

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 853**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2013 PCT/EP2013/053892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO2013127829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2013 E 13709338 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2819700**

54 Título: **Compuestos resistentes a proteasas útiles como transportadores a través de la barrera hematoencefálica y construcciones de transportador-carga**

30 Prioridad:

27.02.2012 ES 201230294

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

20.06.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE BARCELONA (50.0%)
Centre de Patentes de la UB, Baldori Reixac 4 -
Torre D
08028 Barcelona, ES y
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA
BIOMÈDICA (IRB BARCELONA) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GIRALT LLEDÓ, ERNEST;
TEIXIDÓ TURÀ, MERITXELL y
PRADES COSANO, ROGER**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 617 853 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

Compuestos resistentes a proteasas útiles como transportadores a través de la barrera hematoencefálica y construcciones de transportador-carga

5

La presente invención se refiere a los campos de la medicina, la investigación y el diagnóstico, y de forma más concreta a compuestos nuevos que actúan como transportadores a través de la barrera hematoencefálica (BHE) para el suministro de sustancias que no pueden cruzar la BHE por sí mismas. También se refiere a construcciones de transportador-carga y su uso en la terapia o el diagnóstico.

10

Técnica antecedente

Varios trastornos graves de la salud requieren tratamiento del cerebro. Estos incluyen enfermedades neurodegenerativas tales como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, pero también enfermedades del sistema nervioso central tales como la esquizofrenia, la epilepsia o el trastorno bipolar, el cáncer de cerebro, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) e incluso determinados aspectos de la obesidad. Las dianas farmacéuticas de estas enfermedades están localizadas dentro del cerebro.

15

La BHE es un filtro natural dentro del cuerpo, que regula el paso de sustancias de la sangre al cerebro, permitiendo que solo determinadas sustancias crucen de la sangre al cerebro. Es un mecanismo natural de defensa diseñado para mantener las sustancias nocivas fuera del cerebro. Controla la composición del fluido extracelular cerebral independientemente de las fluctuaciones en la sangre. También es impermeable para muchos compuestos y fármacos del entorno.

20

La base anatómica de la BHE son, principalmente, las uniones estrechas de las células endoteliales de los microvasos cerebrales, las cuales forman una membrana continua sin comunicaciones. Transportadores específicos median el acceso de determinadas moléculas importantes para el cerebro, tales como la glucosa, aminoácidos aislados e iones. Otros compuestos pueden usar la BHM mediante un proceso de difusión pasiva a través de las células endoteliales que forman los microvasos cerebrales. Sin embargo, este proceso requiere un determinado grado de lipofilia de estos compuestos. Este tipo de transporte tiene la desventaja de ser muy selectivo y de estar regulado hasta cierto punto por las bombas de eflujo, localizadas en la membrana de las células endoteliales que forman la BHE, lo que impide la acumulación en el sistema nervioso de sustancias potencialmente tóxicas o innecesarias.

30

En las áreas terapéuticas mencionadas anteriormente se conocen para su tratamiento muchos compuestos promisorios, sin embargo, no se desarrollan adicionalmente debido a sus problemas de transporte en la BHE. La investigación en estos campos ha adoptado varias estrategias.

35

Algunos métodos de administración de fármacos al cerebro ya sea para la terapia o el diagnóstico, son técnicas invasivas, tales como la administración intracraneal, administración que altera la integridad de la BHE, o la alteración osmótica. Sin embargo, estos métodos implican un riesgo de infección y toxicidad y, además, necesitan personal calificado.

40

Otra estrategia es la modificación del fármaco. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, la reducción del tamaño del fármaco o el aumento de la lipofilia del fármaco, pero no siempre es posible introducir tales modificaciones. En el caso de la introducción de una modificación irreversible, es necesario que no modifique la actividad del fármaco una vez que accede al sitio diana. En el caso de una modificación biorreversible, es necesario encontrar un proceso enzimático o químico que recupere el fármaco activo una vez que el profármaco esté dentro del sistema nervioso central.

45

50

Otra estrategia es la administración del fármaco mediante conjugación con un soporte biológico. Esta estrategia es a base de la conjugación del fármaco con un sustrato de un receptor de proteína específico o con un anticuerpo que reconozca de manera selectiva un dado receptor, por ejemplo, el receptor de transferrina o el receptor de LDL. Un receptor particular puede reconocer este conjugado de fármaco-soporte y experimentar un proceso de endocitosis mediada por receptor en el sistema nervioso, de tal manera que compuestos con un uso terapéutico potencial que no pueden cruzar la BHE por sí mismos se vuelvan capaces de cruzar esta barrera cuando se conjugan con el soporte.

55

Para finalizar, otra estrategia comprende una estrategia de péptido mediada por vector en la cual se ligan fármacos que no pueden transportarse a péptidos que tienen la capacidad de cruzar la BHE (ver también J. Tamsamani *et al.*, "Improved Brain Uptake and Pharmacological Activity Profile of Morpholine-6-Glucuronide Using a Peptide Vector-Mediated Strategy" en J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005 vol. 313, pág. 712-719). Esta estrategia se ha utilizado para mejorar la captación de varios fármacos en el cerebro, tales como doxorubicina, penicilina, el análogo de encefalina dilargina, paclitaxel y morfina-6-glucurónido. En algunos casos, esta conjugación incluso aumentó la solubilidad del

60

fármaco y eludió la glicoproteína P expresada en la BHE.

El documento WO2008025867 describe varios compuestos a base de la estructura de la dicetopiperazina, que actúan como vehículos para el suministro de principios farmacéuticos activos en el cerebro mediante difusión pasiva a través de la BHE, debido a que tienen la capacidad de portar fármacos que carecen de la capacidad de pasar la BHE. La permeabilidad de la construcción carga-transportador a través de la BHE se estudió por medio del ensayo PAMPA (acrónimo del inglés: *parallel artificial membrane permeability assay*, ensayo de permeabilidad de membranas artificiales paralelas), como un modelo *in vitro* de BHE.

10 Asimismo, el documento WO2012007625 describe el uso de péptidos rico en fenil prolina (PhPro) como transportadores de compuestos que no tienen la capacidad de cruzar la BHE. Los péptidos descritos pueden facilitar el transporte de estos compuestos en el sistema nervioso central. Esta solicitud de patente, como el documento WO2008025867, es a base del uso de transportadores que tienen la capacidad de cruzar la BHE mediante un mecanismo de difusión pasiva. Este hecho limita su uso como transportadores de moléculas pequeñas.

15 Se han descrito varios péptidos cuyo mecanismo de transporte a través de la BHE es a través de un proceso de transporte activo de transcitosis mediada por receptor.

El documento WO200244329 describe un péptido, THRPPMWSPVWP (L-aminoácidos), que tiene la capacidad de unirse al receptor de transferrina humano (hTfR) e internalizarse en células que expresan hTfR. Este péptido puede ligarse a otras moléculas, tales como otros péptidos o proteínas, para facilitar el transporte de estas moléculas dentro de células que expresan hTfR. El péptido y su capacidad de unirse a hTfR también está descrito en Lee *et al.*, en Eur J. Biochem. 2001, vol. 268, pág. 2004-2012.

25 El documento WO2007098415 describe que el péptido THRPPMWSPVWP (L-aminoácidos) puede utilizarse *in vivo* para dirigir macromoléculas dentro de células que expresan hTfR. En particular, se indica que potencia la liberación de derivados de péptido que inhiben la interacción del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, sigla del inglés: *proliferating cell nuclear antigen*) de una manera específica y, así, reduce la proliferación celular de células malignas que expresan una isoforma específica de cáncer caPCNA. Desafortunadamente, el péptido THRPPMWSPVWP (L-aminoácidos) muestra un tiempo de semivida breve en suero humano, limitando así sus aplicaciones.

Para finalizar, el documento WO2009008725 describe péptidos o peptidomiméticos que comprenden la secuencia THRPPMWSPVWP (L-aminoácidos), así como los conjugados que comprenden estos péptidos y moléculas biológicas o de diagnóstico, y su uso para dirigir moléculas biológicas de diagnóstico a través de la barrera hematoencefálica, de células cerebrales, de células neuronales o de células tumorales de origen neuroectodérmico, o de neuronas, para el tratamiento de trastornos relacionados. Los peptidomiméticos descritos se refieren a variantes del péptido anterior que comprenden una sustitución de aminoácido en la secuencia por otro aminoácido o un derivado de este. También describe que el péptido puede consistir por completo en L-aminoácidos o puede contener una o más modificaciones en la estructura o en las cadenas laterales. Todos los ejemplos de la solicitud se refieren a L-aminoácidos.

Sobre la base de los resultados existentes, sería conveniente tener un compuesto con la capacidad de cruzar la BHE que tenga la capacidad de transportar cargas a través de ella de una manera eficaz. Asimismo, sería interesante que estos compuestos tuvieran una estabilidad elevada en condiciones fisiológicas para evitar efectos secundarios y mejorar su eficacia.

Resumen de la invención

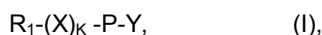
50 Los inventores han encontrado que el péptido PWVPSWMPPRHT (D-aminoácidos) y el péptido GPWVPSWMPPRHT (D-aminoácidos excepto la glicina, que no tiene quiralidad) tienen la capacidad de cruzar la BHE y son capaces de facilitar el transporte hacia dentro del cerebro de fármaco sus otras sustancias útiles para el diagnóstico, denominadas "cargas", que no pueden cruzar la BHE por sí mismas. Los péptidos son biocompatibles, tienen ausencia de toxicidad y antigenicidad dado que están hechos de aminoácidos. A partir de ahora, estos péptidos se denominarán compuestos transportadores.

El mecanismo de transporte a través de la BHE de los péptidos de la invención es por medio de una transcitosis mediada por receptor a través del receptor de transferrina. Este mecanismo depende de la configuración L o D de los aminoácidos. A diferencia de lo que se esperaba, los compuestos peptídicos de la presente invención también son reconocidos por el receptor hTfR y tienen una sorprendente capacidad mejorada para funcionar como transportadores respecto al péptido THRPPMWSPVWP (L-aminoácidos). Los péptidos tienen la capacidad de internalizarse en las células endoteliales del cerebro y los astrocitos. Además de esto, tienen una permeabilidad aparente a través de la BHE mejorada en comparación con la secuencia THRPPMWSPVWP (L-aminoácidos).

