonatos, salicilatos, estearatos, subacetatos, succinatos, sulfatos, sulfosalicilatos, suramatos, tanatos, tartratos, teoclatos, tosilatos, trietiodidos, trifluoroacetatos, valeratos.

Las composiciones de la invención comprenden ventajosamente un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar entre los vehículos utilizados convencionalmente según cada uno de los modos de administración. Dependiendo del modo de administración previsto, los compuestos pueden estar en forma sólida, semisólida o líquida. Para las composiciones sólidas tales como comprimidos, píldoras, polvos o gránulos en estado libre o incluidos en cápsulas, el principio activo se puede combinar con: a) diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina; b) lubricantes, por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o de calcio y/o polietilenglicol; c) aglutinantes, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona; d) agentes desintegrantes, por ejemplo almidón, agar, ácido algínico o su sal sódica, o mezclas efervescentes; y/o e) agentes absorbentes, colorantes, aromatizantes y

edulcorantes. Los excipientes pueden ser, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y análogos de calidad farmacéutica. Para las composiciones semisólidas, tales como supositorios, el excipiente puede ser, por ejemplo, una emulsión o una suspensión oleosa, o a base de polialquilenglicol tal como polipropilenglicol. Las composiciones líquidas, particularmente inyectables o incluidas en una cápsula blanda, se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., el principio activo en un disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, suero fisiológico, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, aceites y análogos.

Las composiciones o conjugados de la invención se pueden administrar por cualquier vía adaptada y de manera no limitativa, por vía parenteral, como por ejemplo, en forma de preparaciones inyectables por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular; por vía oral (o *per os*), como por ejemplo, en forma de comprimidos recubiertos o no, cápsulas, polvos, gránulos, suspensiones o soluciones orales (una forma de este tipo para administración oral puede ser bien de liberación inmediata o bien de liberación sostenida o retardada); - vía rectal, como por ejemplo, en forma de supositorios; - vía tópica, en particular transdérmica, como por ejemplo, en forma de parches, pomadas o geles; - vía intranasal, como por ejemplo, en forma de aerosoles y vaporizadores; - vía perlingual; - vía intraocular.

Las composiciones farmacéuticas comprenden típicamente una dosis eficaz de un péptido o pseudopéptido o conjugado de la invención. Una "dosis terapéuticamente eficaz" como se describe en esta memoria, se entiende como la dosis que produce un efecto terapéutico para una afección y un régimen de administración determinados. Se trata típicamente de la dosis media de un principio activo que se va a administrar para mejorar sensiblemente algunos de los síntomas asociados con una enfermedad o un estado patológico. Por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer cerebral o no, una patología, una lesión o un trastorno del SNC, la dosis de un principio activo que disminuye, evita, retrasa, suprime o detiene una de las causas o uno de los síntomas de la enfermedad o del trastorno, sería terapéuticamente eficaz.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un principio activo no cura necesariamente una enfermedad o un trastorno, pero proporcionará un tratamiento para esa enfermedad o ese trastorno, de modo que su aparición se retrasa, se obstaculiza o se impide, o sus síntomas se atenúan, o se modifica su término o, por ejemplo, es menos grave o la recuperación del paciente se acelera.

Se entiende que la "dosis terapéuticamente eficaz" para una persona en particular dependerá de varios factores, que incluyen la actividad/eficacia del principio activo, su hora de administración, su vía de administración, su tasa de excreción y metabolismo, las asociaciones/interacciones medicamentosas y la gravedad de la enfermedad (o trastorno) tratada a título preventivo o curativo, así como la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y/o el régimen alimentario del paciente.

Según la sustancia acoplada, los conjugados y las composiciones de la invención se pueden utilizar para el tratamiento, prevención, diagnóstico o diagnóstico por imágenes de numerosas patologías, en particular patologías que afectan al SNC, patologías infecciosas o cánceres.

A este respecto, la invención se refiere al uso de conjugados o composiciones farmacéuticas tales como las que se han descrito anteriormente para el tratamiento o la prevención de patologías o trastornos del SNC, tumores cancerosos cerebrales u otras células cancerosas y patologías infecciosas cerebrales u otras, de tipo bacteriano, vírico, parasitario o fúngico.

La invención también se refiere al uso de conjugados o composiciones farmacéuticas tales como las que se han descrito anteriormente, para el diagnóstico o el diagnóstico por imágenes de patologías o trastornos del SNC, tumores cancerosos cerebrales o de otras células cancerosas y patologías infecciosas cerebrales u otras, de tipo bacteriano, vírico, parasitario o fúngico.

La invención también se refiere al uso de un conjugado o una composición tales como las que se han definido anteriormente para el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de un tumor canceroso cerebral o de otro tipo de células cancerosas. Los estudios han mostrado en efecto que pacientes con ciertos tipos de cáncer presentan hipocolesterolemia. Esta hipocolesterolemia es la consecuencia de un uso excesivo de colesterol en las células cancerosas. Para sobrevivir, estas últimas inducen un mayor nivel de expresión del LDLR en los órganos tumorales (*Henricksson et al., 1989, Lancet, 2 (8673), 1178-1180*). Existe, pues, una correlación entre el aumento del nivel de expresión de LDLR en las células y ciertos tipos de cáncer. También se ha demostrado recientemente que el número de LDLR era muy importante en la superficie de ciertas células patológicas, tales como las células cancerosas. En general se admite que de 1000 a 3000 LDLR están presentes en la superficie de una célula no patológica. Del mismo modo, las neuronas no patológicas solo tienen un número bajo de LDLR (*Pitas et al., 1987, J. Biol. Chem. 262, 14352-14360*). En el caso del glioblastoma, se ha demostrado una hiperexpresión de LDLR. Por lo tanto, en la superficie de las células cerebrales tumorales se han contado de 125.000 (para las células U-251) a 900.000 (para las células SF-767) LDLR (*Malentiska et al., 2000, Cancer Res., 60, 2300-2303; Nikanjam et al., 2007, Int. J. Pharm., 328, 86-94*). Obsérvese también que muchas de las células tumorales hiperexpresan el LDLR, tales como las del cáncer de próstata (*Chen et al., 2001, Int. J. Cancer, 91, 41-45*), cáncer de colon (*Niendorf et al., 1995, Int. J. Cancer, 61, 461-464*), leucemias (*Tatidis et al., 2002, Biochem. Pharmacol., 63, 2169-2180*), cáncer colorrectal (*Caruso et al., 2001, Anticancer Res., 21, 429-433*), cáncer de mama (*Graziani et al., 2002, Gynecol. Oncol., 85,*

493-497), así como los cánceres de hígado, páncreas, ovarios, pulmón, estómago, etc.

La invención también se refiere al uso de un conjugado o una composición como se han definido anteriormente para el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías infecciosas cerebrales u otras, de tipo bacteriano, vírico, parasitario o fúngico, tales como, y sin limitación, el SIDA o la meningitis, etc. El LDLR también está presente en las células hepáticas. Ahora se sabe que la endocitosis del virus de la hepatitis C (VHC) se puede hacer a través del LDLR. El LDLR podría servir de receptor vírico en una etapa temprana de la infección de los hepatocitos humanos con VHC (*Molina et al., 2007, J. Hepatol., 46 (3), 411-419*). Por tanto, los conjugados de la invención se pueden usar para dirigirse específicamente a las células patológicas, infectadas con virus tales como los de la hepatitis B y C, que expresan el LDLR y/o para modular el proceso de infección de células sanas con virus a través del LDLR.

La invención también se refiere al uso de un conjugado o una composición como se han definido anteriormente para el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías neurodegenerativas tales como, pero no de forma limitativa, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, los accidentes cerebrovasculares (ACV), la encefalopatía espongiiforme bovina, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, etc.

La invención también se refiere al uso de un conjugado o una composición tal como se han definido anteriormente para el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías neurológicas tales como, sin limitación, epilepsia, migraña, encefalitis, dolores del SNC, etc.

La invención también se refiere al uso de un conjugado o una composición tal como se han definido anteriormente para el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías neuropsiquiátricas tales como, pero sin limitación, depresión, autismo, ansiedad, esquizofrenia, etc.

Los términos "tratamiento", "tratar" y otras expresiones similares significan la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico, por ejemplo, inhibir el crecimiento de células cancerosas, muerte de las células cancerosas o mejora de una enfermedad o un trastorno neurológico. El efecto puede ser profiláctico o preventivo para evitar total o parcialmente el agravamiento de una enfermedad o un síntoma de la misma, en una persona enferma, o su propagación en sujetos sanos, y/o puede ser terapéutico con el fin de tratar total o parcialmente una enfermedad y/o sus efectos adversos ligados. El término "tratamiento" tal y como se usa en el presente documento incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, y más particularmente en un ser humano, y comprende: (a) prevenir una enfermedad (por ejemplo, la prevención del cáncer) o una afección que se puede producir en una persona predispuesta a esta patología o trastorno, pero que aún no ha sido diagnosticada como afectada, (b) la desaceleración de una enfermedad (por ejemplo, deteniendo su desarrollo) o (c) aliviar una enfermedad (por ejemplo, reduciendo los síntomas asociados con una enfermedad). Este término "tratamiento" también incluye cualquier administración de un principio activo para curar, sanar, aliviar, mejorar, reducir o inhibir una afección en un individuo o un paciente, y comprende, sin limitación, la administración a una persona que tiene necesidad de un fármaco que comprende un vector o un conjugado tales como los descritos en el presente documento.

La presente invención se refiere además al uso de un péptido o pseudopéptido lineal o cíclico de la invención para aumentar la actividad biológica de un principio activo o de interés (molécula de interés terapéutico, agente de diagnóstico o de diagnóstico por imágenes, cualquier otra molécula como una sonda molecular) al que está acoplado.

La presente invención también se refiere al uso de un péptido o pseudopéptido lineal o cíclico de la invención para reducir la toxicidad del principio activo o de interés (molécula de interés terapéutico, agente de diagnóstico o de diagnóstico por imágenes, cualquier otra molécula como una sonda molecular) a la que está acoplado.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención serán evidentes con la lectura de los ejemplos siguientes, que solo son de naturaleza ilustrativa, y no limitan el alcance de la presente solicitud.

Ejemplos

Ejemplo I

Clonación de LDLR humano y murino en un vector de expresión.

Los péptidos se identificaron basándose en su interacción y afinidad hacia los receptores humanos y murinos en lipoproteínas de baja densidad (hLDLR y mLDLR), implicadas en particular en la endocitosis y transcitosis (transporte transcelular, en particular a través de la BHE) del colesterol. La condición previa a la caracterización de estos péptidos era el establecimiento en las células eucariotas (células de ovario de hámster chino, CHO), unas líneas estables que expresan constitutivamente y con altos niveles el hLDLR y el mLDLR. Estas líneas se utilizan: i) para la caracterización de péptidos que se fijan sobre el hLDLR expresado en la superficie de las células, en su configuración natural; ii) para verificar que el hLDLR y mLDLR pueden internalizar los péptidos seleccionados mediante endocitosis.

La construcción de estas líneas se describe brevemente.

Las secuencias de los ARN mensajeros que codifican el hLDLR y mLDLR están disponibles en las bases de datos (números de orden: NM_000527 y NM_010700 respectivamente). Se seleccionaron los cebadores necesarios para la amplificación de los ADNc mediante PCR, que tienen en su extremo (en negrita) los sitios de restricción necesarios (HindIII y Sall para LDLR humano y KpnI y HindIII para el LDLR murino) para la clonación en el vector de expresión pEGFP-N1 (Clontech):

hLDLR

Cebador directo: ATATATA**AAGCTT**CGAGGACACAGCAGGTCGTGAT

Cebador inverso: TTAATT**GTCGAC**CACGCCACGTCATCCTCCAGACT

mLDLR

Cebador directo: ATATATA**AAGCTT**GACGCAACGCAGAAGCTAAG

Cebador inverso: TTAATT**GGTACC**GTTGCCACATCGTCCTCCAG

Los ARN totales preparados a partir de cerebros humanos y de ratón se transformaron en ADNc mediante transcripción inversa para la amplificación con PCR de fragmentos de ADN que codifican el hLDLR y mLDLR. Después de la amplificación, los productos de la PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción HindIII-Sall y HindIII-KpnI, respectivamente, y se ligaron en el vector de expresión pEGFP-N1 (Clontech) digerido con las mismas enzimas de restricción. Después de la transfección en las células eucarióticas, este vector permite la expresión, bajo el control del promotor de CMV, de LDLR fusionados con GFP en su extremo C-term, es decir en el extremo de sus dominios intracelulares (Figura 3). Después de la transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5α, obtención de colonias aisladas, preparación de ADN de los plásmidos, las estructuras artificiales se secuenciaron completamente en las dos hebras para la verificación.

Ejemplo II

Establecimiento de líneas celulares CHO que expresan de forma estable los LDLR humano y murino.