Los compuestos peptídicos de la presente invención también muestran una buena solubilidad en agua y una elevada estabilidad frente a las proteasas que se encuentran en la sangre. Para ser más preciso, los péptidos tienen tiempos de semivida extensos en plasma humano, dado que son resistentes a las proteasas encontradas en este. Los péptidos también muestran una elevada estabilidad frente a las peptidasas asociadas con los microvasos cerebrales. Esta propiedad de los compuestos de la invención permite mejorar la dosis de administración, dado que la cantidad de solución que contiene la construcción a administrar será menor.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a la proporción de compuestos transportadores de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables,

10



en la que: R_1 es el grupo unido al N terminal del primer aminoácido de la secuencia P, de forma opcional a través del ligando X, y se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3C(=O)-$ y maleimida; X es un birradical seleccionado del grupo que consiste en $-NH-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-S(CH_2)_r-$, $-S-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-O-(CH_2)_r-$, $-S-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)-$, $-O-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-NH-O-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-$, $-(CH_2)_r-C(=O)-NH-(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-$ y $-NH-(CH_2)_r-CH(NHC(=O)CH_2NH_2)-C(=O)-$; en la que el birradical X está unido a R_1 y al N de la secuencia P como sigue: $R_1-NH-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-S-(CH_2)_r-N(H)_{m-}$, $R_1-S-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-O-(CH_2)_r-N(H)_{m-}$, $R_1-S-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)-N(H)_m$, $R_1-O-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_m$, $R_1-NH-O-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-N(H)_m$, $R_1-(CH_2)_r-C(=O)-NH-(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-N(H)_m$ y $R_1-NH-(CH_2)_r-CH(NHC(=O)CH_2NH_2)-C(=O)-N(H)_m$; r es un número entero de 1 a 5; P es un birradical de una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser- D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr (SEQ ID NO: 1); Y es el grupo unido al C terminal del último aminoácido de la secuencia P y se selecciona del grupo que consiste en $-NH_2$, $-OH$, $-OR_2$ y $-NHR_2$; R_2 es un radical seleccionado del grupo que consiste en (C_1-C_6) -alquilo y $(CH_2)_2-NH-C(=O)-CH_2-O-NH_2$; k es un número entero de 0 a 2; m es un número entero de 0 a 1; a condición de que cuando el birradical X es $-C(=O)(CH_2)_rC(=O)-$, entonces R_1 es H; a condición de que cuando el N del aminoácido de la secuencia P al cual está unido el birradical X es un birradical $-NH-$, entonces m es 1, y cuando es un birradical $-N-$, entonces m es 0; y a condición de que cuando R_1 es maleimida, entonces el birradical X es $-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-CH(NH_2)-C(=O)-$, $-(CH_2)_r-C(=O)-$ y $-(CH_2)_r-C(=O)-NH-(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-$.

En una realización preferente, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en donde: R_1 es el grupo unido al N terminal del primer aminoácido de la secuencia P, opcionalmente a través del ligando X, y se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3C(=O)-$; X es un birradical seleccionado del grupo que consiste en $-NH-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-$, $S(CH_2)_r-$, $-S-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-O-(CH_2)_r-$, $-S-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)-$ y $-O-(CH_2)_r-C(=O)-$; en las que el birradical X está unido a R_1 y el N de la secuencia P es como sigue: $R_1-NH-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-S-(CH_2)_r-N(H)_{m-}$, $R_1-S-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-O-(CH_2)_r-N(H)_{m-}$, $R_1-S-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)-N(H)_m$ y $R_1-O-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$; r un número entero de 1 a 3; P es un birradical de una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr (SEQ ID NO: 1); Y es el grupo unido al C terminal del último aminoácido de la secuencia P y se selecciona del grupo que consiste en $-NH_2$, $-OH$, $-OR_2$ y $-NHR_2$; R_2 es un radical (C_1-C_6) -alquilo; k es un número entero de 0 a 2; m es un número entero de 0 a 1; a condición de que cuando el birradical X es $-C(=O)(CH_2)_rC(=O)-$ entonces R_1 es H y a condición de que cuando el N del aminoácido de la secuencia P al que está unido el birradical X es un birradical $-NH-$, entonces m es 1, y cuando es un birradical $-N-$, entonces m es 0.

45

Los compuestos de fórmula (I) o sus sales pueden existir en formas solvatadas, así como no solvatadas, incluyendo formas hidratadas. Por lo tanto, en su estructura pueden contener cantidades estiquiométricas de disolvente en el caso de solvatos o de agua en el caso de los hidratos. Debe entenderse que la presente invención abarca todas las formas solvatadas, así como las no solvatadas. La obtención de solvatos e hidratos depende del disolvente utilizado y de las condiciones de cristalización, que un experto en la materia puede determinar.

En una realización preferente, los compuestos peptídicos de fórmula (I) son aquellos en los que P es un birradical que consiste en la SEQ ID NO: 1 y m es 0.

En otra realización preferente, los compuestos peptídicos de fórmula (I) son aquellos en los que P es un birradical basado en la secuencia Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr (SEQ ID NO: 2) y m es 1.

En una realización más preferente, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que Y es $-NH_2$, $-OH$ o $-NHR_2$. En otra realización aún más preferente, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que Y es $-NH_2$. En otra realización preferente, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que Y es $-NHR_2$, en los que R_2 es $(CH_2)_2-NH-C(=O)-CH_2-O-NH_2$.

Preferentemente, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en donde k es 0 o 1.

Los compuestos peptídicos de fórmula (I) más preferentes son los seleccionados del grupo que consiste en:

- 5 H-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂; y
 H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂.

En el presente documento se hace referencia a estos péptidos como se indica anteriormente o como PWVPSWMPPRHT (D-aminoácidos) o GPWVPSWMPPRHT (D-aminoácidos), respectivamente.

- 10 Como se explica en el Ejemplo 21, los compuestos de fórmula (I) tienen la capacidad de transportar sustancias hacia dentro del cerebro, denominadas cargas, que no pueden cruzar la BHE por sí mismas. Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de estos compuestos de fórmula (I) como transportadores de BHE. El uso de estos compuestos hace posible, por ejemplo, que la investigación sobre nuevos fármacos no esté solo limitada a los compuestos que pueden cruzar la BHE por sí mismos. Como se ilustra mediante los ejemplos comparativos, los
 15 compuestos de fórmula (I) son mejores transportadores de BHE que los compuestos más cercanos de la técnica anterior.

- Los compuestos de fórmula (I) tienen grupos funcionales apropiados adecuados para la unión covalente de cargas, manteniendo la actividad original de la carga hasta que alcance el sitio de acción. Por lo tanto, otro aspecto de la
 20 presente invención es la proporción de construcciones de fórmula (II) o sus sales farmacéuticamente aceptables, que se denominan construcciones de transportador de BHE-carga,



- 25 en la que: X, P, Y, k son como se define anteriormente; q es un número entero de 1 a 2, y Z es un radical de una sustancia biológicamente activa o una sustancia para su uso en un método de diagnóstico, siendo dicha sustancia sustancialmente incapaz de cruzar la BHE por sí misma. En la que cuando q es 1, entonces Z está unido al N terminal del primer aminoácido de la secuencia P, opcionalmente a través del ligando X, y cuando q es 2, entonces está unida una Z al N terminal del primer aminoácido de las secuencias P, opcionalmente a través del ligando X, y la
 30 otra Z está unida a un nitrógeno del birradical X.

En una realización preferente, en las construcciones de fórmula (II) o sus sales farmacéuticamente aceptables, q es 1 y tiene la siguiente fórmula

- 35 $Z-(X)_k-P-Y, \quad (II')$

en donde: X, P, Y, k son como se define anteriormente para los compuestos de fórmula (I) y Z es un radical de una sustancia biológicamente activa o una sustancia para su uso en un método de diagnóstico, la cual es sustancialmente incapaz de cruzar la BHE por sí misma.

- 40 La expresión "sustancialmente incapaz de cruzar la BHE" significa que no tiene la capacidad de cruzar la BHE o, si lo hace, es en una cantidad que es terapéuticamente no eficaz.

- Los valores preferentes de X, P, Y y k para el compuesto de fórmula (I) son también valores preferentes para la
 45 construcción de fórmula (II).

Por lo tanto, en una realización preferente, las construcciones de fórmula (II) son aquellas en donde P se selecciona del grupo que consiste en un birradical de secuencia SEQ ID NO: 2 y un birradical de secuencia SEQ ID NO: 1.

- 50 En otra realización preferente, las construcciones de fórmula (II) son aquellas en donde k es un número entero de 0 a 1.

- En otra realización preferente, la construcción de fórmula (II) son aquellas en la que Y es -NH₂, -OH o -NHR₂. En una realización más preferente, Y es NH₂. En otra realización preferente, Y es -NHR₂, en el que R₂ es (CH₂)₂-N H-C(=O)-
 55 CH₂-O-N H₂.

- Las sustancias a partir de las cuales se obtiene el radical Z incluyen una amplia variedad de sustancias que tiene utilidad farmacológica o en el diagnóstico. Estas sustancias pueden ser principios farmacéuticos activos, en particular, agentes antirretrovíricos, agentes anticancerosos, agentes antipsicóticos, agentes antineurodegenerativos
 60 o fármacos antiepilépticos. En una realización preferente, Z es un radical obtenido de un principio farmacéutico activo que tiene la capacidad de formar un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro. Como alternativa, Z es un radical obtenido de un principio farmacéutico activo que tiene la capacidad de formar un enlace tioéter, un enlace oxima, un enlace amina o un enlace hidrazona con X, siendo el principio activo mencionado incapaz de cruzar la BHE por sí mismo.

Un ejemplo de principio farmacéutico activo es la dopamina. La dopamina es un neurotransmisor clave en el sistema nervioso central, en particular, el empobrecimiento de la dopamina estriatal está asociado con las afecciones clínicas del parkinsonismo. La dopamina ha mostrado propiedades interesantes como fármaco, pero no puede cruzar la BHE. En particular, como se ilustra en los Ejemplos, las construcciones de fórmula (II) permiten a la dopamina ser útil como un fármaco, sin tener los efectos secundarios no deseados de la terapia actual, y ser una técnica más simple y no invasiva en comparación con las existentes.

Otras cargas posibles son, por ejemplo, péptidos, proteínas, polímeros y anticuerpos, los que tienen aplicaciones como agentes terapéuticos o de diagnóstico, pero que son incapaces de cruzar la BHE de forma apropiada. En una realización particular, el péptido es H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys (SEQ ID NO: 3). Este péptido es útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En una realización particular se utilizan anticuerpos como cargas. En una realización preferente, el anticuerpo es bevacizumab (Avastin). Este anticuerpo es útil para el tratamiento del cáncer.

Las sustancias obtenidas a partir de Z también incluyen otras sustancias que sería interesante transportar al cerebro pero que no lo hacen por sí mismas de forma apropiada, por ejemplo, agentes de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética (IRM). Entre los dispositivos clínicos utilizados para el diagnóstico clínico del cáncer, la IRM destaca como una modalidad de formación de imágenes no invasiva y no destructiva poderosa, que proporciona imágenes internas de organismos vivos sin límite en la profundidad del análisis y con una resolución de 10 a 100 micrómetros. Es una técnica valiosa utilizada ampliamente en el diagnóstico del cáncer y en investigación. Para la detección temprana del cáncer (así como de otras enfermedades), es interesante el uso de agentes de contraste que puedan dirigirse de forma selectiva a marcadores específicos emplazados en determinados tejidos, creando una pequeña acumulación de agente de contraste en este tejido. Esta pequeña acumulación de agente de contraste es suficiente para detectar de forma inequívoca la existencia de, por ejemplo, un tumor en fases muy tempranas. Los agentes de contraste pueden utilizarse también como métodos de diagnóstico para otras enfermedades del sistema nervioso central, tales como la enfermedad de Alzheimer, o como una herramienta para la exploración prequirúrgica por IRM que guiará al cirujano. En todos estos casos el agente de contraste utilizado necesita cruzar la BHE. Los ejemplos de agentes de contraste típicos incluyen quelatos de elementos paramagnéticos, tales como gadolinio o manganeso (efecto sobre T1) o el uso de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (nanopartículas SPION (sigla del inglés: *small superparamagnetic iron oxide nanoparticles*)) (efecto T2). Las nanopartículas de óxido de hierro son partículas de óxido de hierro con diámetros entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros. Las dos formas principales son la magnetita (Fe_3O_4) y su forma oxidada maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Han atraído un gran interés debido a sus propiedades superparamagnéticas y sus aplicaciones potenciales en muchos campos (aunque el Cu, el Co y el Ni también son materiales elevadamente magnéticos, son tóxicos y se oxidan con facilidad). El superparamagnetismo es una forma de magnetismo, que aparece en pequeñas micro o nanopartículas ferromagnéticas o ferrimagnéticas, consistiendo cada partícula en un dominio magnético. Un dominio magnético es una región dentro de un material magnético que tiene magnetización uniforme. Esto significa que los momentos magnéticos individuales de los átomos están alineados entre sí y apuntan en la misma dirección.

Otros agentes de diagnóstico no IRM incluye colorantes y sondas fluorescentes tales como carboxifluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, o el uso de puntos cuánticos (nanopartículas formadas por materiales semiconductores con un campo cuántico de elevada fluorescencia). Los últimos, combinados con el uso de microscopía de dos fotones, como en la técnica de IRM, permiten la formación de imágenes *in vivo* de organismos vivos de una manera no invasiva, permitiendo así su uso como la herramienta de diagnóstico.

Un punto cuántico es una porción de materia (por ejemplo, semiconductor) cuyos excitones están confinados en las tres dimensiones espaciales. En consecuencia, tales materiales tienen propiedades electrónicas intermedias entre las de los semiconductores másicos y las de las moléculas discretas. Los puntos cuánticos son semiconductores cuyas características electrónicas están estrechamente relacionadas con el tamaño y la forma de los cristales individuales. En general, cuanto más pequeño es el tamaño del cristal más grande es el hueco de banda, mayor se hace la diferencia de energía entre la banda de valencia más alta y la banda de conducción más baja, por lo tanto, se necesita más energía para excitar el punto y, de forma simultánea, más energía se libera cuando el cristal vuelve a su estado de reposo.

Además, en una realización preferente, la carga Z incluye anticuerpos útiles en métodos de diagnóstico.

Las construcciones más preferentes de fórmula (II) son las seleccionadas del grupo que consiste en:

L-Dopa-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ ((IIa); SEQ ID NO: 1 con una L-dopa como carga o grupo Z);

H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys- D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-

Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ ((Ib); SEQ ID NO: 1 con la SEQ ID NO:3 como carga o grupo Z);

5(6)-Carboxifluoresceína-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ ((Ic); SEQ ID NO: 1 con 5(6)-Carboxifluoresceína como carga o grupo Z);

5 Punto cuántico-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ ((Id); SEQ ID NO: 2 con punto cuántico como carga o grupo Z); y

10 SPION-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ ((Ie); SEQ ID NO: 2 con SPION como carga o grupo Z).

En una realización particular, las construcciones de fórmula (II) son las seleccionadas del grupo que consiste en:

15 5(6)-Carboxifluoresceína-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ ((If); SEQ ID NO: 1 con 5(6)-Carboxifluoresceína y un anticuerpo como cargas o grupos Z); y

Rodamina b-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂((Ilg); SEQ ID NO: 1 con rodamina b y un anticuerpo como cargas o grupos Z).

20 Como se menciona anteriormente, de acuerdo con la carga de las construcciones de fórmula (II), estas serán útiles en terapia o en diagnóstico.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a estructuras de fórmula (II) como se define anteriormente, en las que Z es un radical de una sustancia biológicamente activa que es sustancialmente incapaz de cruzar la BHE por sí misma, para su uso como un medicamento. Preferentemente, las sustancias con actividad biológica son principios activos farmacéuticos, en particular seleccionados del grupo de principios activos mencionados anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a estructuras de fórmula (II) en donde Z es un radical de dopamina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Esto puede formularse también como el uso de construcciones de fórmula (II) en donde Z es un radical de dopamina, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto, este aspecto está relacionado con un método de tratamiento y/o de profilaxis de un mamífero, incluyendo un ser humano, que padece o es susceptible de desarrollar enfermedad de Parkinson; este método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (II), con Z siendo un radical de dopamina, junto con excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la invención se refiere a estructuras de fórmula (II) en donde Z es un radical peptídico del péptido H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 3) para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El uso del péptido H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 3) para el tratamiento del Alzheimer se describe en el documento WO2008050133. Este aspecto también puede formularse como el uso de construcciones de fórmula (II) en donde Z es un radical peptídico del péptido H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 3), para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, este aspecto también se refiere a un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un mamífero, incluyendo un ser humano, que padece o que es susceptible de desarrollar enfermedad de Alzheimer; este método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (II), con Z siendo un radical peptídico del péptido H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH₂, junto con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la invención se refiere a estructuras de fórmula (II) en donde Z es un anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer. El uso de anticuerpos tales como bevacizumab para el tratamiento del cáncer se describe en el documento EP973804, pero para el caso de cáncer de cerebro (por ejemplo: glioblastoma), el transporte de este anticuerpo a través de la BHE está lejos de ser óptimo. Esto puede formularse también como el uso de construcciones de fórmula (II) en donde Z es un anticuerpo para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, este aspecto también se refiere a un método para el tratamiento y/o la profilaxis de un mamífero, incluyendo un ser humano, que padece o que es susceptible de desarrollar cáncer; este método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (II), con Z siendo un anticuerpo, junto con diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la invención se refiere a estructuras de fórmula (II) en donde Z es una nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético (nanopartícula SPION), un complejo de gadolinio o manganeso, para el uso como agente de contraste en un método de diagnóstico para la formación de imágenes por resonancia magnética. Esta técnica se

utiliza para la localización e identificación de tumores malignos, metástasis de estos o recurrencias. También se utiliza para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Este aspecto también puede formularse como el uso de una construcción de fórmula (II) en donde Z es una nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético (nanopartícula SPION), un complejo de gadolinio o manganeso, para la preparación de un agente de contraste para un método de formación de imágenes por resonancia magnética. Preferentemente, Z es una nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético (nanopartícula SPION).

También se considera parte de la invención un método para el diagnóstico de una enfermedad que comprende administrar a un mamífero, incluyendo un ser humano, que necesite tal diagnóstico, una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de fórmula (II) en la que Z es una nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético, un complejo de gadolinio o manganeso, junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables y/o aceptables para el diagnóstico, para generar una imagen mediante formación de imágenes por resonancia magnética, y hacer un diagnóstico utilizando esta imagen.

La expresión “agente de contraste” se refiere a agentes que potencian la visibilidad de determinadas estructuras, que de otra forma serían difíciles de ver durante la exploración. Estos agentes se utilizan para la inyección en el sistema vascular hasta una presentación local.

Otro aspecto de la invención se refiere a estructuras de fórmula (II) en donde Z es un radical de un compuesto fluorescente para su uso como una sonda fluorescente en un método de formación de imágenes utilizando microscopía de dos fotones, obteniendo la formación de imágenes *in vivo* de organismos vivos de un modo no invasivo, que sirve como una herramienta de diagnóstico. Este aspecto también puede formularse como el uso de una construcción de fórmula (II) en donde Z es un compuesto fluorescente para la preparación de una sonda fluorescente para un método de formación de imágenes, por ejemplo, utilizando microscopía de dos fotones. Los ejemplos de compuestos fluorescentes adecuados son 5(6)-carboxifluoresceína, rojo Texas, rodamina o puntos cuánticos. Preferentemente, el compuesto fluorescente es 5(6)-carboxifluoresceína o puntos cuánticos.

La invención también se refiere a un método para el diagnóstico de una enfermedad que comprende administrar a un mamífero, incluyendo un ser humano, que necesite tal diagnóstico, una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de fórmula (II) en donde Z es 5(6)-carboxifluoresceína o un punto cuántico, junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables y/o aceptables para el diagnóstico, para la generación de una imagen utilizando microscopía de dos fotones y el diagnóstico utilizando esta imagen.

La invención también se refiere a un método para el diagnóstico de una enfermedad, que comprende administrar a un mamífero, incluyendo un ser humano, que necesite tal diagnóstico, una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de fórmula (II) en donde Z es un anticuerpo con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables y/o aceptables, para el diagnóstico por un método de formación de imágenes.

Los compuestos peptídicos de fórmula (I) y las construcciones transportador-carga de fórmula (II) pueden generarse de forma completa o parcial mediante síntesis química. Los aminoácidos necesarios para la preparación de compuestos de fórmula (I) están disponibles de forma comercial. Los compuestos de fórmula (I) y la construcción de fórmula (II) pueden prepararse fácilmente, por ejemplo mediante síntesis en fase líquida o, preferentemente, mediante síntesis de péptidos en fase sólida, para lo cual existen varios procedimientos publicados (ver también M. Amblard, *et al.*, "Methods and protocols of modern solid-phase peptide synthesis. Molecular Biotechnology 2006, Vol. 33, pág. 239-254). Los compuestos de fórmula (I) o las construcciones de fórmula (II) también pueden prepararse mediante cualquier combinación de síntesis en fase líquida y/o síntesis en fase sólida. Por ejemplo, sintetizando el cuerpo del transportador a través de síntesis en fase sólida y, posteriormente, eliminando los grupos protectores en solución. La unión de la carga al transportador puede realizarse en fase sólida o en solución. En los ejemplos se divulgan con más detalle el transportador particular y la unión a las cargas específicas.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de las construcciones transportador-carga de fórmula (II) como se define anteriormente, en donde Z es un radical de una sustancia biológicamente activa, junto con cantidades apropiadas de diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” como se utiliza en el presente documento se refiere a una cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar en algún grado, uno o más síntomas de la enfermedad que se trata. La dosis particular de compuesto administrada de acuerdo con la presente invención se determinará, por supuesto, por las circunstancias particulares que rodean el caso, incluyendo el compuesto administrado, la vía de administración, la afección particular a tratar y consideraciones similares.