Las transfecciones transitorias en diversas líneas celulares (CHO, COS, HEK293 y N2A) se realizaron para determinar los niveles de expresión y la localización en la membrana de hLDLR y mLDLR, en células vivas o fijadas. El receptor es visible directamente sobre células vivas, con microscopía de fluorescencia, sin necesidad de inmunotinción, gracias a la fluorescencia verde emitida por GFP fusionada en C-term de estos receptores. Los transfectantes estables se seleccionaron mediante dilución limitante y gracias al gen de resistencia a la geneticina (G418) transportado por el vector de expresión. Estas líneas se amplificaron a la vez que se conservaba una presión de selección. En el ejemplo descrito en esta memoria, la expresión de hLDLR-GFP del tamaño esperado se verificó por transferencia Western sobre lisados celulares con anticuerpos dirigidos contra el LDLR humano y contra la GFP. Una proteína correspondiente a los tamaños combinados de la GFP y el hLDLR (190 kDa) fue reconocida por el anticuerpo anti-hLDLR (Figura 4) y anti-GFP en los extractos celulares preparados a partir de líneas estables. Una línea CHO que expresaba constitutivamente GFP se utilizó como testigo negativo. El anticuerpo anti-hLDLR no detecta ninguna proteína en la línea GFP.

La inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-hLDLR sobre células fijadas (PFA) de las líneas CHO-GFP (utilizada como testigo) y CHO-hLDLR-GFP, muestra que la fusión hLDLR-GFP se expresa bien en las células transfectadas. Experimentos de inmunocitoquímica sobre células no permeabilizadas con Triton X100, muestran que el dominio extracelular de LDLR se detecta bien a nivel extracelular (Figura 5).

Se muestra una colocación entre el hLDLR y su ligando natural LDL, que se volvió fluorescente por la adsorción de Dil, un marcador fluorescente. Este ligando natural fluorescente (Dil-LDL) se internaliza rápidamente (endocitosis) como se visualizó con un microscopio de fluorescencia sobre células fijadas (Figura 6-A). Por el contrario, Dil-LDL no es endocitado por la línea testigo CHO-GFP, o por otra línea testigo de células CHO, por ejemplo, que hiperexpresa por ejemplo el receptor humano de la transferrina (hTfR, Figura 6-B), otro receptor implicado en la transcitosis. Además, la actividad de endocitosis de la línea CHO-LDLR-GFP es específica del ligando de LDLR, puesto que en esta línea no se observa endocitosis de ligando que no sea específico del mismo, a título de ejemplo, la transferrina (Tf) marcada con un fluoróforo rojo (rojo de Texas, Figura 6-C).

La funcionalidad de los receptores (capacidad endocítica) se confirmó por experimentos en tiempo real, con microscopía de fluorescencia con vídeo que mostró que LDL, ligando natural de hLDLR, marcada con Dil es realmente transportada, rápidamente y de manera muy eficaz en las células que expresan hLDLR-GFP, en comparación con las células que expresan solo GFP o las células que expresan otro receptor implicado en la endocitosis, como hTfR (testigos negativos). Por el contrario, experimentos realizados con microscopía de vídeo con Tf marcada con rojo de Texas, que se endocita de manera muy eficaz en las células que expresan hTfR-GFP, confirman que la transferrina no sufre endocitosis en las células de una línea testigo GFP ni en las de una línea

hLDLR.

A pesar de un alto nivel de expresión del hLDLR en las líneas CHO-hLDLR-GFP el sistema de endocitosis no es solo eficaz, sino que conserva su selectividad. La presencia de la fusión GFP no ha alterado ni las propiedades de inserción en la membrana del hLDLR, ni la exposición en la parte exterior de la célula del dominio extracelular del hLDLR, ni la funcionalidad del receptor en los procesos de endocitosis.

Ejemplo III

Cribado de genotecas de varios miles de millones de secuencias peptídicas aleatorias presentadas por virus bacterianos en las líneas CHO-hLDLR-GFP e identificación de virus bacterianos y por lo tanto de secuencias peptídicas que presentan afinidad hacia el hLDLR.

La metodología para cribar las genotecas de secuencias peptídicas aleatorias, presentadas por virus bacterianos se han utilizado en la línea CHO-hLDLR-GFP después del agotamiento de los bancos de virus bacterianos sobre una línea testigo CHO-GFP que expresa solo GFP. Después de un lavado a fondo y elución con ácido, los virus bacterianos fijados sobre las líneas se amplifican mediante infección de bacterias *E. coli* ER 2738 en medio líquido o en placas de Petri. Los cribados reiterativos en líneas celulares de virus bacterianos eluidos y luego reamplificados, ha permitido la caracterización de virus bacterianos que tienen una alta afinidad hacia hLDLR expresado en la superficie de las células. Entre estos virus bacterianos, solo se han seleccionado los que también se unen a la línea de ratón (CHO-mLDLR-GFP).

Se realizaron cinco cribados independientes y un total de aproximadamente 200 clones de virus bacterianos (placas retardadas) se secuenciaron después de la amplificación con PCR de las regiones del genoma del virus bacteriano que codifican los péptidos presentados por estos virus bacterianos. Numerosos virus bacterianos tenían secuencias idénticas. Se obtuvieron dos familias de secuencias de péptidos: péptidos cíclicos con motivo conservado, SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 30 a SEQ ID NO: 65, y péptidos lineales sin motivo conservado SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 29 (véase la lista de secuencias del presente documento).

Los clones de virus bacterianos identificados después de la unión de los péptidos que presentan y que se unen a hLDLR-GFP expresado por la línea celular estable CHO-hLDLR-GFP, se han puesto en presencia de células de las líneas LDLR y después de un lavado a fondo, se han detectado con un anticuerpo dirigido contra la proteína de la envuelta vírica del virus bacteriano, seguido de un segundo anticuerpo acoplado a Alexa 594 (Figura 7). Estos virus bacterianos no se fijan sobre las células de la línea testigo CHO-GFP que solo expresa GFP.

Los lotes de virus bacterianos purificados con títulos idénticos se pusieron en competición en las líneas, y después de un lavado a fondo y elución con ácido, clonación y secuenciación de unos cincuenta virus bacterianos, se identificaron los más afines entre los péptidos cíclicos y lineales.

Los que no se habían seleccionado o conservado para experimentos adicionales, no están desprovistos de interés de ningún modo, no se pueden considerar como no funcionales. Estos péptidos conservan un potencial importante como vectores candidatos, por tanto, también están reivindicados por la presente invención.

Ejemplo IV

Interacción de los péptidos presentados por los virus bacterianos con el hLDLR de las líneas CHO-LDLR-GFP y con el hLDLR de células no modificadas genéticamente.

Los virus bacterianos que presentan péptidos con afinidad hacia el hLDLR se incubaron con células adherentes, sin modificar genéticamente, y conocidas por expresar de forma constitutiva o inducible el hLDLR, en particular fibroblastos humanos, células endoteliales humanas preparadas a partir de cordón umbilical (HUVEC) o células endoteliales microvasculares de cerebro porcino. La metodología inmunocitoquímica con anticuerpos dirigidos contra la proteína de la envuelta vírica del virus bacterianos, muestra que los péptidos con afinidad hacia hLDLR, presentados por los virus bacterianos, también se unen a LDLR presentes en células primarias no modificadas genéticamente, por ejemplo, fibroblastos humanos y células endoteliales microvasculares de cerebro porcino (Figura 8).

La metodología inmunocitoquímica de naturaleza cualitativa se complementó con metodologías cuantitativas de citometría de flujo (FACS) con células en suspensión (línea GFP, línea CHO-hLDLR-GFP, fibroblastos humanos, células HUVEC). Estas células se cultivaron en medio de cultivo, se separaron y se disociaron mecánicamente (sin tripsina), se centrifugaron, se resuspendieron y se incubaron en presencia de diferentes clones de virus bacterianos y del anticuerpo anti-LDLR, durante 20 min a 4°C, para evitar cualquier proceso de endocitosis. Después de los lavados, los virus bacterianos unidos a las células se visualizaron con un anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica. Los análisis por FACS se realizaron con un FACSCanto (Beckton Dickinson) utilizando el programa informático BD FACSDiva. El número de células positivas se estandarizó en 5000 eventos para cada prueba. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia.

Estas metodologías han demostrado una correlación entre la tasa de expresión de hLDLR determinada por el

anticuerpo anti-hLDLR visualizado con el anticuerpo secundario Alexa 488 (eje horizontal) sobre diferentes tipos de células (Figuras 9-11), y un anticuerpo dirigido contra la proteína de la envuelta del virus bacteriano, visualizado con un anticuerpo Alexa 647 o un anticuerpo de alofocianina o APC (eje vertical). Las Figuras 9, 10, 11 se corresponden a los resultados obtenidos para los péptidos SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 21 sobre células de la línea CHO-hLDLR-GFP (Figura 9), fibroblastos humanos (Figura 10) y células HUVEC (Figura 11).

La hipótesis según la cual los péptidos presentados por los virus bacterianos con afinidad hacia hLDLR podrían interaccionar con los dominios de unión de LDL, el ligando natural de hLDLR, se evaluó en varios tipos de células, en particular en células endoteliales HUVEC mediante experimentos FACS, similares a los presentados anteriormente, como se muestra en esta memoria por ejemplo (Figura 12). Inicialmente se muestra que la tasa de unión de los virus bacterianos que presentan péptidos con afinidad hacia hLDLR (SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 11 se usan en esta memoria como ejemplos) es proporcional a la tasa de expresión de LDLR en las células HUVEC. Experimentos FACS realizados en presencia de LDL, han permitido demostrar y cuantificar un desplazamiento importante (85%) del LDL por los péptidos lineales (por ejemplo, SEQ ID NO: 21), pero mínimo (17%) por los péptidos cíclicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 11).

Ejemplo V

Interacción de los péptidos presentados por los virus bacterianos con afinidad hacia hLDLR, con las células endoteliales de vasos cerebrales de ratones *in vivo*.

Los virus bacterianos que presentan péptidos con afinidad hacia el hLDLR (SEQ ID NO: 1 se describe en la presente memoria como ejemplo) y virus bacterianos testigos (que no presentan un péptido afín hacia hLDLR), se inyectaron en la vena de la cola de ratones C57BL6 anestesiados con halotano. Después de 15 min y 2 h de la inyección, los ratones se sacrificaron y se perfundieron con NaCl al 0,9%. El cerebro, el hígado y los riñones se congelaron en isopentano, y se cortaron secciones congeladas para realizar una doble tinción inmunohistoquímica que permitía visualizar por una parte los vasos sanguíneos con una IgG anti-ratón y un anticuerpo anti-proteína de la envuelta vírica que permitía visualizar los virus bacterianos unidos a las células endoteliales *in vivo*. Los experimentos muestran que los virus bacterianos que presentan el péptido SEQ ID NO: 1 con afinidad hacia el hLDLR y el mLDLR, se unen a las células endoteliales de la pared de los vasos, lo que no ocurre en el caso en los virus bacterianos testigos (Figura 13).

Ejemplo VI

Síntesis de los péptidos correspondientes a virus bacterianos con afinidad hacia el hLDLR, acoplamiento a una molécula trazadora (biotina, fluoresceína o S-Tag con actividad enzimática).

Los péptidos se sintetizaron por el método de síntesis en fase sólida (*solid phase peptide synthesis* o SPPS) en un sintetizador automatizado, modelo Advanced ChemTech Apex396 (AAPPTec) o en un sintetizador automático con microondas, modelo Liberty® (CEM), utilizando una estrategia Fmoc/tBu sobre resinas Rink Amide AM de poliestireno-1% de DVB, Wang sobre poliestireno-1% de DVB, Barlos (cloruro de 2-clorotritilo) sobre poliestireno-1% de DVB, o Sieber Amide sobre poliestireno-1% de DVB. La carga (o sustitución) está comprendida entre 0,25 y 1,6 mmol/g según la resina utilizada.

Los aminoácidos N-protectados con Fmoc (o un Boc para ciertos extremos N-term) y/o protectados por funciones ortogonales (ácido-lábiles en particular) a nivel de sus cadenas laterales, los reactivos químicos de acoplamiento y de desprotección y los disolventes, se adquirieron comercialmente en empresas especializadas y se utilizaron tal cuales.

Las resinas Rink Amide y Wang permiten sintetizar las secuencias peptídicas totalmente desprotegidas sobre sus cadenas laterales y sus extremos C-term. Esto se conoce como síntesis peptídica SPPS ortogonal de 2 dimensiones (Fmoc/tBu).

Las resinas "*hypersensitive acid labile* o HAL" de tipo Barlos y Sieber permiten la liberación de la función ácido o amida terminal (en C-term), conservando las protecciones laterales ortogonales de los diferentes aminoácidos del péptido sintetizado, así como la protección amino terminal (N-term) de la función amino de su último aminoácido (por ejemplo, N-acetilación por cuestiones de estabilidad de la secuencia peptídica recién sintetizada). Este tipo de resinas a través de una estrategia de síntesis Fmoc (en Prot₁) permite el uso de protecciones laterales ortogonales ácid-lábiles (Prot₂ de tipo Boc, tBu, OtBu, Trt, Mmt, Acn, etc.) escindibles únicamente en medio fuertemente ácido, mientras que el desacoplamiento del péptido protegido se realiza en condiciones ácidas muy suaves. Este tipo de escisión permite recuperar la secuencia peptídica completamente protegida en sus funciones laterales (Prot₂) de cara al acoplamiento de la molécula de interés terapéutico sobre el péptido. Esto se denomina síntesis peptídica SPPS ortogonal de 3 dimensiones (Barlos o Sieber/Fmoc/tBu).