La expresión “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla de un compuesto descrito en el presente documento con otros componentes químicos, tales como diluyentes o vehículos. La composición farmacéutica

facilita la administración del compuesto a un organismo.

La expresión “excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables” se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. Además, debe ser adecuado para su uso en contacto con tejidos u órganos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad, u otros problemas o complicaciones, acorde con una proporción beneficio/riesgo.

Una composición que comprende una construcción de acuerdo con la presente invención puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea de forma simultánea o secuencial, dependiendo de la afección a tratar.

Para finalizar, también forman parte de la invención las composiciones con fines diagnósticos, a las que se las ha llamado agente de contraste o sondas fluorescentes, dependiendo del radical Z de la construcción de fórmula (II). Estas composiciones comprenden una cantidad eficaz de las construcciones transportador-carga de fórmula (II) como se define anteriormente, en donde Z es un radical de una sustancia para su uso en un método de diagnóstico para IRM o espectroscopia de dos fotones, siendo esta sustancia incapaz de cruzar la BHE por sí misma, junto con cantidades apropiadas de excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables y/o aceptables para el diagnóstico.

La expresión “aceptables para el diagnóstico” se refiere a los excipientes o vehículos adecuados para su uso en la tecnología de diagnóstico. No deben afectar de forma adversa a la estabilidad, seguridad o eficacia de la composición. En general, los excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables y/o aceptables para el diagnóstico son medios estériles fisiológicamente aceptables, es decir, soluciones acuosas isotónicas.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en una forma parenteral adecuada para inyección, infusión o implantación en el cuerpo.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit que comprende en un recipiente el agente de contraste de acuerdo con la presente invención, junto con instrucciones para su uso en la formación de imágenes por resonancia magnética para diagnóstico.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende en un recipiente la sonda fluorescente de acuerdo con la presente invención, junto con instrucciones para su uso en un método de diagnóstico mediante microscopía de dos fotones.

En toda la descripción y las reivindicaciones no se pretende que la palabra “comprende” y las variaciones de la palabra, excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra “comprende” abarca el caso de “que consiste en”. Los objetivos, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia después del examen de la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferentes descritas en el presente documento.

Ejemplos

Los aminoácidos protegidos, las manipulaciones y las resinas los suministraron: Luxembourg Industries (Tel-Aviv, Israel), Neosystem (Estrasburgo, Francia), Calbiochem-Novabiochem AG (Laufelfingen, Suiza), Bachem AG (Bubendorf, Suiza) o Iris Biotech (Marktredwitz, Alemania). En la Tabla 1 se resumen otros reactivos y disolventes utilizados.

Tabla 1 Proveedores y reactivos comerciales utilizados. El DCM se pasó a través de una columna de Al2O3. La DMF se almacenó sobre tamices moleculares de 4A y el nitrógeno se burbujeó para eliminar agentes volátiles.

Proveedor comercial	Reactivos y disolventes
Albatros Chem. Inc.	N-hidroxibenzotriazol (HOBt)
Aldrich	L-dopa, piperidina, ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (ACH), lecho mixto DOWEX MR-3, rojo disperso I, 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-eno (DBU), bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), triisopropilsilano (TIS), 1,2-etanoditiol (EDT), bórax, ácido bórico, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico hidratado (MES), N-etil-N'-(3 dimetilaminopropil)carbodiimida, 5(6)-carboxifluoresceína, HEPES, amarillo lucifer, NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , NaHCO ₃ , glucosa, HBSS, piridoxal 5'-fosfato, NaIO ₄ 2-iminotiolano, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditiotreitól (DTT), tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0), feniilsilano, rodamina b, cloruro de tritilo, ditiioetilcarbamato de sodio, ácido 6-maleimidohexanoico

Proveedor comercial	Reactivos y disolventes
Applied GL Biochem Shanghai	1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt)
Cell applications	Células endoteliales de cerebro bovino
Charles river	Ratas wistar
Corning Costar	Transpocillos (0,33 cm ² ; tamaño de poro 0,4 µm)
Jescuder	NaOH
KaliChemie	Ácido trifluoroacético (TFA)
Lonza	Medio de cultivo
Merck	Tamices moleculares de 4 Å, capas de cromatografía en capa fina (TLC)
Micromod	Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (79-02-201)
Millipore	Filtros de difluoruro de polivinilideno (PVDF) 0,45 µm
Novabiochem	benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBOP), N-hidroxisuccinimida (NHS), resina de hidroxilamina Novatag™
Scharlau	diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), MeOH, <i>terc</i> -butilmetil éter
SDS	acetona, MeCN, tolueno
Thermo Scientific	Flotadores para dispositivos de diálisis Slide-A-Lizer MINI
GE-Healthcare	Columnas de desalado Nap-5, Vivaspin 500 LPM (límite de peso molecular) 50 kDa
Iris Biotech	Todos los aminoácidos excepto que se especifique otra cosa.
Farmacia del hospital Vall d'Hebron	Bevacizumab (Avastin®)

5 Consideraciones generales acerca de la síntesis. La elongación de los péptidos en fase sólida y otras manipulaciones en fase sólida se llevaron a cabo de forma manual en jeringas de polipropileno equipadas con un disco poroso de polietileno. Los disolventes y los reactivos solubles se eliminaron mediante succión. Los lavados entre las distintas etapas de síntesis se llevaron a cabo con dimetilformamida (DMF) (5 x 0,5 min) y diclorometano (DCM) (5 x 0,5 min) utilizando cada vez 10 ml de disolvente/gramo de resina.

10 Pruebas de identificación. La prueba utilizada para la identificación y control de la síntesis fue la siguiente: A) ensayo colorimétrico de Kaiser para la detección de aminas primarias unidas a fase sólida. (E. Kaiser *et al.*, "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides"; Anal. Biochem. 1970, vol. 34, pág. 595-598); la prueba de Kaiser se realizó lavando una pequeña muestra de resina (aprox. 1 mg) en DMF (4 x 1 min) y DCM (4 x 1 min). Se añadieron a la resina tres gotas de reactivo A y seis gotas de reactivo B, la mezcla resultante se calentó a 110 °C durante 3 minutos. La resina azul indica la presencia de esferas de aminas primarias libres. B) prueba de p-nitrofeniléster para aminas secundarias unidas a fase sólida (A. Madder *et al.*, "A novel sensitive colorimetric assay for visual detection of solid-phase bound amines". Eur. J. Org. Chem. 1999, pág. 2787-2791). El ensayo de p-nitrofeniléster se realiza lavando en primer lugar una muestra pequeña de la resina (aprox. 1 mg) con DMF (4x1 minutos) y DCM (4x1 minutos). Se añaden a la resina diez gotas de solución de reactivo (p-nitrofeniléster de rojo disperso 1 0,002 M en MeCN) y la mezcla resultante se calentó a 70 °C durante 10 minutos. Después, se decanta la solución y la resina se lava con DMF hasta obtener un sobrenadante transparente. Las esferas de resina de color rojo indican la presencia de aminas secundarias.

Protocolos utilizados durante la síntesis de las construcciones de fórmula (I) y (II). Las construcciones se sintetizaron a una escala de 200 µmol utilizando los siguientes métodos y protocolos:

25 Acondicionamiento inicial de la resina. La resina Fmoc-Rink amida p-MBHA se acondicionó lavando con DCM (5 x 30 s) y DMF (5 x 30 s) seguido de una solución de piperidina al 20 % en DMF (2 x 1 min y 1 x 10 min) para eliminar el grupo Fmoc. Para finalizar, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s).

30 Eliminación del grupo Fmoc. La eliminación del grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) se realizó con piperidina al 20 % (p/p) en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias (prolina).

Métodos de acoplamiento:

Acoplamiento del primer aminoácido en la resina Rink amida p-MBHA: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido N-prottegido (4 eq) y TBTU (4 eq) en DMF seguido de DIEA (8 eq). Se dejó la muestra reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión; la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser.

5

Acoplamiento del segundo aminoácido y de los siguientes aminoácidos en la resina Rink amida p-MBHA: el procedimiento fue el mismo que para el primero, excepto en que los acoplamientos sobre la prolina se realizaron utilizando 4 eq de aminoácido N-prottegido, 4 eq de PyBOP, 12 eq de HOAt y 12 eq de DIEA, la reacción se llevó a cabo en DMF y se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente (3 x 1,5 h). La eliminación del grupo

10 Fmoc de las prolinas, así como el grado de acoplamiento, se comprobó mediante la prueba de p-nitrofeniléster.

Acoplamiento a la carga (Z): dependiendo de la naturaleza de la carga, se unirá al transportador de BHE en fase sólida o en solución.

15 Acoplamiento de la carga en fase sólida: dependiendo de la naturaleza de la carga, se unirá al transportador de BHE a través de distintos tipos de enlaces químicos. Para cargas con un grupo funcional COOH (por ejemplo L-dopa, 5(6)-carboxifluoresceína) el acoplamiento de la carga en el transportador de BHE se realizó en fase sólida: se utilizó el transportador de BHE provisto de un grupo NH₂ y se hizo reaccionar durante 2 h con 4 eq de carga-COOH, utilizando 4 eq de PyBOP y 12 eq de HOAt como reactivos de acoplamiento, y 12 eq de DIEA como una base en

20 DMF. La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió dos veces más. El grado de acoplamiento se comprobó mediante la prueba de p-nitrofenilo.

Etapa de escisión final:

25

Se llevó a cabo tratando resina con TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %), EDT (al 2,5 %) y TIS (al 2,5 %) (1 x 1 h). Se añadió *terc*-butil éter al producto obtenido y la mezcla se centrifugó (2 x 8 min). El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

30 Acoplamiento de la carga en solución:

Etapa de escisión de la resina:

35 Se llevó a cabo tratando resina con TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %), EDT (al 2,5 %) y TIS (al 2,5 %) (1 x 1 h). Se añadió *terc*-butil éter al producto obtenido y la mezcla se centrifugó (2x8 min). El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

El acoplamiento de la carga con el grupo funcional COOH (por ejemplo puntos cuánticos, nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético) en solución se realizó utilizando el siguiente protocolo: se añadieron N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida 0,01 mmol (2 mg) y N-hidroxisuccinimida 0,025 mmol (3 mg) a 4 ml de una solución de puntos cuánticos o a nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (2 mg) en MES (50 mM, pH 6,5), se dejó reaccionar la mezcla durante 30 minutos y se añadieron 0,08 µmoles del transportador (0,12 mg). Se dejó reaccionar la mezcla durante 24 h con agitación suave. El péptido en exceso y los reactivos sin reaccionar se eliminaron mediante diálisis a 4 °C frente a agua durante 36 h. El agua se cambió cada 12 horas.

45

El acoplamiento de las cargas de anticuerpo:

El ligamiento del anticuerpo al transportador de BHE pudo realizarse mediante una de las siguientes tecnologías.

50 En todos los casos, los excipientes se eliminan de la formulación de anticuerpo (es decir, formulación de bevacizumab (Bv)) utilizando cromatografía de exclusión por tamaño seguida de una etapa de concentración utilizando filtración ultracentrífuga para obtener una solución de 20 mg/ml. Esta solución se denominará como "BvW".

55 Tec. 1 - Conjugación al extremo N

Se diluyeron 25 µl de solución de anticuerpo (es decir, BvW) ($3,3 \cdot 10^{-9}$ mol, $5,0 \cdot 10^{-4}$ g) con 75 µl de tampón fosfato 25 mM pH 6,5. Se disolvió piridoxal 5'-fosfato (PLP) (298 eq, $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol, $2,5 \cdot 10^{-5}$ g) en 100 µl de tampón fosfato 25 mM, y el pH se llevó a 6,5 con HCl 1 M. La solución de BvW se mezcló con la solución de PLP y se incubó a

60 20 °C durante 48 h. Se utilizó una columna de exclusión por tamaño Nap-5 para separar las moléculas pequeñas en exceso del anticuerpo derivatizado, utilizando tampón fosfato 25 mM pH 6,2. El anticuerpo se concentró hasta 100 µl utilizando Vivaspin 500 con LPM de 50 kDa y se lavó dos veces con tampón fosfato 25 mM pH 6,2. El péptido que portaba un grupo funcional aminoxi (60 eq, $2,0 \cdot 10^{-7}$ mol) se disolvió en 50 µl de tampón fosfato 25 mM y el pH se llevó a 6,2 con HCl 1 M acuoso. El anticuerpo transaminado procedente de la columna Nap-5 se mezcló con la

solución de péptido y con 50 µl de una solución de anilina $4 \cdot 10^{-3}$ M (60 eq, $2,0 \cdot 10^{-7}$ mol, $1,9 \cdot 10^{-5}$ g); la mezcla se dejó reaccionar durante 48 h. Los reactivos en exceso se eliminaron utilizando una columna de exclusión por tamaño Nap-5 con tampón fosfato 25 mM pH 6,2.

5 Tec. 2 - Conjugación de hidratos de carbono

Se diluyeron 25 µl de solución de anticuerpo (es decir, BvW) ($3,3 \cdot 10^{-9}$ mol, $5,0 \cdot 10^{-4}$ g) con 75 µl de PBS pH 7,2 y se mezcló con 10 µl de NaIO_4 0,1 M en agua (54 eq, $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol, $2,1 \cdot 10^{-4}$ g). La mezcla se dejó reaccionar 2 h a 4 °C preservándola de la luz. Se utilizó una columna de exclusión por tamaño Nap-5 para separar las moléculas pequeñas en exceso del anticuerpo derivatizado utilizando tampón fosfato 50 mM pH 6,2. El péptido que portaba un grupo funcional aminoxi (60 eq, $2,0 \cdot 10^{-7}$ mol) se disolvió en 50 µl de tampón fosfato 25 mM y el pH se llevó a 6,2 con HCl 1 M acuoso. El anticuerpo transaminado procedente de la columna Nap-5 se mezcló con la solución de péptido y con 50 µl de una solución de anilina $4 \cdot 10^{-3}$ M (60 eq, $2,0 \cdot 10^{-7}$ mol, $1,9 \cdot 10^{-5}$ g); la mezcla se dejó reaccionar durante 48 h. Los reactivos en exceso se eliminaron utilizando una columna de exclusión por tamaño Nap-5 con tampón fosfato 25 mM pH 6,2.

Tec. 3 - Conjugación a través de lisinas

Se diluyeron 25 µl de solución de anticuerpo (es decir, BvW) ($3,3 \cdot 10^{-9}$ mol, $5,0 \cdot 10^{-4}$ g) con 75 µl de PBS pH 7,2 y se incubó con 2-iminotiolano (30 eq, $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol, $1,4 \cdot 10^{-5}$ g) durante 1 h a 20 °C. Se utilizó una columna de exclusión por tamaño Nap-5 para separar el 2-iminotiolano que no reaccionó del anticuerpo tiolado, utilizando PBS pH 7,2. El péptido que portaba un grupo funcional maleimida (10 eq, $3,3 \cdot 10^{-8}$ mol) se disolvió en 50 µl de PBS y se mezcló con anticuerpo oxidado. La mezcla se deja reaccionar durante 2 h a 20 °C. El péptido en exceso se elimina utilizando una columna de exclusión por tamaño Nap-5 utilizando, PBS pH 7,2.

Tec. 4. Reducción-alquilación de disulfuros de anticuerpo intercadenas

4.1 Reducción de disulfuros limitada:

30 4.1.A. Reducción con DTT:

La solución de anticuerpo (es decir, BvW) se diluyó (2 mgml^{-1} , 500 µl) y se redujo de forma parcial mediante DTT (3,25 eq) en borato de sodio 0,025 M pH 8, NaCl 0,025 M, EDTA 1 mM durante 2 h a 37 °C. El exceso de DTT se purificó del anticuerpo parcialmente reducido mediante exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante). La concentración de los tioles de las cisteínas de anticuerpo producidos se determinó titulando con DTNB, dando normalmente como resultado 3,0 a 4,0 tioles/anticuerpo.

4.1.B. Reducción con TCEP

40 La solución de anticuerpo (es decir, BvW) se diluyó (2 mgml^{-1} , 500 µl) y se redujo de forma parcial mediante TCEP (2,5 eq respectivamente) en borato de sodio 0,025 M pH 8, NaCl 0,025 M, EDTA 1 mM, durante 2 h a 37 °C. No se necesitó purificación. La concentración de los tioles de las cisteínas de anticuerpo producidos se determinó titulando con DTNB, dando normalmente como resultado 3,0 a 4,0 tioles/anticuerpo.

45 4.2 Reoxidación parcial con DTNB después de la reducción total con DTT

La solución de anticuerpo (es decir, BvW) se diluyó (2 mgml^{-1} , 500 µl) y se redujo totalmente mediante DTT (150 eq) en borato de sodio 0,025 M pH 8, NaCl 0,025 M, EDTA 1 mM, durante 2 h a 37 °C. El exceso de DTT se purificó del anticuerpo parcialmente reducido mediante exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante). El anticuerpo completamente reducido se enfrió hasta 0 °C y después se trató con 2,0 equivalentes de DTNB (0 °C, 20 min). Sin purificación adicional, el anticuerpo se alquiló siguiendo el protocolo anterior (alquilación 1).

4.3 Alquilación

55 El anticuerpo parcialmente reducido se alquiló con 1,1 equiv. molares de 5(6)-carboxifluoresceína-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ o rodamina b-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂/tiol. La reacción de activación se realizó a 0 °C durante 30 min. Se utilizó cisteína (1 mM final) para agotar cualquier exceso de 5(6)-carboxifluoresceína-L-lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ o de rodamina b-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH que no haya reaccionado. El exceso de péptido se eliminó del anticuerpo parcialmente reducido mediante exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante).

La concentración de anticuerpo se cuantificó utilizando Nanodrop (coef. de ext. molar = $222714 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Caracterización de productos:

- 5 La identidad de los distintos compuestos sintetizados con fórmula I y II (transportador o combinación de transportador-carga) se confirmó utilizando espectrometría de masas “espectrometría de masas por desorción/ionización de láser asistida por matriz” (MALDI) (Instrumento: MALDI tiempo de vuelo (TOF) Voyager DE RP PE Biosystem) o HPLC-MS (Instrumento: Waters modelo Alliance 2796, bomba cuaternaria, detector de UV/Vis modelo 2487, ESI-MS modelo Micromass ZQ y programa informático Masslynx versión 4.0) utilizando una columna
- 10 Symmetry 300 C₁₈ 300 A (150 x 3,9 mm x 5 µm), utilizando un flujo de 1 ml/min; disolventes: A: H₂O con ácido fórmico al 0,1 %; B: MeCN con ácido fórmico al 0,07 %. Su pureza se comprobó mediante HPLC de fase inversa utilizando una columna Symmetry C₁₈ (150 x 4,6 mm x 5 µm, 100 A, Waters) y una columna Sunfire C₁₈ (100 x 4,6 mm x 3,5 µm, 100 A, Waters), flujo 1 ml/min; disolventes: A: H₂O con TFA al 0,045 %; B: MeCN con TFA al 0,036 %, instrumento: Waters modelo Alliance 2695 constituido por una bomba cuaternaria, un detector de serie de
- 15 diodos modelo 966, controlado por el programa informático Millennium versión 3.5.

Las construcciones que incluían un anticuerpo se caracterizaron utilizando espectrometría de masas “espectrometría de masas por desorción/ionización de láser asistida por matriz” (MALDI) (Instrumento: MALDI tiempo de vuelo (TOF) Voyager DE RP PE Biosystem), SDS page.

- 20 La electroforesis en SDS-PAGE se llevó a cabo utilizando el sistema de BioRad (celda Miniprotean), gel en Tris al 7,5 %, Tris 25 mM, glicina 192 mM, tampón de corrida de SDS al 0,1 %. Los pesos moleculares de las proteínas se aproximaron mediante comparación con un marcador de proteínas (Marcadores de Proteína Perfect 15-150 kDa de Novagen). Los geles se visualizaron mediante tinción de coomassie (solución de tinción: AcOH al 10 %, azul brillante
- 25 0,25 g; solución de descoloración: MeOH al 20 %, AcOH glacial al 3 %, en agua). Se utilizó secuenciación de Edman (primeros 4 ciclos) para cuantificar la cantidad de péptidos conjugados en el extremo N.