Las protecciones laterales ortogonales (Prot₂) estándar que se utilizan para cada aminoácido durante la síntesis peptídica son: Arg(N-Pbf), Arg(N-Pmc), Asn(N-Trt), Asp(O-tBu), Cys(S-Acn), Cys(S-Mmt), Cys(S-4MeBn), Cys(S-tBu), Cys(S-Tmob), Cys(S-Trt), Glu(O-tBu), Gln(N-Trt), His(N-Trt), Lys(N-Boc), Ser(O-tBu), Thr(O-tBu), Trp(N-Boc), Tyr(O-tBu) (*Applied Biosystems, 1998, Cleavage, Deprotection, and Isolation of Peptides after Fmoc Synthesis*).

Technical Bulletin). Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Met y Pro no tienen protecciones laterales, ya que sus estructuras químicas no lo requieren.

Los acoplamientos de aminoácidos se realizan a través de la activación de la función ácido del ácido aminado $n + 1$ con ayuda de DIEA/HBTU/HOBt o DIPIC/HOBt en DMF. La desprotección del grupo Fmoc (Prot₁) de un nuevo aminoácido acoplado de este modo se realiza con ayuda de 20% de piperidina en DMF.

El último aminoácido acoplado en la secuencia peptídica estará o bien protegido por una función Boc (para liberar su función amino terminal libre al final de la síntesis) o bien acetilado (para estabilizar el neopéptido sintetizado, y también reducir el riesgo de reacciones secundarias durante el acoplamiento covalente de la molécula de interés terapéutico, por ejemplo, en C-term).

Después de sintetizar el péptido, los puentes disulfuro se obtienen por ciclación intramolecular a partir de 2 funciones tiol de 2 Cys adecuadamente protegidas (Acm, Trt, tBu, etc.), ya sea en solución o sobre la resina, con ayuda de reactivos usados de forma convencional por el experto en la técnica: I₂/DMF, I₂/HFIP/DCM, TFA/DMSO/anisol, I₂/DCM/MeOH/H₂O, etc. Una Cys en posición N-term se puede sustituir ventajosamente por un ácido Mpa para la ciclación a través de un puente disulfuro. Puentes de lantionina (por ciclación a través de deshidroalanina) o dicarba (por ciclación a través de allylGly) también se pueden obtener mediante rutas sintéticas conocidas por el experto en la técnica. Se puede crear un puente lactama entre la función ácido lateral de un residuo Glu (o Asp) y una función amino lateral sobre una Lys o una amina N-term. Del mismo modo, una ciclación entre la función amino N-term y la función ácido C-term (cabeza/cola) se puede lograr a través de un enlace amida, como una ciclación entre la función amino lateral de una Lys y la función ácido C-term del péptido.

La escisión de los péptidos de las resinas Barlos o Sieber se realiza por métodos convencionalmente utilizados por el experto en la técnica, con TFA al 0,5% (v/v) en DCM, o con AcOH/TFE/DCM (1/1/3) o con HFIP (30%) en DCM, o con TFE (30%) en DCM, etc.

La desprotección de las cadenas laterales y la escisión de los péptidos de las resinas Rink Amide o Wang, se produce por métodos utilizados de forma clásica por el experto en la técnica: bien con una mezcla de TFA/H₂O/TIS o TIPS (95/2,5/2,5), o con TFA/H₂O/EDT/TIS o TIPS (94/2,5/2,5/1), o con TFA/tioanisol/H₂O (94/5/1) ya sea con TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2), o con TFA/H₂O/fenol/tioanisol/EDT (82,5/5/5/5/2,5), etc.

Las biotinas, fluoresceínas o S-Tag (véase el Ejemplo VII, más abajo) se introducen en C-term de acuerdo con métodos de síntesis y de acoplamiento convencionales conocidos por el experto en la técnica.

Los péptidos se aíslan y se purifican por HPLC en un aparato Beckman System Gold 126 con una columna Chromolith C18 (4,6 x 50 mm) o Nucleosil C18 (10 x 250 mm) con un gradiente de, por ejemplo, 0 a 100% de acetonitrilo en una fase acuosa (H₂O + 0,1% de TFA) en 3,5 min, a continuación, 100 a 0% en 1,5 min (caudal: 1 a 5 ml/min), o en un sistema Waters 1525 con una columna (fase estacionaria) Chromolith Speed ROD RP-18 (4,6 x 50 mm) con detección con un equipo Waters 996 PDA (190 - 400 nm), o en un sistema Waters Alliance 2690 con una columna (fase estacionaria) Chromolith Performance RP-18 (3 x 100 mm) con detección con un equipo Waters 996 PDA (190 - 400 nm). La detección UV se realiza a 214 y 254 nm.

Las purificaciones preparativas se realizan con un sistema de Waters Prep LC4000 con una columna (fase estacionaria) Guardia-Pak[®] cartuchos Delta-Pak[®] C18 (25 x 10 mm) con detección con un equipo Waters 2487 Dual 1 Absorbance Detector.

Los pesos moleculares se determinan usando un espectrómetro de masas con electronebulización de iones (ESI) en modo positivo. Los espectros se obtienen usando un aparato de Waters MicromassQuattro Micro (analizador cuadrupolo) equipado con un sistema de HPLC Waters Alliance 2690 que permite el acoplamiento LC-MS.

Las condiciones de los análisis LC-MS utilizados fueron las siguientes:

- columna C18 Chromolith Flash (4,6 x 25 mm),

- caudal 3 ml/min,

- gradiente lineal de 0 a 100% de B en 2,5 min (A: H₂O/0,1% de HCO₂H; B: ACN/0,1% de HCO₂H).

La adquisición de los espectros de masas por electronebulización en modo positivo se realiza con un caudal de 100-200 µL/min. Los datos se obtienen en el modo de exploración de 200 a 1700 m/z a intervalos de 0,1 s.

Ejemplo VII

Unión y endocitosis de los péptidos sintetizados, con afinidad hacia el hLDLR en las líneas CHO-LDLR-GFP.

Los péptidos con afinidad hacia hLDLR-GFP, así como los péptidos testigos (péptidos aleatorios, residuos idénticos a los péptidos con afinidad, pero en desorden) se sintetizaron y se acoplaron/conjugaron en C-term con diferentes moléculas "trazadoras", ya fuera rodamina o S-Tag, separados por un brazo espaciador constituido por 3 residuos

Gly (Figura 14). El S-Tag (péptido de 15 aminoácidos obtenido a partir de la secuencia 1-15 de la ribonucleasa A pancreática bovina) puede ser reconocido por un lado por un anticuerpo anti-S-Tag para las metodologías inmunocitoquímicas o FACS, y por otro lado, restaurar una actividad enzimática mediante la unión a la ribonucleasa S-proteína (porción C-term, aminoácidos 21-124) en las pruebas de actividad *in vitro*, utilizando el kit de ensayo FRETWorks S-Tag (Novagen 70724-3). La ribonucleasa así activada digiere un sustrato de ARN que libera un agente fluorescente enmascarado revelado por FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) y cuantificado en placa de 96 pocillos en un espectrofluorímetro Beckmann. Para estos experimentos de FRET, las células CHO testigos y la GFP y fusionada en C-term con el hLDLR y el mLDLR, que genera un ruido de fondo importante en las longitudes de onda utilizadas para la FRET, se ha sustituido por la proteína roja fluorescente (*Red Fluorescent Protein*, RFP). Las líneas estables generadas por los experimentos de FRET son entonces CHO-RFP y CHO-hLDLR-RFP.

Para las metodologías de FRET, las células se lavaron 2 veces con 2 ml de PBS y después se incubaron 1 h a 37°C con 250 µl de solución de péptido. Se lavan de nuevo 2 veces con 2 ml de PBS y después 2 veces con 1 ml de PBS y luego se raspan en 1 ml de PBS y se centrifugan durante 5 min a 1250 rpm. El material sobrenadante se aspira entonces y el sedimento celular se lisa en 80 µl de PBS + 0,1% de Triton X100. Se analizaron veinte µl de cada lisado celular mediante la medición de la emisión de fluorescencia después de la reacción de FRET.

Se realizaron experimentos de incubación de los péptidos sobre diferentes células que expresan el hLDLR. Los resultados obtenidos con el péptido SEQ ID NO: 1 conjugado con rodamina o el péptido SEQ ID NO: 2 conjugado con S-Tag se muestran, por ejemplo, e indican que los péptidos se unen bien a las células CHO-LDLR-GFP y que son endocitados para acumularse en las células de la línea que expresa el hLDLR, que no es el caso de los péptidos testigos (Figura 15). En estos experimentos, las incubaciones preliminares de los péptidos conjugados con S-Tag, con un anticuerpo primario (Ac primario) dirigido contra el S-Tag, y un anticuerpo secundario (Ac secundario) dirigido contra el anticuerpo primario, muestran que el complejo SEQ ID NO: 2/S-Tag/Ac primario/Ac secundario se une a células que expresan hLDLR y se internaliza por endocitosis. Estos resultados indican que los péptidos de la familia SEQ ID NO: 2 pueden unirse a células que expresan hLDL y transportar cargas importantes (2 anticuerpos), es decir, internalización por endocitosis de esas cargas.

La endocitosis de los péptidos con afinidad hacia hLDLR se ha cuantificado. Para este fin, los péptidos SEQ ID NO: 11/S-Tag y testigo (péptido aleatorio) se han incubado con las células CHO-hLDLR-RFP durante 1 h a 37°C. Las células se han lavado para eliminar cualquier traza del péptido no unido. Los lavados se han efectuado por un lado con PBS lo que permite cuantificar mediante FRET los péptidos fijados a la membrana celular y los internalizados por endocitosis (Figura 16-A), por otro lado con una solución ácida (glicina 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 3), lo que permite disociar los péptidos fijados a hLDLR en la membrana celular. Solamente los péptidos endocitados por las células se detectan entonces mediante FRET (Figura 16-B). De manera similar con los péptidos SEQ ID NO: 2/S-Tag sobre fibroblastos humanos (Figura 16-C-D).

Estas observaciones también se han confirmado en células no adherentes mediante FACS. Se da un ejemplo de la unión en las células de la línea CHO-hLDLR-GFP del péptido SEQ ID NO: 11 a la inversa del péptido testigo, estando ambos conjugados con S-Tag (Figura 17).

Ejemplos VIII

Toxicidad, endocitosis y transcitosis de los péptidos sintetizados, con afinidad hacia hLDLR, en células endoteliales en un modelo de BHE *in vitro*.

Los efectos tóxicos potenciales de los péptidos sobre células endoteliales, la unión/acumulación de péptidos en estas células y el paso de los péptidos mediante transcitosis se han evaluado en modelos de BHE *in vitro*. Las células necesarias para la aplicación del modelo (cocultivo de células endoteliales procedentes de los microvasos cerebrales y astrocitos) son células bovinas (*bovine brain microvascular endothelial cells*, BBMEC) distribuidas por la empresa Cellial Technologies (Lens, Francia). Este modelo de BHE *in vitro* se utiliza para evaluar el paso pasivo o el transporte activo de muchas moléculas, en particular de agentes farmacológicos, a través de la BHE y, por lo tanto, su capacidad para llegar al tejido nervioso del SNC. El modelo presenta propiedades ultraestructurales características del endotelio cerebral, en particular uniones estrechas, ausencia de poros, ausencia de canales transendoteliales, baja permeabilidad a las moléculas hidrófilas y una resistencia eléctrica elevada. Además, este modelo ha mostrado una buena correlación entre los resultados de las mediciones realizadas sobre diferentes moléculas evaluadas *in vitro* e *in vivo* por su propiedad de pasar a través de la BHE. Hasta la fecha, todos los datos obtenidos muestran que este modelo de BHE imita de cerca la situación *in vivo* mediante la reproducción de algunas de las complejidades del entorno celular que existen *in vivo*, mientras que se conservan las ventajas asociadas con la experimentación del cultivo de tejidos. Numerosos estudios han validado este cocultivo celular como uno de los modelos más reproducibles de BHE *in vitro*.

El modelo de BHE *in vitro* implica un cocultivo de BBMECs y astrocitos. Antes del cultivo celular, insertos de placa (Millicell-PC 3,0 µM; 30 mm de diámetro) se tratan en la parte superior con colágeno de cola de rata para permitir una adhesión óptima de las BBMECs y crear las condiciones de una lámina basal. Los cultivos primarios de astrocitos mixtos se establecen a partir de la corteza cerebral de rata recién nacida (*Dehouck et al., 1990, J.*

Neurochem., 54, 1798-1801). Brevemente, después de extirpar las meninges, el tejido cerebral se pasa a través de una malla de nilón de 82 µm. Los astrocitos se distribuyen en los pocillos de microplacas a una concentración de $1,2 \times 10^5$ células/ml y 2 ml de medio de cultivo óptimo (DMEM) complementado con 10% de suero de ternera fetal termoinactivado. El medio se cambia dos veces por semana. Las BBMECs obtenidas de Cellial Technologies se cultivan en presencia de medio DMEM complementado con 10% (v/v) de suero de caballo y 10% de suero de ternera termoinactivado, glutamina 2 mM, 50 µg/ml de gentamicina y 1 ng/ml de factor de crecimiento básico de fibroblastos, añadido cada dos días. Las BBMECs se distribuyen a continuación en la cara superior de los filtros en 2 ml del cocultivo. Este medio de BBMECs se cambia tres veces a la semana. En estas condiciones, las BBMECs diferenciadas forman una monocapa de células confluentes, 7 días después. Los experimentos descritos a continuación se realizan entre 5 y 7 días después de alcanzar la confluencia.