- Los compuestos se purificaron mediante HPLC utilizando una columna Symmetry C₁₈ (100 x 30 mm x 5 µm, 100 A, Waters), flujo 15 ml/min, disolventes: A: H₂O con TFA al 0,1 %; B: MeCN con TFA al 0,1 %, Instrumento: sistema
- 30 Waters con una bomba cuaternaria, autoinyector Simple Manager 2700, detector de UV/Vis modelo 2487 y un colector de fracciones II, controlado por el programa informático Masslynx versión 3.5.

Ejemplos

- 35 Ejemplo 1: Preparación de H-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1)

- La síntesis se realizó en una escala de 200 µmol. Para el acoplamiento del primer aminoácido en la resina Fmoc-Rink amida p-MBHA se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el derivado del
- 40 primer aminoácido protegido (Fmoc-D-Thr(tBu)-OH, 4 eq, 800 µmoles, 318 mg) y el agente de acoplamiento TBTU (4 eq, 800 µmoles, 257 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g de resina), seguido de la adición de DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 µl). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % (p/p) en DMF (p/p)
- 45 utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

- El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-His(Trt)-OH, 4 eq 800 µmoles, 496 mg), TBTU (4 eq, 800 µmoles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina),
- 50 posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 µl). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos.

- 55 El derivado de aminoácido protegido del tercer aminoácido se acopló al segundo aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, 4 eq, 800 µmoles, 519 mg), TBTU (4 eq, 800 µmoles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 µl). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos.
- 60

El derivado de aminoácido protegido del cuarto aminoácido se acopló al tercer aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Pro-OH, 4 eq, 800 μ moles, 270 g), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min), para asegurar la eliminación del grupo Fmoc.

10

El derivado de aminoácido protegido del quinto aminoácido se acopló al cuarto aminoácido ya anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Pro-OH, 4 eq 800 μ moles, 270 g), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg), HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq, 2,4 mmol, 408 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min), para asegurar la eliminación del grupo Fmoc.

15

El derivado de aminoácido protegido del sexto aminoácido se acopló al quinto aminoácido ya anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Met-OH, 4 eq, 800 μ moles, 297 g), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq, 2,4 mmol, 408 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos.

25

El derivado de aminoácido protegido del séptimo aminoácido se acopló al sexto aminoácido ya anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Trp(Boc)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 421 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos.

35

El derivado de aminoácido protegido del octavo aminoácido se acopló al séptimo aminoácido ya anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Ser(tBu)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 307 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos.

40

El derivado de aminoácido protegido del noveno aminoácido se acopló al octavo aminoácido ya anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Pro-OH, 4 eq, 800 μ moles, 270 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante la reacción colorimétrica de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min), para asegurar la eliminación del grupo Fmoc.

50

El derivado de aminoácido protegido del décimo aminoácido se acopló al noveno aminoácido ya anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Val-OH, 4 eq, 800 μ moles, 271 mg), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq, 2,4 mmol, 408 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con

55

60

DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos.

- 5 El derivado de aminoácido protegido del undécimo aminoácido se acopló al décimo aminoácido ya anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Trp(Boc)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 421 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos.
- 10
- 15 El derivado de aminoácido protegido del duodécimo aminoácido se acopló al undécimo aminoácido ya anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Pro-OH, 4 eq, 800 μ moles, 270 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y 1 tratamiento de 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc.
- 20
- 25 La etapa de escisión se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %), EDT (al 2,5 %) y TIS (al 1 %) (1 x 1 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y la mezcla se centrifugó (2 x 8 min). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.
- 30 Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m, 100 A, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 5,3 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 1489,6; rendimiento (síntesis y purificación): el 8,3 %.
- 35 Ejemplo 2: Preparación de H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 2)

El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió hasta el acoplamiento del duodécimo aminoácido.

- 40 Para el acoplamiento del resto glicina al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina Fmoc-Gly-OH (4 eq, 800 μ moles, 238 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó utilizando la prueba de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min, un tratamiento de 10 minutos.
- 45
- La etapa de escisión se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %), EDT (al 2,5 %) y TIS (al 1 %) (1 x 1 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y la mezcla se centrifugó (2 x 8 min). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.
- 50
- Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN desde el 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m, 100 A, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 4,3 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 1849,3; rendimiento (síntesis y purificación): el 4,7 %.
- 55

- 60 Ejemplo 3: Preparación de H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-aminoxi (SEQ ID NO: 2-Aminoxi)

El procedimiento del Ejemplo 2 se repitió hasta el acoplamiento del trigésimo aminoácido, utilizando resina de hidroxilamina de Novabiotag™ con una sustitución de 0,56 mmol/g.

La etapa de escisión se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %) y TIS (al 2,5 %) (1 x 2 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y la mezcla se centrifugó (2 x 8 min). El sobrenadante se retiró y el sedimento se resuspendió en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

- 5 Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 17 al 23 % en H₂O en 8 minutos utilizando, una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 mm, 100 Å, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 6,4 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 1663,9;

10 Ejemplo 4: Preparación de 5(6)-carboxifluoresceína-L-Lys(Aminoxi)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Ara-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1 para la incorporación de dos cargas)

El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió hasta el acoplamiento del duodécimo aminoácido.

- 15 Para el acoplamiento del resto lisina al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina Fmoc-Lys(Boc₂-AoA)-OH (4 eq, 800 µmoles, 513 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 µmoles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 µl). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.
- 20

- 25 Para el acoplamiento de la (5)6-carboxifluoresceína al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina rodamina b (4 eq, 800 µmoles, 383 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 µmoles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 µl). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min, un tratamiento de 10 minutos.
- 30

La etapa de escisión se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 95 %), H₂O (al 2,5 %) y TIS (al 2,5 %) (1 x 2 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y se centrifugó la mezcla (2 x 8 min). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

- 35 Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 mm, 100 Å, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 5,0 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 2021,9;

40 Ejemplo 5: Preparación de maleimida-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1 con maleimida como R₁)

El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió hasta el acoplamiento del duodécimo aminoácido.

- 45 Para el acoplamiento de la maleimida al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina ácido 6-maleimidohexanoico (4 eq, 800 µmoles, 169 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 µmoles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 µl). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser.
- 50

La etapa de escisión se realizó tratando la resina como una mezcla de TFA (al 95 %), H₂O (al 2,5 %) y TIS (al 2,5 %) (1 x 2 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y se centrifugó la mezcla (2 x 8 min.). El sobrenadante se retiró y el sedimento se resuspendió en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

- 55 Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: el gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 mm, 100 Å, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 5,3 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 2172,7;

60 Ejemplo 6: Preparación de rodamina b-L-Lys(Maleimida)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Ara-D-His-D-Thr-NH₂ ((SEQ ID NO:1 para la incorporación de dos cargas)

El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió hasta el acoplamiento del duodécimo aminoácido.

Para el acoplamiento del resto lisina al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: se

añadieron de forma secuencial a la resina Fmoc-Lys(alloc)-HO (4 eq, 800 μ moles, 362 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

Para el acoplamiento de la rodamina b al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina rodamina b (4 eq, 800 μ moles, 383 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min un tratamiento de 10 minutos.

Para la desprotección del grupo protector Alloc se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,1 eq, 20 μ mol, 23 mg) en DCM (1-3 ml/g de resina) y fenilsilano (10 eq, 2,0 mmol, 247 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla durante 15 min. El disolvente se eliminó mediante succión. La desprotección se repitió dos veces en las mismas condiciones. La peptidil-resina se lava con 3 ml de dietilditiocarbamato de sodio 0,02 M.

Para el acoplamiento de la maleimida al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina ácido 6-maleimidohexanoico (4 eq, 800 μ moles, 169 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser.

La etapa de escisión se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 95 %), H₂O (al 2,5 %) y TIS (al 2,5 %) (1 x 2 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y se centrifugó la mezcla (2 x 8 min.) Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m, 100 A, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 4,4 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 1869,1;

Ejemplo 7: Preparación de 5(6)-Carboxifluoresceína-L-Lys(Maleimida)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Ara-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:1 para la incorporación de dos cargas)

El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió hasta el acoplamiento del duodécimo aminoácido.

Para el acoplamiento del resto lisina al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron de forma secuencial a la resina Fmoc-Lys(alloc)-OH (4 eq, 800 μ moles, 362 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado del acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

Para el acoplamiento de (5)6-carboxifluoresceína al transportador de BHE anclado a la resina se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina rodamina b (4 eq, 800 μ moles, 383 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min, un tratamiento de 10 minutos.

Para la tritilación de los grupos funcionales fenol de la carboxifluoresceína se utilizó el siguiente protocolo: se añadió a la resina cloruro de tritilo (12 eq, 2,4 mmol, 223 mg). La mezcla se dejó reaccionar durante 16 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s).

Para la desprotección del grupo protector Alloc se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a

la resina tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,1 eq, 20 μ mol, 23 mg) en DCM (1-3 ml/g de resina) y fenilsilano (10 eq, 2,0 mmol, 247 μ l). La mezcla se dejó reaccionar durante 15 min. El disolvente se eliminó mediante succión. La desprotección se repitió dos veces en las mismas condiciones. La peptidil-resina se lavó con 3 ml de dietilditiocarbamato de sodio 0,02 M.

5

Para el acoplamiento de la maleimida al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina ácido 6-maleimidohexanoico (4 eq, 800 μ moles, 169 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se controló utilizando el ensayo colorimétrico de Kaiser.

La etapa de escisión se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 95 %), H₂O (al 2,5 %) y TIS (al 2,5 %) (1 x 2 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y se centrifugó la mezcla (2 x 8 min). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m, 100 Å, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 5,3 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 2172,7;

20

Ejemplo 8: Preparación del compuesto L-dopa-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trip-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: con una L-dopa como carga o grupos Z)

El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió hasta el acoplamiento del duodécimo aminoácido.

25

Para el acoplamiento de la carga (L-dopa) al transportador de BHE anclado en la resina se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina la carga-COOH (Fmoc-L-Dopa-OH) (4 eq, 800 μ moles, 324 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió dos veces en las mismas condiciones. El grado del acoplamiento se controló utilizando la prueba de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

La etapa de escisión se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %) y TIS (al 1 %) (1 x 1 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y se centrifugó la mezcla (2 x 8 min). Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m, 100 Å, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 4,51 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 1670,2; rendimiento (síntesis y purificación): el 3,8 %.

Ejemplo 9: Preparación del compuesto 5(6)-Carboxifluoresceína-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Ara-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1 con 5(6)-Carboxifluoresceína como carga o grupo Z)

El procedimiento se repitió como en el Ejemplo 1 hasta el acoplamiento del duodécimo aminoácido.

Para el acoplamiento de la carga (5)6-carboxifluoresceína al transportador de BHE anclado en la resina, se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina la carga-COOH (5(6)-carboxifluoresceína) (4 eq, 800 μ moles, 301 mg) en DMF (1-3 ml/g de resina), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg) y HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg), seguido de la adición de 12 eq de DIEA (2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión, la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El acoplamiento se repitió dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se controló utilizando la prueba de p-nitrofeniléster.

La etapa de escisión se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %), EDT (al 2,5 %) y TIS (al 1 %) (1 x 1 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y se centrifugó la mezcla (2 x 8 min). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 μ m, 100 Å, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 5,06 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 1849,3; rendimiento (síntesis y purificación):

el 4,2 %.

Ejemplo 10: Preparación de punto cuántico-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 2 con punto cuántico como carga o grupo Z)

5

El procedimiento se repitió como en el Ejemplo 1 hasta el acoplamiento del duodécimo aminoácido.

En este ejemplo se utilizó como un espaciador entre el transportador y la carga una molécula de glicina. La glicina se añadió al transportador anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-Gly-OH, 4 eq, 800 μ moles, 190 mg), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg), HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq, 2,4 mmol, 408 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

La etapa de escisión del transportador con el espaciador se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %), EDT (al 2,5 %) y TIS (al 1 %) (1 x 1 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido, se centrifugó la mezcla resultante (2 x 8 min). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

El acoplamiento del transportador equipado con la glicina espaciadora a la carga (punto cuántico) se realizó en solución, de acuerdo con el siguiente protocolo: se añadió N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida 0,01 mmol (2 mg) y N-hidroxisuccinimida 0,025 mmol (3 mg) a 4 ml de una solución de puntos cuánticos (12 mg) en MES (50 mM, pH 6,5), se dejó reaccionar la mezcla durante 30 minutos. Después de esto se añadieron 0,08 μ moles (0,2 mg) del transportador con el espaciador de glicina. Se dejó reaccionar esta mezcla durante 24 h con agitación suave. El péptido en exceso y el reactivo que no reaccionó se eliminaron mediante diálisis a 4 °C frente a agua durante 36 h. El agua se cambió cada 12 horas.

30

Caracterización del producto. El producto se caracterizó mediante mediciones del potencial zeta a pH 7,4. El producto carga-transportador presentó un potencial zeta de -33,8 mV (los puntos cuánticos no ligados al transportador mostraron un potencial zeta de -37,4 mV).

Ejemplo 11: Preparación de óxido de hierro superparamagnético de nanopartículas (SPION)-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 2 con SPION como carga o grupo Z).

El Ejemplo 10 se repitió hasta la etapa de escisión del transportador con el espaciador incluido.

La unión del transportador con un espaciador de glicina a la nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético en solución se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: se añadió N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida 0,01 mmol (2mg) y N-hidroxisuccinimida 0,025 mmoles (3mg) a 4 ml de una solución de nanopartículas (2mg) en MES (50 mM, pH 6,5), se dejó reaccionar durante 30 minutos y se añadieron 0,08 μ mol (0,12 mg) de espaciador de glicina de transportador. Se dejó reaccionar durante 24 h en agitación suave. El péptido en exceso y los reactivos que no reaccionaron se eliminaron mediante diálisis a 4 °C frente a agua durante 36 h. El agua se cambió cada 12 horas.

Caracterización del producto. El producto se caracterizó mediante mediciones del potencial zeta a pH 7,4. El producto mostró un pospotencial Z de transportador de -31 mV (las nanopartículas no unidas al transportador mostraron en un potencial zeta de -37,1 mV).

Ejemplo 12: Preparación de H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 4 = SEQ ID NO: 1 con SEQ ID NO: 3 como carga o grupo Z)

55

El procedimiento se repitió como en el Ejemplo 1 hasta el acoplamiento del duodécimo aminoácido.

En este ejemplo la carga se sintetizó mediante síntesis en fase sólida de forma directa en el transportador anclado en la resina. El primer derivado de aminoácido protegido de la carga se acopló al transportador de BHE anclado en la resina, utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 375mg), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg), HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327mg) disuelto en DMF (1-3mUg de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq, 2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se repitió dos veces en las mismas

condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó utilizando el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min, un tratamiento de 10 minutos.

- 5 El derivado de aminoácido protegido de la segunda posición de la carga se acopló en el primer aminoácido de la carga anclada en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 375 mg) y TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

- 15 El derivado de aminoácido protegido de la tercera posición de la carga se acopló al segundo aminoácido de la carga anclada en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Leu(Boc)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 283 mg) y TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

- 25 El derivado de aminoácido protegido de la cuarta posición de la carga se acopló a la posición del tercer aminoácido de la carga anclada en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Val-OH, 4 eq, 800 μ moles, 271 mg) y TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

- 35 El derivado de aminoácido protegido de la posición del quinta de la carga se acopló al cuarto aminoácido de la carga anclada en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Nal(2)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 350 mg) y TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 ml). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

- 40 El derivado de aminoácido protegido de la sexta posición de la carga se acopló al quinto aminoácido de la carga anclada en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-NMePhe-OH, 4 eq, 800 μ moles, 321 mg) y TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante la reacción colorimétrica de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min), para evaluar la eliminación del grupo Fmoc.

- 50 El derivado de aminoácido protegido de la posición séptima de la carga se acopló al sexto aminoácido de la carga anclada en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-D-Ala-OH, 4 eq, 800 μ moles, 249 mg), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg), HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq, 2,4 mmol, 408 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

- 60 La etapa de escisión de la construcción carga-transportador se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %), EDT (al 2,5 %) y TIS (al 1 %) (1 x 1 h). Se añadió *tert*-butilmetil éter al producto obtenido y se centrifugó la mezcla (2 x 8 min). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

Caracterización de la construcción carga-transportador. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 mm, 100 Å, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 4,52 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 2387,3; rendimiento 5 (síntesis y purificación): el 9,5 %.

Ejemplo 13: Preparación de H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Ara-D-His-D-Thr-Anticuerpo (SEQ ID NO: 2 con un anticuerpo como carga o grupo Z, utilizando la tec. 1.

- 10 El Ejemplo 3 se repitió hasta la etapa de escisión. La unión del transportador con el anticuerpo se realizó siguiendo la tec. 1 de aminoxi, en solución; se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: se diluyeron 25 µl de BvW (3,3·10⁻⁹ mol, 5,0·10⁻⁴ g) con 75 µl de tampón fosfato 25 mM pH 6,5. Se disolvió piridoxal 5'-fosfato (PLP) (298 eq, 1,0·10⁻⁷ mol, 2,5·10⁻⁵ g) en 100 µl de tampón fosfato 25 mM y el pH se llevó a 6,5 con HCl 1 M. La solución de BvW se mezcló con la solución de PLP y se incubó a 20 °C durante 48 h. Se utilizó una columna de exclusión por tamaño
- 15 Nap-5 para separar las moléculas pequeñas en exceso del anticuerpo derivatizado, utilizando tampón fosfato 25 mM pH 6,2. El anticuerpo se concentró hasta 100 µl utilizando una Vivaspin 500 con LPM de 50 kDa y se lavó dos veces con tampón fosfato 25 mM pH 6,2. Se disolvió H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-aminoxi (60 eq, 2,0·10⁻⁷ mol) en 50 µl de tampón fosfato 25 mM y el pH se llevó hasta 6,2 con HCl 1 M acuoso. El anticuerpo transaminado procedente de la columna Nap-5 se mezcló con la solución de péptido y
- 20 con 50 µl de una solución de anilina 4·10⁻³ M (60 eq, 2,0·10⁻⁷ mol, 1,9·10⁻⁵ g); la mezcla se dejó reaccionar durante 48 h. Los reactivos en exceso se eliminaron utilizando una columna de exclusión por tamaño Nap-5, con tampón fosfato 25 mM pH 6,2.

Los conjugados se caracterizaron mediante MALDI-TOF MS y la cantidad de péptido se cuantificó utilizando 3 ciclos de secuenciación de Edman (1-2 péptidos/Ac).

Ejemplo 14: Preparación de H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-Anticuerpo (SEQ ID NO: 2 con un anticuerpo como carga o grupo Z) utilizando la tec. 2

- 30 El Ejemplo 3 se repitió hasta la etapa de escisión. La unión del transportador con el anticuerpo se realizó siguiendo la tec. 2 de aminoxi, en solución; se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: se diluyeron 25 µl de BvW (3,3·10⁻⁹ mol, 5,0·10⁻⁴ g) con 75 µl de PBS pH 7,2, y se mezcló con 10 µl de NaIO₄ 0,1 M en agua (54 eq, 1,0·10⁻⁶ mol, 2,1·10⁻⁴ g). Se dejó reaccionar la mezcla 2 h a 4 °C preservando de la luz. Para separar las moléculas pequeñas en exceso del anticuerpo derivatizado se utilizó una columna de exclusión por tamaño Nap-5, utilizando
- 35 tampón fosfato 50 mM pH 6,2. Se disolvió H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-aminoxi (60 eq, 2,0·10⁻⁷ mol, 3,4·10⁻⁴ g) en 50 µl de tampón fosfato 25 mM y el pH se llevó a 6,2 con HCl 1 M acuoso. El anticuerpo transaminado procedente de la columna Nap-5 se mezcló con la solución de péptido y con 50 µl de una solución de anilina 4·10⁻³ M (60 eq, 2,0·10⁻⁷ mol, 1,9·10⁻⁵ g); se dejó reaccionar la mezcla durante 48 h. Los reactivos en exceso se eliminaron utilizando una columna de exclusión por tamaño Nap-5, con tampón
- 40 fosfato 25 mM pH 6,2.

Los conjugados se caracterizaron por MALDI-TOF MS (1-2 péptidos/Ac).

- Ejemplo 15: Preparación de 5(6)-Carboxifluoresceína-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1 con 5(6)-Carboxifluoresceína y un anticuerpo como cargas o grupos Z en el compuesto de fórmula (II)) utilizando la tec. 3

- El Ejemplo 7 se repitió hasta la etapa de escisión. La unión del transportador con el anticuerpo se realizó siguiendo la tec. 3 de maleimido, en solución; se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: se diluyeron 25 µl de BvW
- 50 (3,3·10⁻⁹ mol, 5,0·10⁻⁴ g) con 75 µl de PBS pH 7,2, y se incubó con 2-iminotiolano (30 eq, 1,0·10⁻⁷ mol, 1,4·10⁻⁵ g) durante 1 h a 20 °C. Para separar el 2-iminotiolano que no reaccionó del anticuerpo tiolado se utilizó una columna de exclusión por tamaño Nap-5, utilizando PBS pH 7,2. Se disolvió carboxifluoresceína-L-Lys(maleimida)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (10 eq, 3,3·10⁻⁸ mol, 7,2·10⁻⁵ g) en 50 µl de PBS y se mezcló con el anticuerpo oxidado. Se dejó reaccionar la mezcla durante 2 h a 20 °C. El péptido en exceso
- 55 se eliminó utilizando una columna de exclusión por tamaño Nap-5 utilizando PBS pH 7,2.