El péptido SEQ ID NO: 1 y un péptido testigo, ambos conjugados con rodamina, se incubaron en la cámara superior del sistema de cultivo, en contacto con las células endoteliales durante 1 h, 4 h y 24 h. El medio de cultivo de la cámara inferior se recoge en tiempos diferentes y la fluorescencia se cuantifica mediante análisis fluorométrico. Los resultados se expresan en permeabilidad de superficie endotelial (o PE) expresada en 10^{-3} cm/min. El *Lucifer Yellow* (LY), una pequeña molécula fluorescente que pasa poco la BHE, se emplea por una parte para controlar la integridad de la BHE *in vitro* en todos los pocillos analizados, pero por otro lado, en coincubación con los péptidos, con el fin de controlar la ausencia de toxicidad de los péptidos para las células endoteliales que forman esta BHE. La barrera *in vitro* se considera "permeable" o "abierta" si el valor del paso Pe de LY excede a $1 \cdot 10^{-3}$ cm/min. La medición de la *Trans Endothelial Electrical Resistance* (TEER), evaluada con un ohmímetro y expresada en Ohm.cm², también permite medir la integridad de la BHE *in vitro* durante los ensayos del paso a través de esta BHE. El valor del umbral de calidad se fija en >500 Ohm.cm².

Los análisis realizados con los péptidos muestran una falta de toxicidad del péptido SEQ ID NO: 1, igual que para el péptido testigo utilizado y una ausencia de efectos perjudiciales sobre las propiedades de la permeabilidad de la BHE, ya que los valores de Pe medidos con el LY no aumentan en presencia o ausencia de los péptidos, incluso después de 24 horas de incubación (Figura 18).

La tasa de unión y/o internalización de un péptido testigo y del péptido SEQ ID NO: 1, ambos conjugados con rodamina, se ha determinado en el modelo de BHE *in vitro* descrito anteriormente. Este análisis se ha realizado mediante lisis de las células endoteliales en varios momentos (2 h, 5 h, 24 h), y se mide por fluorimetría de la cantidad de fluorescencia (rodamina), asociada a las células (compartimentos membranales y citoplásmicos obtenidos por centrifugación de las células después de la lisis). Los valores medidos indican que el péptido SEQ ID NO: 1 conjugado con rodamina tiene más afinidad hacia las células endoteliales en un modelo de BHE *in vitro* que el péptido testigo en todos los momentos analizados (Figura 19).

El paso de un péptido testigo y del péptido SEQ ID NO: 1, ambos conjugados con rodamina, se ha determinado en el modelo de BHE *in vitro* descrito anteriormente. Este análisis se realiza midiendo por fluorimetría la cantidad de fluorescencia acumulada en el pocillo receptor en distintos momentos (1 h, 4 h, 24 h). La integridad de la BHE en los diferentes pocillos analizados se evalúa mediante la medición simultánea de la tasa de LY que pasa de un compartimento a otro en función del tiempo. Los valores de Pe medidos indican que en los tiempos cortos (1 h y 4 h), las tasas de péptido SEQ ID NO: 1, que pasan por transcitosis no se pueden distinguir del paso no específico o paracelular, tal como se mide con el péptido testigo. Por el contrario, a las 24 h, la tasa de paso del péptido SEQ ID NO: 1 conjugado con rodamina es muy significativamente superior a la del péptido testigo. Las mediciones de LY también muestran que la integridad de la BHE se conserva al cabo de 1 h, 4 h y 24 h (Figura 20). Otras mediciones muestran que la concentración de péptido SEQ ID NO: 1 conjugado con rodamina es mucho mayor en el compartimento receptor a las 24 horas, en comparación con la del compartimento donador, lo que sugiere un transporte activo del péptido, sin duda a través de los receptores, de lo contrario se habría alcanzado un equilibrio de la concentración entre los 2 compartimentos.

Ejemplo IX

Optimización química del péptido vector SEQ ID NO: 11.

Un estudio de las relaciones estructura/actividad (afinidad) se ha realizado sobre el péptido vector SEQ ID NO: 11 por medio de la técnica de barrido de alanina (Ala-scan) y por truncamiento en N-term y C-term con el fin de determinar la importancia de cada uno de los 15 aminoácidos constituyentes de este péptido. La afinidad hacia el hLDLR de cada uno de los péptidos recién sintetizados obtenidos por optimización química, se ha determinado por fluorimetría midiendo la tasa de desplazamiento del péptido SEQ ID NO: 11 conjugado en C-term a través de un brazo espaciador de 3 Gly con el péptido S-Tag (SEQ ID NO: 11/S-Tag) (véase el Ejemplo VII).

Brevemente, las células utilizadas CHO-hLDLR-RFP son adherentes y confluentes. Se cultivan en placas de 6 pocillos. Tres pocillos de células se utilizan por condición.

Una solución que contiene 10 µM de péptido SEQ ID NO: 11/S-Tag se prepara en medio de cultivo HamF12-1% de BSA. A esta solución se añaden 10 µM de péptido resultante de la exploración Ala-scan que se va a evaluar (competición).

Diversas soluciones testigos también se preparan:

(i) Medio HamF12- 1% de BSA.

(ii) Medio HamF12- 1% de BSA + 10 μ M de péptido testigo CTRL-S-Tag (evaluación de la unión no específica de cualquier péptido que comprende un S-Tag).

5 (iii) Medio HamF12- 1% de BSA + 10 μ M de péptido SEQ ID NO: 11/S-Tag + 10 μ M de péptido testigo CTRL (evaluación de la competencia "no específica" entre el péptido de interés y el péptido testigo CTRL).

Las metodologías FRET utilizadas son las descritas en el Ejemplo VII.

Se han sometido a ensayo aproximadamente sesenta péptidos con estas metodologías. Treinta seis de estos péptidos (SEQ ID NO: 30 a SEQ ID NO: 65) presentan afinidad *in vitro* hacia LDLR.

10 Este estudio también confirma por otro lado, la importancia de las cisteínas y por lo tanto del ciclo y del motivo tripeptídico MPR.

Este estudio también ha permitido reducir el tamaño del péptido vector ya que el péptido cíclico de 8 aminoácidos (SEQ ID NO: 48) que comprende al menos un aminoácido de configuración D, tiene una gran afinidad hacia el LDLR.

15 Según el mismo protocolo, SEQ ID NO: 48/S-Tag sirve como referencia para la optimización química (estudio del tamaño del anillo, la introducción de aminoácidos no naturales) del péptido-vector SEQ ID NO: 48, y la medición de la afinidad de los conjugados hacia LDLR.

Por lo tanto, los conjugados SEQ ID NO: 66 a SEQ ID NO: 72, que se describen en la presente solicitud, también tienen afinidad *in vitro* hacia LDLR.

20 Ejemplo X

Estrategia para la síntesis química de conjugados vector/molécula de interés terapéutico o como agente de formación de imágenes (o de diagnóstico) o cualquier otra molécula como una sonda molecular.

25 Una molécula de interés terapéutico o agente de formación de imágenes o de diagnóstico o cualquier otra molécula como una sonda molecular se puede liberar del vector después del transporte y del paso a través de las membranas celulares y en particular de la BHE, por ejemplo a través de una estrategia profármaco mediante hidrólisis o escisión enzimática de un enlace químico entre el vector y el principio activo.

30 El acoplamiento covalente entre el vector peptídico totalmente protegido en sus funciones reactivas laterales (en caso de acoplamientos en N-term y C-term) o parcialmente protegido (en caso de acoplamiento sobre una función reactiva de una cadena lateral), y la molécula de interés terapéutico, se realiza a través de 2 estrategias generales (Figura 2):

- síntesis en tándem (es decir, acoplamiento directo sin intermediario entre las 2 entidades),
- síntesis a través de un enlazador (*Temsamani et al., 2004, Drug Discov. Today, 23, 1012-1019*).

35 Por ejemplo, la síntesis en tándem del conjugado peptídico SEQ ID NO: 66 entre un péptido terapéutico analgésico, dalargina, y el péptido vector SEQ ID NO: 48, se ha realizado como se ha descrito para la síntesis de péptidos en el Ejemplo VI.

A título de ejemplo, las síntesis a través de enlazadores peptídicos (GGG GFLG, ALAL, β -Ala, Ahx, GFAL) de los conjugados peptídicos SEQ ID NO: 67 a SEQ ID NO: 72 entre un péptido terapéutico analgésico, dalargina, y el péptido vector SEQ ID NO: 48, se han realizado como se ha descrito para la síntesis de péptidos en el Ejemplo VI.

40 Dependiendo del vector peptídico seleccionado y de la molécula de interés terapéutico elegida, se aplica una u otra de las diferentes estrategias, ya sea sobre el C-term, ya sea sobre el N-term, o sobre una función reactiva de una cadena lateral. Idealmente, los brazos espaciadores seleccionados deben permitir una buena liberación del principio activo y la mejora de la solubilidad del conjugado (*Molema et al., 2001, Drug targeting, organspecific strategies. In Methods and principles in medicinal chemistry, vol. 12*). Se pueden generar así diversos enlaces químicos covalentes lábiles entre las 2 entidades (vector y principio activo) a través o no de un brazo espaciador: amidas, carbamatos, ésteres, tioéster, disulfuro, etc. Por ejemplo, se ha mostrado en la bibliografía que los enlaces disulfuro, relativamente estables en el plasma, se pueden escindir dentro del compartimento intracraneal para restaurar una función tiol libre (*Saito et al., 2003, Adv. Drug. Deliv. Rev., 55, 199-215*).

50 Otros compuestos interesantes son aquellos en los que el brazo espaciador representa un polímero tal como polietilenglicol (PEG). De hecho, se ha mostrado en la bibliografía que la combinación de una molécula orgánica de interés biológico con un PEG permitía aumentar la semivida plasmática de esta molécula (*Greenwald et al., 2003,*

Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 217-250) y reducir su aclaramiento.

Los conjugados vectores/principios activos o de interés se pueden utilizar en diagnóstico, formación de imágenes o terapia de una patología, lesión o trastorno del SNC para la preparación de un fármaco capaz de atravesar la BHE, de un tumor canceroso del cerebro u otro tipo de células cancerosas para la preparación de un fármaco capaz de atravesar las membranas celulares cancerosas, y/o de patologías infecciosas para la preparación de un fármaco capaz de atravesar las membranas celulares y dirigirse a las células infectadas de patologías infecciosas, cerebrales u otras de tipo bacteriano, vírico, parasitario o micótico.

Ejemplo XI

Perfusión cerebral *in situ* para los vectores y los conjugados vector/molécula de interés terapéutico o agente de formación de imágenes (o de diagnóstico) o cualquier otra molécula como una sonda molecular, y estudio de su cinética de transporte a través de la BHE, y su acumulación en el cerebro de ratones.

La técnica de la perfusión cerebral *in situ* (en ratón macho adulto OF1) se utiliza aquí para seleccionar los mejores vectores y proporcionar la prueba de su mecanismo de acción para su paso al cerebro a través de la BHE.

Previamente, los vectores peptídicos se radiomarcaron con tritio (^3H), que proporciona la mayor sensibilidad para la detección de compuestos radiactivos, en particular en secciones de tejidos. La preparación de los péptidos radiactivos con alta radiactividad específica (RAS, que puede alcanzar hasta 100 Ci/mmol) se lleva a cabo mediante una estrategia de acilación de la función amino N-term con anhídrido propiónico (o propanoico) tritiado o propionil-N-succinimida (NPS) tritiada. Este método de trititación se puede aplicar a todos los péptidos, siempre que la modificación del N-term no afecte a la afinidad de los péptidos hacia el receptor diana (es decir, LDLR) o a su actividad biológica en el caso de péptidos terapéuticos.

La reacción de trititación de los péptidos vectores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 48 en N-term mediante propionilación se lleva a cabo en DMF (1 mg de péptido en 100 a 450 μl según la solubilidad) mediante la adición de 0,1 equivalentes de NPS tritiada durante 5 minutos a T ambiente y 0,9 equivalente de NPS fría (sin tritiar) durante 1 h, a continuación, un nuevo equivalente de NPS fría durante 5 horas. A continuación, se deja el medio de reacción a 4°C durante la noche y se purifica por HPLC al día siguiente. La RAS para cada péptido tritiado está comprendida entre 5 y 10 Ci/mmol (teóricamente aproximadamente 7,7 Ci/mmol). La cantidad total de radiactividad preparada sintéticamente está comprendida entre 600 y 950 μCi .

En el caso de conjugados vectores/principios activos, es importante, para evitar las síntesis químicas radiomarcadas que requieren el desarrollo de nuevas vías de síntesis largas y costosas, elegir un principio activo modelo ya comercializado marcado con carbono 14 (^{14}C). El acoplamiento covalente de los péptidos radiomarcados (con ^3H por ejemplo) con un principio activo radiomarcado (con ^{14}C , por ejemplo) se lleva a cabo como se ha descrito en el Ejemplo X. Como se ha mencionado anteriormente, este acoplamiento covalente se realiza en función de la estructura y de las propiedades físicoquímicas del principio activo, en particular, la presencia de grupos químicos funcionales que se pueden modificar sin disminuir la actividad biológica de esta sustancia. Las síntesis de los conjugados radiomarcados se realizan por extrapolación a partir de rutas sintéticas puestas a punto o los conjugados no radiomarcados.

Otra estrategia consiste en la síntesis de un conjugado entre un péptido terapéutico y un péptido vector a través de un enlazador (que puede ser de naturaleza peptídica u orgánica) o no, como en el caso de los conjugados SEQ ID NO: 66 a SEQ ID NO: 72 descritos en la presente solicitud. Así, el conjugado SEQ ID NO: 72 tritiado en N-term se ha preparado tal como se ha descrito anteriormente.

Las técnicas que se resumen brevemente a continuación, fueron desarrolladas para estudiar la distribución cerebral de principios activos y, en particular, el papel de la BHE y más particularmente del LDLR, en la penetración de estas moléculas en el cerebro. Las técnicas de perfusión cerebral *in situ* se encuentran entre las más exigentes técnicamente y las más difíciles de lograr en ratones. Sin embargo, la perfusión cerebral *in situ* (como los modelos *in vitro*) permite un control total de la composición del perfundido artificial, para mantener las células y la vascularización del cerebro en condiciones fisiológicas y anatómicas normales en el seno del animal, sin el factor perturbador de distribución sistémica.

Esta estrategia de perfusión cerebral *in situ* normalmente realizada en ratas, se ha adaptado a ratones (*Dagenais et al.*, 2000, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 20(2), 381-6) para ampliar su aplicación para evaluar los parámetros cinéticos de transporte a nivel de BHE y de la barrera hemato-retiniana, en ratones transgénicos y mutantes KO para los receptores, enzimas o transportadores de principios activos. Se trata de un cateterismo de una carótida en ratones OF1 anestesiados, y la ligadura de ciertas ramas de esta carótida (externa, tiroidea, occipital) para perfundir específicamente la carótida interna y las arterias pterigopalatinas, que se utilizan para evaluar la captación cerebral de vectores y conjugados. El catéter permite sustituir la circulación general por una infusión con un perfundido bien controlado (tampón bicarbonato, plasma o sangre) pasando por la arteria carótida. El tampón bicarbonato de Krebs oxigenado se utiliza en primer lugar para evaluar la capacidad de paso cerebral de los vectores y conjugados. Después de la cateterización de la arteria carótida, el caudal sanguíneo endógeno se detiene seccionando los ventrículos del corazón con el fin de evitar la mezcla del tampón con la sangre y la elevación de la presión arterial.

La duración de la perfusión con caudal fijo se controla. La perfusión con tampón se puede prolongar hasta 20 minutos o hasta 1 h, en presencia de transportadores de oxígeno (eritrocitos lavados) para los estudios de transporte mediado por receptores (*Receptor-Mediated Transport*, RMT).

- 5 El estudio del péptido vector SEQ ID NO: 11 ha permitido determinar su transporte cerebral o coeficiente de transferencia (Kin). El tiempo de perfusión cerebral para estos experimentos es de 5 min con un caudal de perfundido de 2 ml/min. Por lo tanto, el cálculo de Kin (volumen de distribución en el tiempo de perfusión cerebral) del péptido vector SEQ ID NO: 11 da un valor de $3,5 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ ml/s/g.

Obsérvese que la transferrina (Tf) tiene un Kin de $3,0 \times 10^{-4}$ ml/s/g (*Demeule et al., 2008, J. Neurochem., 106 (4), 1534-1544*). El Kin de la proteína RAP es de $1,0 \times 10^{-5}$ ml/s/g (*Pan et al., 2004, J. Cell Sci., 117, 5071-5078*).

- 10 La optimización química del péptido vector SEQ ID NO: 11 en un péptido vector optimizado SEQ ID NO: 48 ha permitido mejorar el paso cerebral del péptido vector en un factor 1,37. El péptido (SEQ ID NO: 73, CMPRC) ha servido como testigo para este estudio de perfusión cerebral.

Kin de SEQ ID NO: 48 = $4,8 \pm 0,4 \times 10^{-4}$ ml/s/g

Kin de SEQ ID NO: 73 = $1,5 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ ml/s/g

- 15 Como se ha descrito anteriormente, la conjugación química de dalargina (SEQ ID NO: 74, Y-(D)-AGFLR) a través de un enlazador en N-term del péptido vector (SEQ ID NO: 48) ha permitido obtener el conjugado SEQ ID NO: 72.

La dalargina (SEQ ID NO: 74) libre no transportada ha servido de testigo para este estudio de perfusión cerebral.

Por lo tanto, el paso cerebral de la dalargina transportada (SEQ ID NO: 72) en relación con su forma libre no transportada (SEQ ID NO: 74) se multiplica por un factor 21,78.

- 20 Kin de SEQ ID NO: 72 = $19,6 \pm 3,9 \times 10^{-4}$ ml/s/g

Kin de SEQ ID NO: 74 = $0,9 \pm 0,1 \times 10^{-4}$ ml/s/g

- 25 Por otra parte, este tipo de experimento de perfusión cerebral *in situ* también permite establecer una distinción entre los compuestos que permanecen en el compartimento vascular cerebral de los que han cruzado la membrana endotelial abluminal para entrar en el parénquima cerebral. De hecho, la técnica de agotamiento capilar post-perfusión permite medir si la molécula atraviesa en realidad el endotelio para entrar en el parénquima cerebral. El uso de esta técnica permite demostrar que los vectores peptídicos específicos (o los conjugados) tienden tendencia a acumularse en el parénquima cerebral. Esta técnica (*Triguero et al., 1990, J. Neurochem., 54(6), 1882-8*) se utiliza para distinguir entre la fracción de vectores (o conjugados), que ha transitado por el endotelio y ha entrado en el cerebro a través del espacio extracelular o las células del cerebro, y la fracción que se queda asociada a las células endoteliales.

- 30 Por lo tanto, las etapas clave de los estudios de perfusión cerebral *in situ* en ratones, se pueden resumir de la siguiente manera para los vectores y conjugados estudiados:

i) Evaluación de la tolerancia (no toxicidad) de los vectores y conjugados a nivel de la BHE, conservación de la integridad de esta barrera fisiológica.

- 35 ii) Estudio de la cinética y la linealidad de la captación cerebral a través de RMT por el LDLR.

iii) Estudio de la tasa de captación cerebral en función de la concentración en vectores o conjugados (Tmax, Km).

iv) Estudio de los mecanismos de transporte con ayuda de sustratos inhibidores o moduladores del LDLR.

v) Distribución en los compartimentos del cerebro: depleción capilar (*Triguero et al., 1990, J. Neurochem. 5 (6), 1882-8*).

- 40 vi) Evaluación de la tasa de unión de los vectores y conjugados a las proteínas plasmáticas (albúmina, etc.), estudio de su influencia sobre la captación cerebral de estas moléculas.

vii) Administración intravenosa y evaluación de la distribución tisular (cerebro y otros órganos intravenosa) en función del tiempo.

- 45 Además, también se han determinado los Kin de estos diferentes péptidos, a través de la barrera hemato-retiniana (BSR).

Kin de SEQ ID NO: 11 = $1,2 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ ml/s/g

Kin de SEQ ID NO: 48 = $2,4 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ ml/s/g

Kin de SEQ ID NO: 73 = $0,0 \pm 0,0 \times 10^{-4}$ ml/s/g

Kin de SEQ ID NO: 72 = $11,5 \pm 3,3 \times 10^{-4}$ ml/s/g

Kin de SEQ ID NO: 74 = $1,8 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ ml/s/g

5 Por lo tanto, el paso de la dalargina transportada (SEQ ID NO: 72) a través de la BSR se multiplica por un factor 6,39 en comparación con su forma libre no transportada (SEQ ID NO: 74).

REIVINDICACIONES

1. Péptido o seudopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos naturales y/o no naturales, caracterizado por que se une al receptor humano de las lipoproteínas de baja densidad (hLDLR) en la superficie de membranas celulares, y por que responde a la fórmula general (I) siguiente:

5
$$(Xaa)_j Z(Xaa)_j - M - P - R - (Xaa)_k W(Xaa)_l \quad (I)$$

en donde Xaa representa un aminoácido natural o no y comprende un aminoácido de configuración D, un aminoácido no codificado o un aminoácido que contiene un enlace peptidomimético; Z y W representan dos aminoácidos idénticos o diferentes que permiten ciclar el péptido; i, j, k y l son números enteros, idénticos o diferentes, comprendidos entre 0 y 5; M indica metionina o uno de sus isómeros o uno de sus análogos, P indica prolina o uno de sus isómeros o uno de sus análogos, R indica arginina o uno de sus isómeros o uno de sus análogos.

2. Péptido o seudopéptido según la reivindicación 1, caracterizado por que i es un número entero seleccionado entre 0, 1, 3 o 4; j es un número entero seleccionado entre 0, 3 o 4; k es un número entero seleccionado entre 0, 1 o 3; y/o l es un número entero seleccionado entre 0, 1 o 3.

3. Péptido o seudopéptido según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que los aminoácidos que permiten la ciclación del péptido se seleccionan entre cisteína (Cys), ácido 3-mercaptopropanoico (Mpa), penicilamina (Pen), deshidroalanina, alilglicina (allylGly), ácido glutámico, ácido aspártico o lisina, preferiblemente Z y W representan una cisteína.

4. Péptido o seudopéptido, caracterizado por que se une al receptor humano de las lipoproteínas de baja densidad (hLDLR) en la superficie de membranas celulares y por que se selecciona entre los péptidos de secuencia SEQ ID NOs: 1 a 65.

5. Péptido o seudopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que tiene una configuración cíclica.

6. Péptido o seudopéptido lineal o cíclico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que comprende al menos un enlace peptidomimético, seleccionado preferiblemente entre la intercalación de un grupo metileno (-CH₂-) o fosfato (-PO₂-), amina secundaria (-NH-) u oxígeno (-O-), alfa-azapéptidos, alfa-alkilpéptidos, N-alkilpéptidos, fosfonamidatos, depsipéptidos, hidroximetilenos, hidroxietilenos, dihidroxietilenos, hidroxietilaminas, retro-inverso, metilenoxi, cetometileno, ésteres, fosfinatos, fosfínicos, fosfonamidas, análogos carba.

7. Péptido o seudopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la función N-terminal (N-term) y/o C-terminal (C-term), se protege respectivamente mediante acilación o mediante amidación o esterificación.

8. Uso de un péptido o seudopéptido lineal o cíclico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para transportar un principio activo o de interés en diagnóstico, formación de imágenes o terapia, o para aumentar la actividad biológica o disminuir la toxicidad de un principio activo o de interés al que está acoplado.

9. Compuesto conjugado de fórmula (II) siguiente:

$$VxDy \quad (II)$$

en la que V representa un péptido o seudopéptido lineal o cíclico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, D representa un principio activo o de interés, y x e y son números enteros comprendidos entre 1 y 5.

10. Compuesto conjugado de fórmula (III) siguiente:

$$VxLzDy \quad (III)$$

en la que V representa un péptido o seudopéptido lineal o cíclico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, L representa un brazo espaciador, D representa un principio activo o de interés, x e y son números enteros comprendidos entre 1 y 5, y z es un número entero comprendido entre 1 y 10.

11. Compuesto conjugado según la reivindicación 10, caracterizado por que $x=z=y=1$ o $x=z>y$ o $z>x>y$.

12. Compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado por que está representado por los péptidos de secuencia SEQ ID NO: 66 a SEQ ID NO: 72.

13. Compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado por que el principio activo o de interés es una molécula de interés terapéutico, un agente de diagnóstico o de diagnóstico por imágenes, o una

sonda molecular, seleccionada preferiblemente entre una pequeña molécula química, un péptido o polipéptido, una proteína, un antígeno, un anticuerpo o una parte de anticuerpo, un ácido nucleico o un oligonucleótido, una ribozima, un marcador o un trazador.

5 14. Compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado por que el acoplamiento entre V y D o entre V y L por un lado, y entre L y D por otro lado, se realiza por uno o varios enlaces covalentes, hidrófobos o iónicos, escindibles o no en medio fisiológico o en el interior de las células.

10 15. Compuesto conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizado por que D está acoplado a V, opcionalmente a través de L, a nivel de un extremo o los extremos N-term y/o C-term de V y/o a nivel de uno o varios grupos reactivos transportados por las cadenas laterales de aminoácidos naturales o no, constitutivos de V.

16. Procedimiento para la preparación de un compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 9 a 15, caracterizado por que comprende una etapa de acoplamiento entre un péptido o pseudopéptido V y una sustancia D, opcionalmente a través de L, preferiblemente por vía química, bioquímica, enzimática o por ingeniería genética.

15 17. Composición farmacéutica caracterizada por que comprende al menos un compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 9 a 15 y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

18. Composición de diagnóstico caracterizada por que comprende un agente de diagnóstico o de diagnóstico por imágenes constituido por un compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 9 a 15.

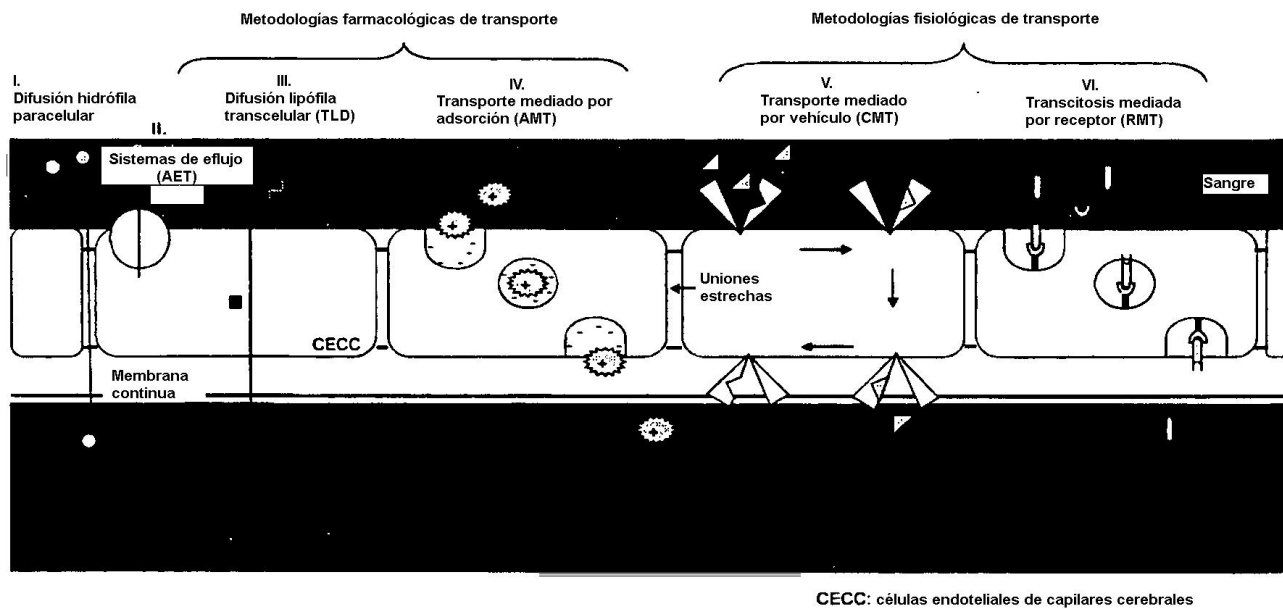
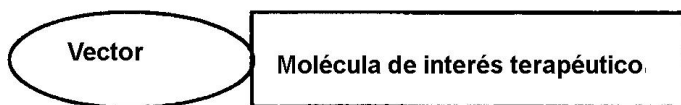


Figura 1

a). Síntesis en tándem



b). Síntesis a través de un enlazador

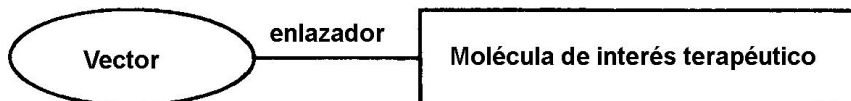


Figura 2

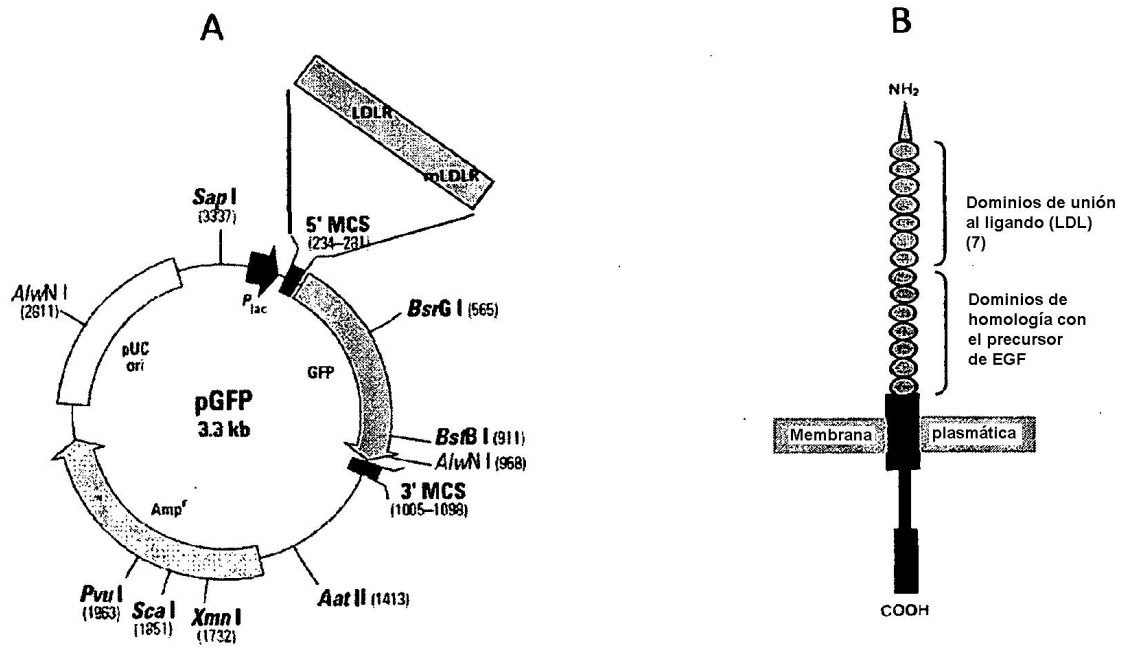


Figura 3

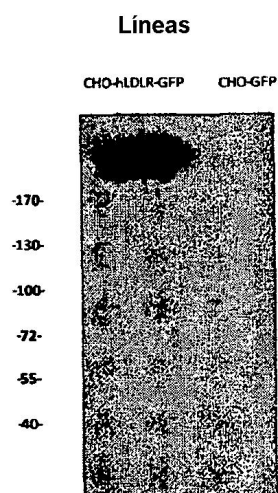


Figura 4

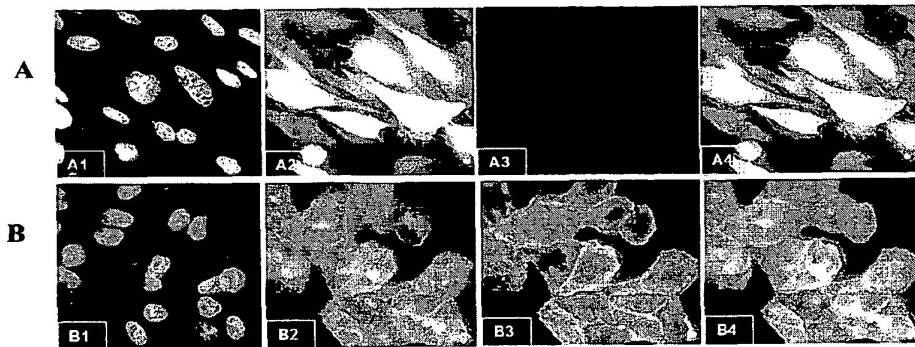


Figura 5

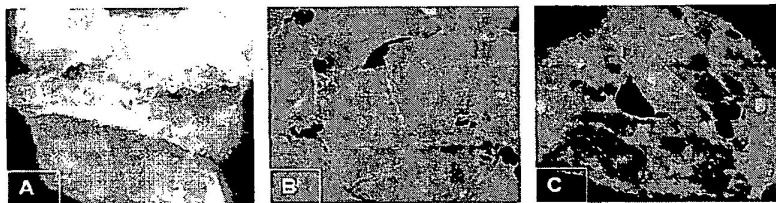


Figura 6

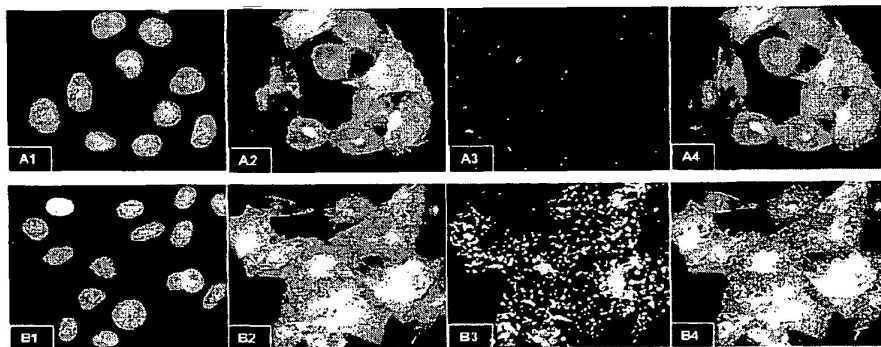


Figura 7

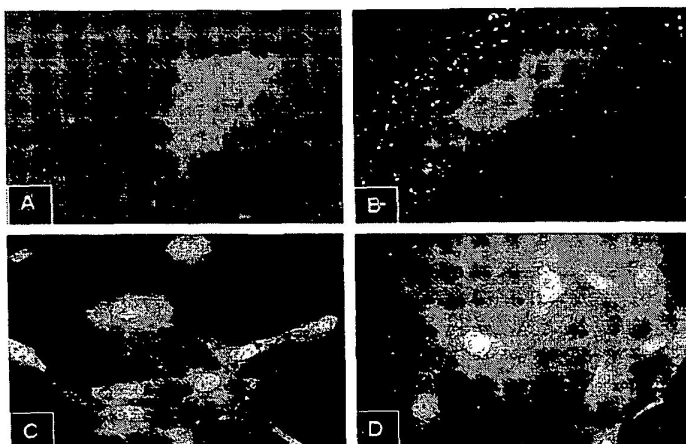
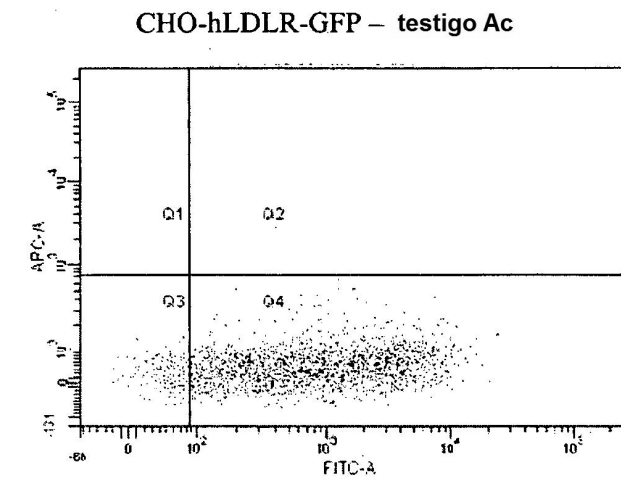
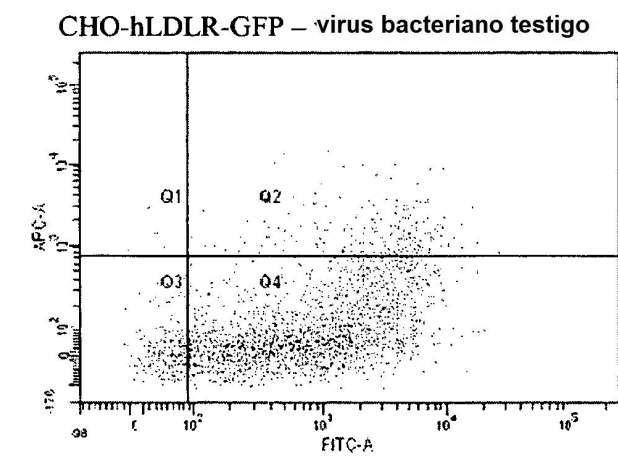


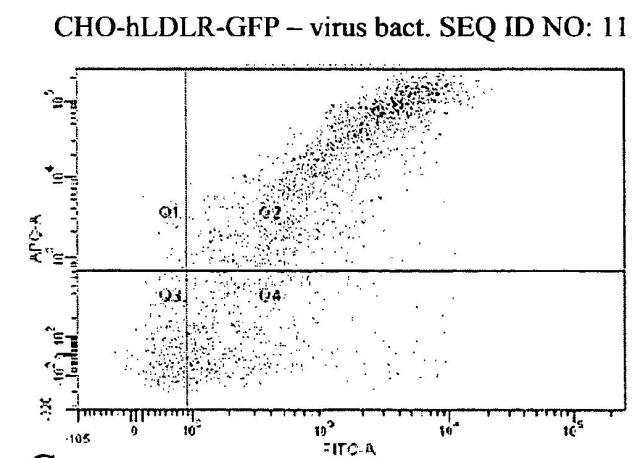
Figura 8



A



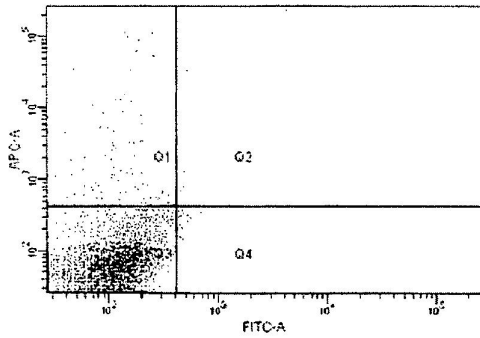
B



C

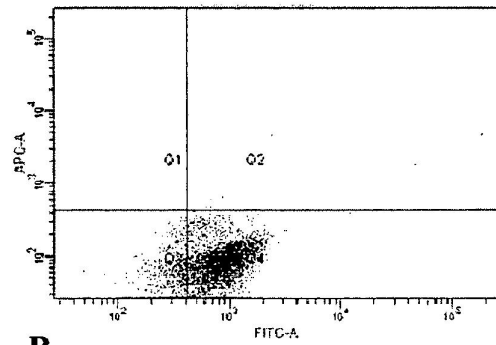
Figura 9

Fibroblastos humanos - testigo Ac



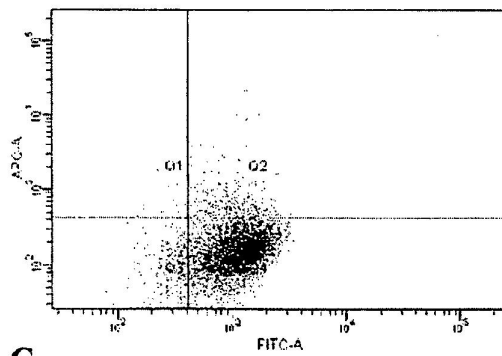
A

Fibroblastos humanos – Ac anti-LDLR



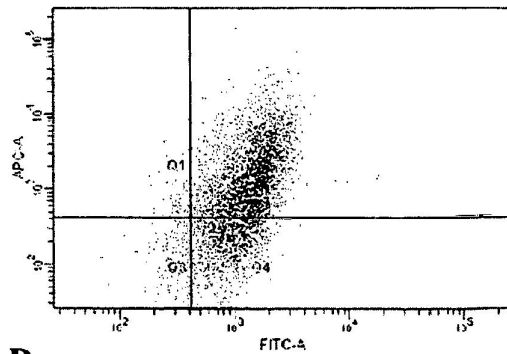
B

Fibroblastos humanos - virus bact. testigos



C

Fibroblastos humanos – virus bact. SEQ ID NO : 12



D

Figura 10

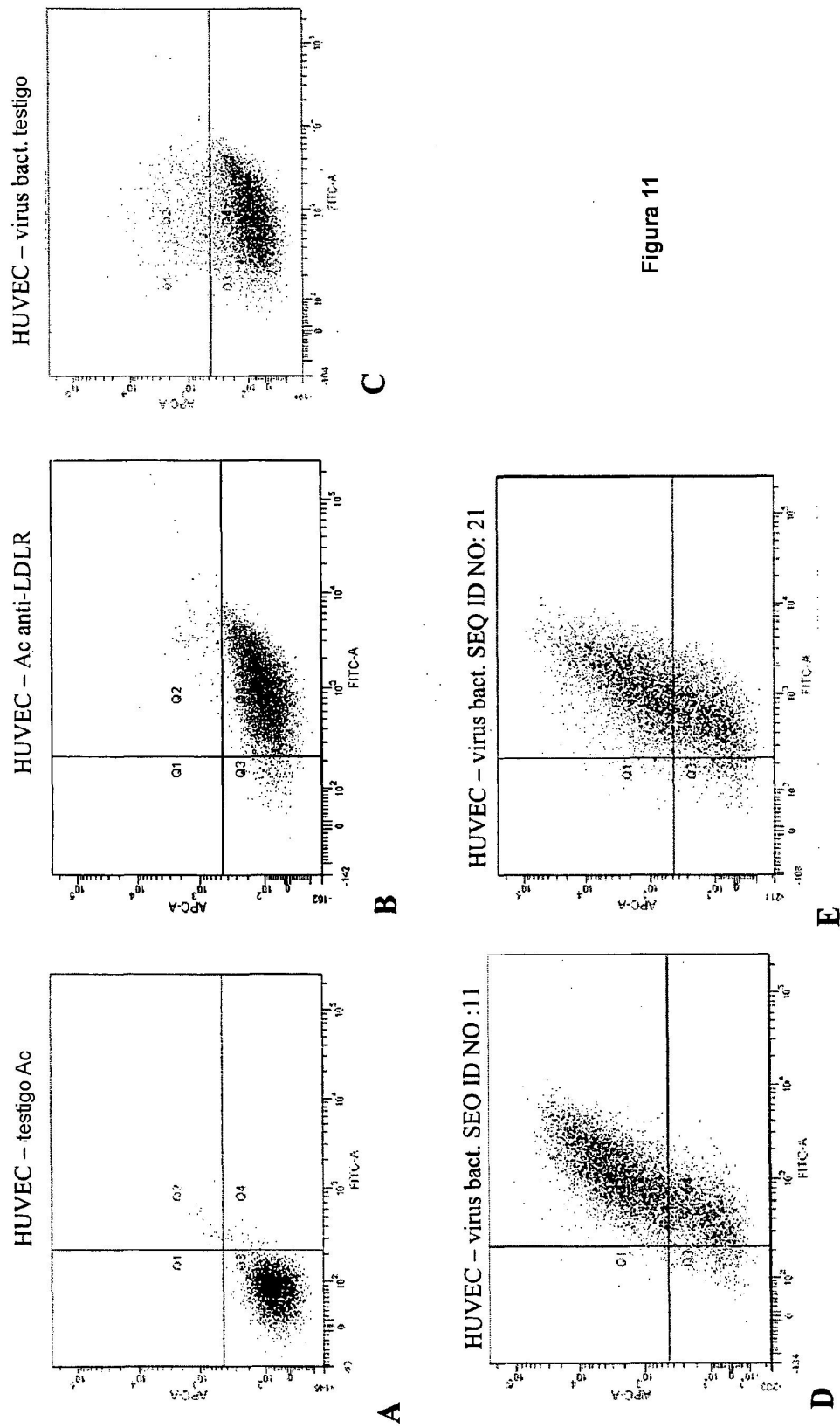


Figura 11

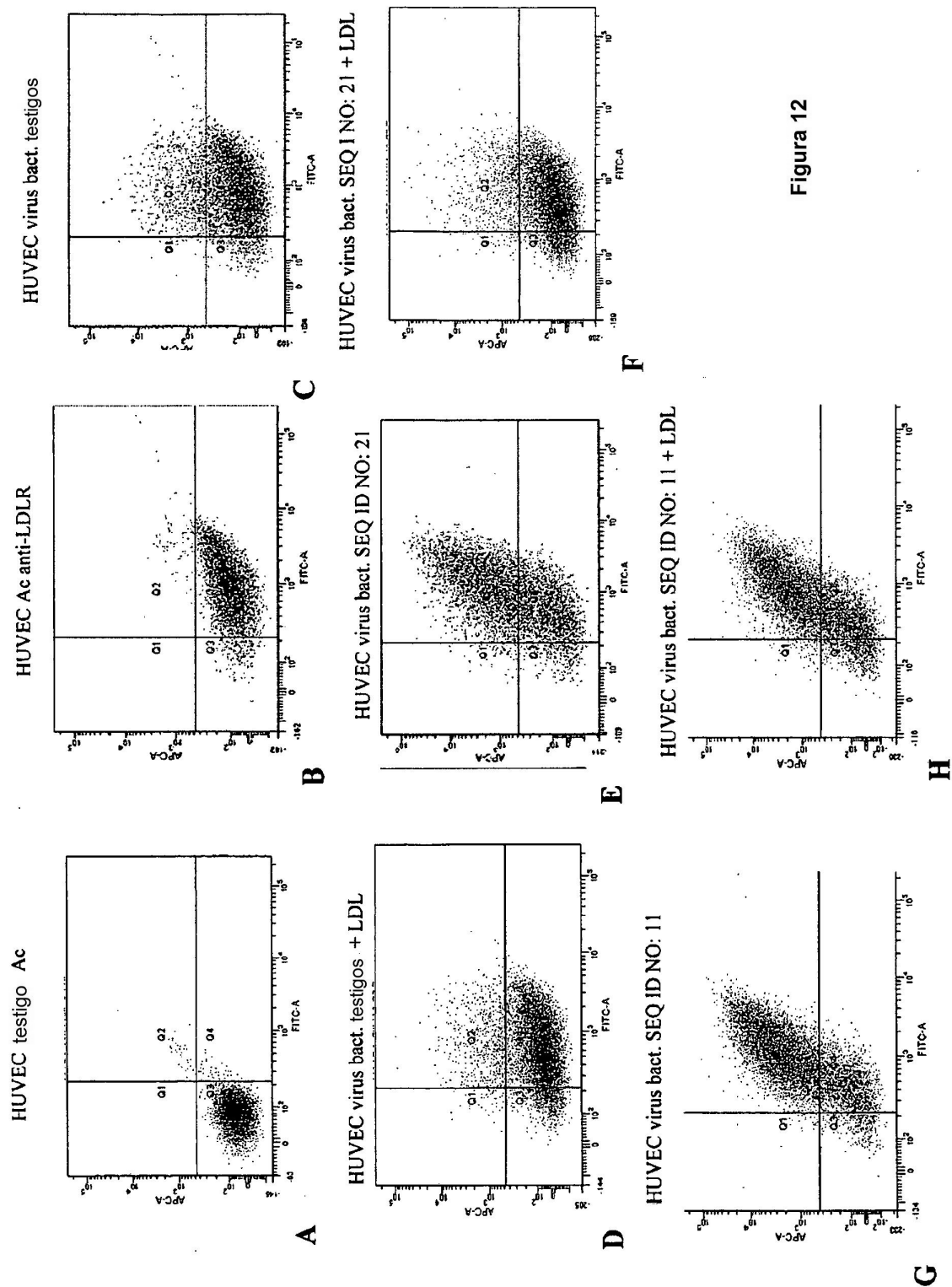


Figure 12

Figura 12 continuación

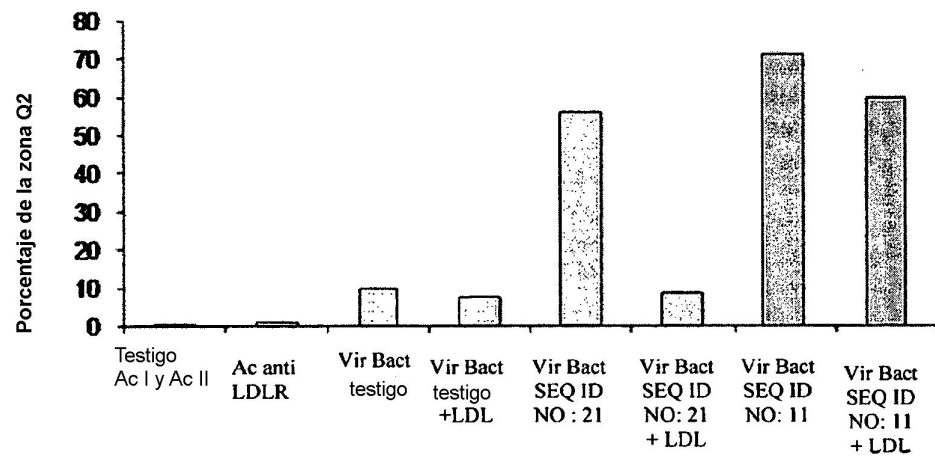


Figura 13

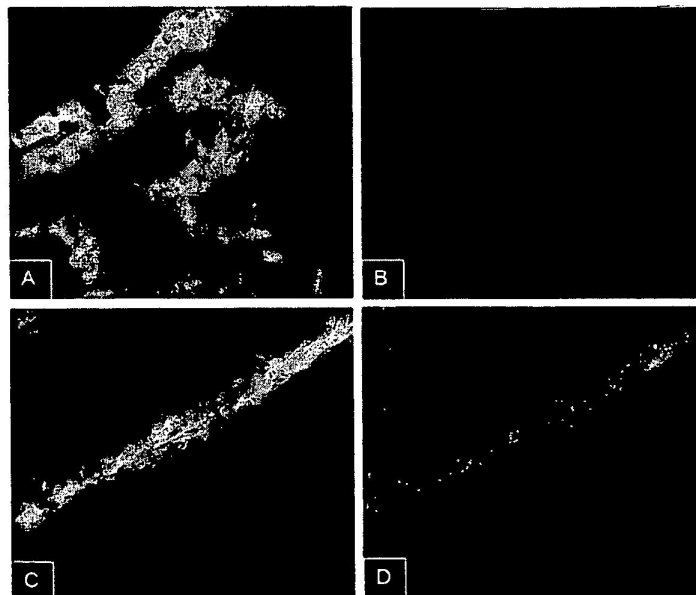


Figura 14

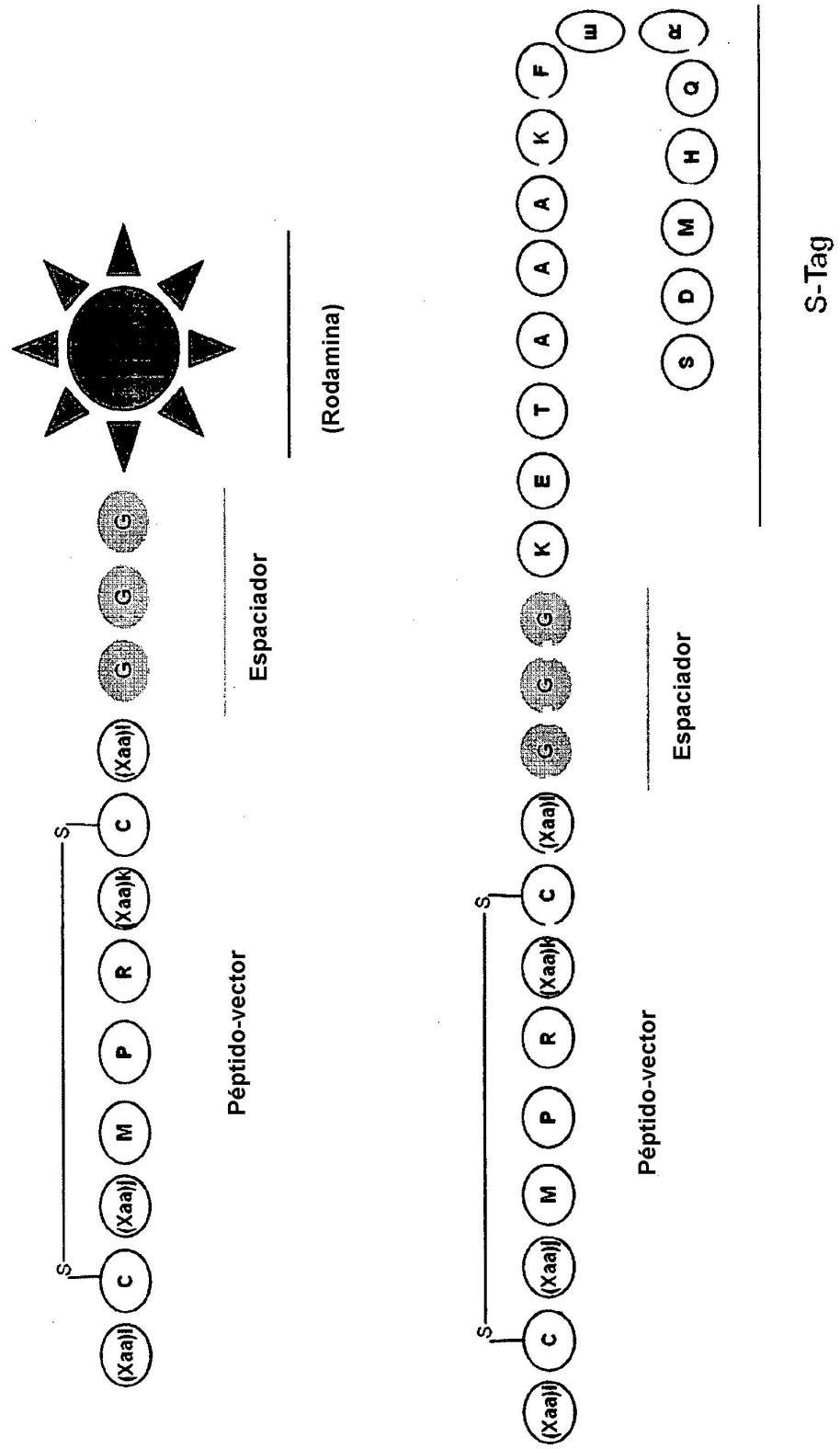


Figura 15

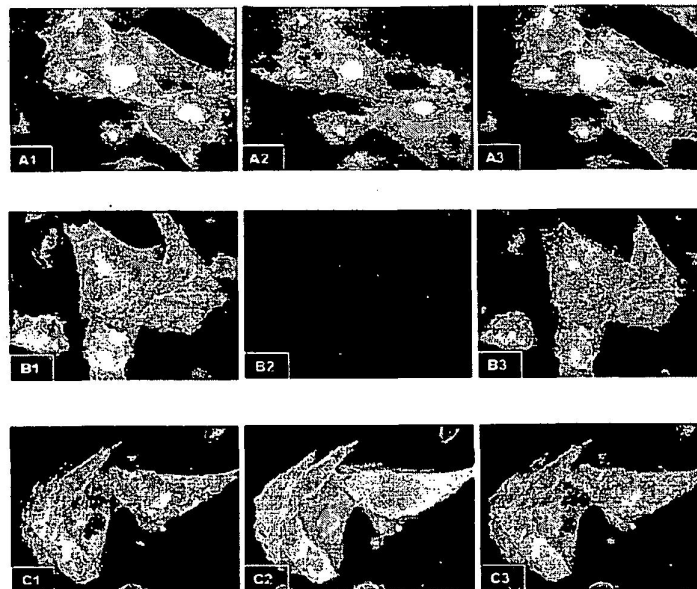
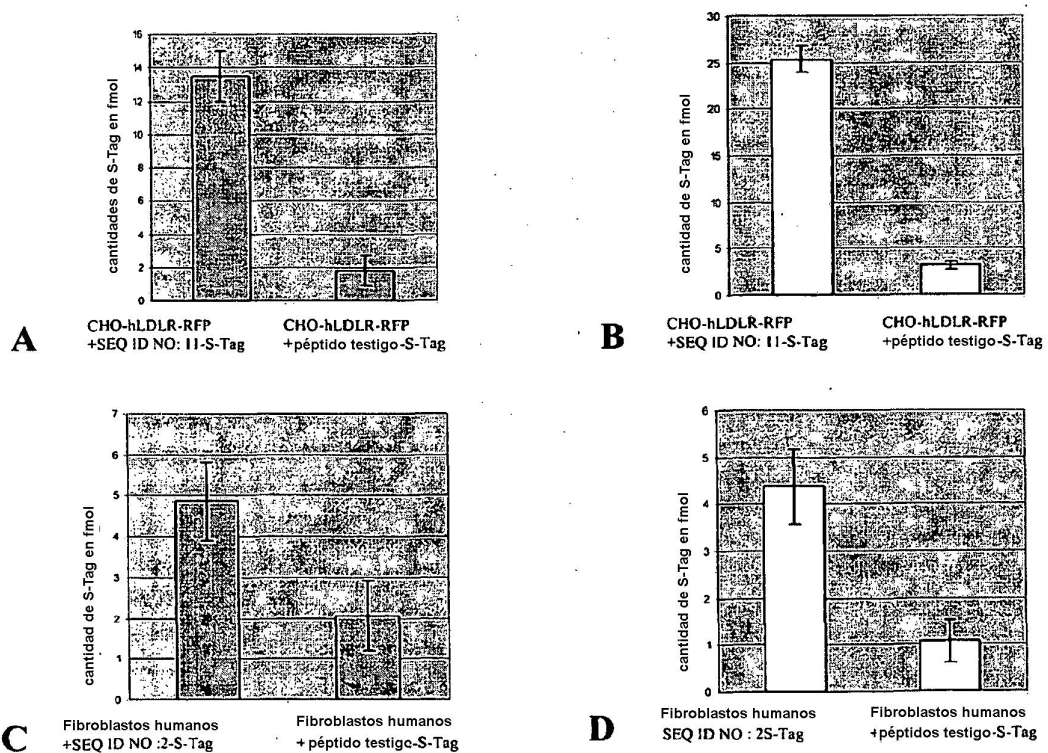


Figura 16



CHO-hLDLR-GFP - péptido SEQ ID NO: 11

CHO-hLDLR-GFP - péptido testigo

CHO-hLDLR-GFP - testigo Ac

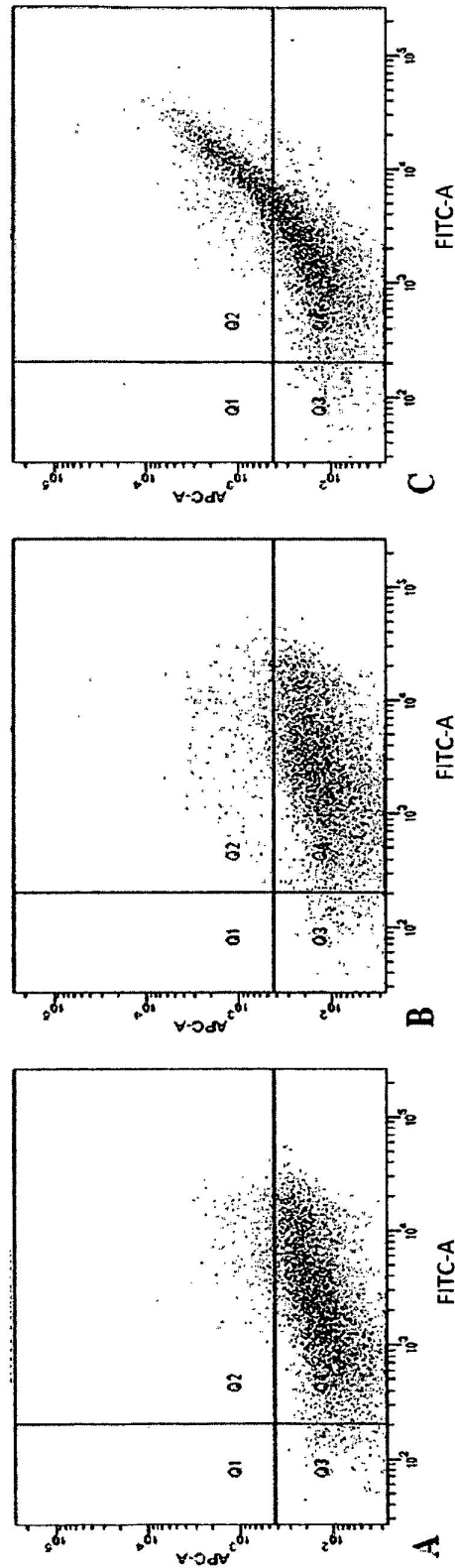


Figura 17

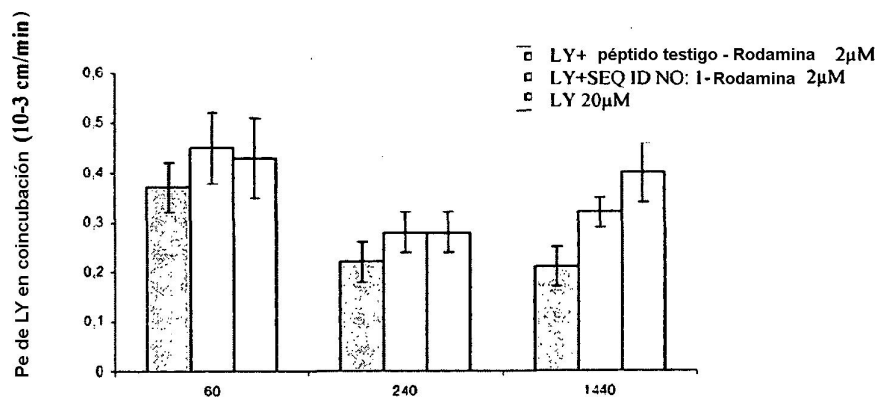


Figura 18

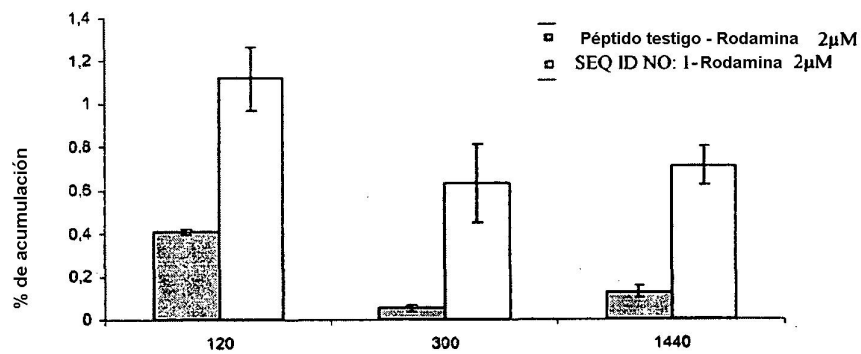


Figura 19

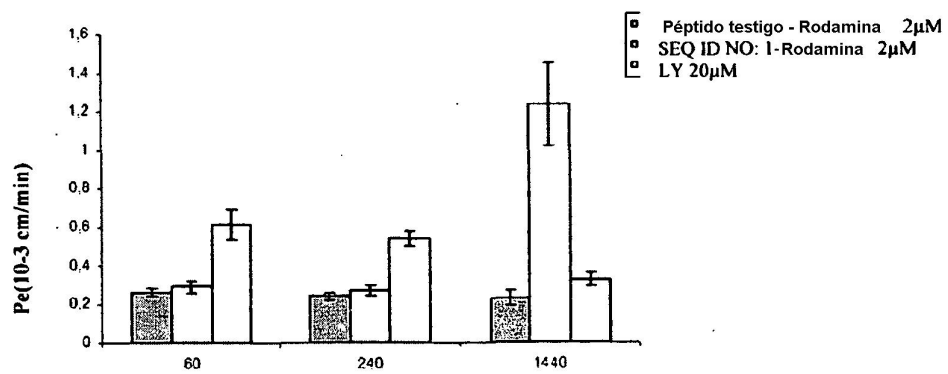


Figura 20