Los conjugados se caracterizaron por MALDI-TOF MS y por electroforesis en gel. (2 péptidos/Ac).

- Ejemplo 16: Preparación de 5(6)-Carboxifluoresceína-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1 con 5(6)-Carboxifluoresceína y un anticuerpo como cargas o grupos Z en el compuesto de fórmula (II)) utilizando la tec. 4.1.A y 4.3.

El Ejemplo 7 se repitió hasta la etapa de escisión. La unión del transportador con el anticuerpo se realizó siguiendo la tecnología de maleimido tec. 4.

Se redujo parcialmente una solución de anticuerpo (1 mgml⁻¹, 500 µl) mediante DTT (3,25 eq, 2,2 µl, 10 mM) o TCEP (2,75 eq, 1,8 µl, 10 mM) en borato de sodio 0,025 M pH 8, NaCl 0,025 M, EDTA 1 mM, durante 2 h a 37°C. El exceso de DTT se purificó del anticuerpo parcialmente reducido mediante exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare, siguiendo las instrucciones de fabricante). La concentración de los tioles de las cisteínas de anticuerpo producidos se determinó titulando con DTNB, dando como resultado normalmente 3,0 a 4,0 tioles/anticuerpo.

El anticuerpo parcialmente reducido se alquiló con 1,1 equiv. molares de 5(6)-carboxifluoresceína-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂/tiol de cisteínas del anticuerpo (4 eq, 5,8 µl, DMSO 10 mgml⁻¹). La reacción de alquilación se realizó a 0 °C durante 30 min. Se utilizó cisteína (1 mM final) para agotar cualquier exceso de 5(6)-carboxifluoresceína-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ que no hubiere reaccionado. El exceso de péptido se eliminó del anticuerpo parcialmente reducido mediante exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare, siguiendo las instrucciones de fabricante).

La concentración del anticuerpo se cuantificó utilizando Nanodrop (coef. ext. molar = 222714 M⁻¹ cm⁻¹).

Caracterización del producto. El producto se caracterizó por MALDI-TOF. MS: 25827; SDS page y LC MS (1 a 3 péptidos/Ac).

Ejemplo 17: Preparación de rodamina b-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1 con rodamina b y un anticuerpo como cargas o grupos z en el compuesto de fórmula (II)) utilizando la tec. 3.

El ejemplo 6 se repitió hasta la etapa de escisión. La unión del transportador con el anticuerpo se realizó siguiendo la tec. 3 de maleimido en solución; se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: se diluyeron 25 µl de BvW (3,3·10⁻⁹ mol, 5,0·10⁻⁴ g) con 75 µl de PBS pH 7,2 y se incubó con 2-iminotiolano (30 eq, 1,0·10⁻⁷ mol, 1,4·10⁻⁵ g) durante 1 h a 20 °C. Para separar el 2-iminotiolano que no había reaccionado del anticuerpo tiolado se utilizó una columna de exclusión por tamaño Nap-5, utilizando PBS pH 7,2. Se disolvió rodamina b-L-Lys(maleimida)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (10 eq, 3,3·10⁻⁸ mol, 7,4·10⁻⁵ g) en 50 µl de PBS y se mezcló con el anticuerpo oxidado. La mezcla se dejó reaccionar durante 2 h a 20 °C. El péptido en exceso se eliminó utilizando una columna de exclusión por tamaño Nap-5 utilizando PBS pH 7,2.

Los conjugados se caracterizaron por MALDI-TOF MS y por electroforesis en gel. (5 péptidos/Ac).

Ejemplo 18: Preparación de rodamina b-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1 con rodamina b y un anticuerpo como cargas o grupos Z en el compuesto de fórmula (II)) utilizando la tec. 4.1.A y 4.3.

El ejemplo 6 se repitió hasta la etapa de escisión. La unión del transportador con el anticuerpo se realizó siguiendo la tecnología tec. 4 de maleimido. Se redujo parcialmente una solución de anticuerpo (1 mgml⁻¹, 500 µl) mediante DTT (3,25 eq, 2,2 µl, 10 mM) o TCEP (2,75 eq, 1,8 µl, 10 mM) en borato de sodio al 0,025 M pH 8, NaCl 0,025 M, EDTA 1 mM durante 2 h a 37 °C. El exceso de DTT se purificó del anticuerpo parcialmente reducido mediante exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare siguiendo las instrucciones del fabricante). La concentración de los tioles de las cisteínas de anticuerpo producidos se determinó titulando con DTNB, dando normalmente como resultado 3,0 a 4,0 tioles/anticuerpo.

El anticuerpo parcialmente reducido se alquiló con 1,1 equiv. molares de rodamina b-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂/tiol de cisteínas de anticuerpo (DMSO 4 eq, 5,8 µl, 10 mgml⁻¹). La reacción de alquilación se realizó a 0 °C durante 30 min. Se utilizó cisteína (1 mM final) para agotar cualquier exceso de rodamina b-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ que no hubiese reaccionado. El exceso de péptido se eliminó del anticuerpo parcialmente reducido mediante exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante).

La concentración de anticuerpo se cuantificó utilizando a Nanodrop (coef. ext. molar = 222714 M⁻¹ cm⁻¹).

Caracterización del producto. El producto se caracterizó por MALDI-TOF. MS: 25827; SDS page y LC MS (2 a 3 péptidos/Ac).

Ejemplo 19: Preparación de rodamina b-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1 con rodamina b y un anticuerpo como cargas o grupos Z en el compuesto de fórmula (II)) utilizando la tec. 4.1.B y 4.3.

El Ejemplo 6 se repitió hasta la etapa de escisión. La unión del transportador con el anticuerpo se realizó siguiendo la tecnología tec. 4 de maleimido. Se redujo de forma parcial una solución de anticuerpo (1 mg ml^{-1} , $500 \mu\text{l}$) mediante TCEP ($2,75 \text{ eq}$, $1,8 \mu\text{l}$, 10 mM) en borato de sodio $0,025 \text{ M}$ pH 8, NaCl $0,025 \text{ M}$, EDTA 1 mM , durante 2 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. La concentración de los tioles de las cisteínas de anticuerpo producidos se determinó titulando con DTNB, dando como resultado normalmente $3,5$ a $4,0$ tioles/anticuerpo.

El anticuerpo parcialmente reducido se alquiló con $1,1$ equiv. molares de rodamina b-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂/tiol de cisteína de anticuerpo (DMSO 4 eq , $5,8 \mu\text{l}$, 10 mg ml^{-1}). La reacción de alquilación se realizó a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min . Se utilizó cisteína (1 mM final) para agotar cualquier exceso de rodamina b-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ que no hubiese reaccionado. El exceso de péptido se eliminó del anticuerpo parcialmente reducido mediante exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante).

15 La concentración de anticuerpos se cuantificó utilizando Nanodrop (coef. ext. molar = $222714 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Caracterización del producto. El producto se caracterizó por MALDI-TOF. MS: 150707-155257; SDS page y LC MS (2 a 3 péptidos/Ac).

20 Ejemplo 20: Preparación de rodamina b-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 1 con rodamina b y un anticuerpo como cargas o grupos Z en el compuesto de fórmula (II)) utilizando la tec. 4.2 y 4.3.

El Ejemplo 6 se repitió hasta la etapa de escisión. La unión del transportador con el anticuerpo se realizó siguiendo la tecnología tec. 4 de maleimido.

Se redujo de forma total una solución de anticuerpo ($2,8 \text{ mg ml}^{-1}$, $500 \mu\text{l}$) mediante DTT (150 eq) en borato de sodio $0,025 \text{ M}$ pH 8, NaCl $0,025$, EDTA 1 mM , durante 2 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. El exceso de DTT se purificó del anticuerpo parcialmente reducido mediante exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante). El anticuerpo completamente reducido se enfrió hasta $0 \text{ }^\circ\text{C}$ y después se trató con $2,0$ equivalentes de DTNB ($1,85 \mu\text{l}$, 4 mg ml^{-1} , 0°C , 20 min). El anticuerpo se alquiló sin purificación adicional con $1,1$ equiv. molares de rodamina b-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂/tiol de cisteínas de anticuerpo (DMSO 9 eq , $18 \mu\text{l}$, 10 mg ml^{-1}). La reacción de alquilación se realizó a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Se utilizó cisteína (1 mM final) para agotar cualquier exceso de rodamina b-L-Lys(maleimido)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ que no hubiese reaccionado. El exceso de péptido se eliminó del anticuerpo parcialmente reducido por exclusión por tamaño (Nap 5, GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante).

La concentración de anticuerpo se cuantificó utilizando un Nanodrop (coef. ext. molar = $222714 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

40 Caracterización del producto. El producto se caracterizó por MALDI-TOF. MS: 167061,9; SDS page y LC MS (8 péptidos/Ac).

45 Ejemplo comparativo 1: Preparación de H-L-Thr-L-His-L-Arg-Pro-L-L-Pro-L-Met-L-Trp-L-Ser-Pro-L-L-Val-L-Trp-L-Pro-NH₂ (SEQ ID NO:5)

Se realizó la síntesis en una escala de $200 \mu\text{mol}$. Para el acoplamiento del primer aminoácido en la resina Fmoc-Rink amida p-MBHA se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el primer aminoácido protegido (Fmoc-L-Pro-OH, 4 eq , $800 \mu\text{moles}$, 270 mg), TBTU (4 eq , $800 \mu\text{moles}$, 257 mg) disuelto en DMF ($1-3 \text{ ml/g}$ de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq , $1,3 \text{ mmol}$, $267 \mu\text{l}$). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante $1,5 \text{ h}$. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF ($5 \times 30 \text{ s}$) y DCM ($5 \times 30 \text{ s}$). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20% en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5% , 5% , 20% , 70%) ($2 \times 55 \text{ min}$), para evaluar la eliminación del grupo Fmoc.

El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, 4 eq , $800 \mu\text{moles}$, 421 mg), PyBOP (4 eq , $800 \mu\text{moles}$, 416 mg), HOAt (12 eq , $2,4 \text{ mmol}$, 327 mg) disuelto en DMF ($1-3 \text{ ml/g}$ de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq , $2,4 \text{ mmol}$, $408 \mu\text{l}$). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante $1,5 \text{ h}$. Se eliminó el disolvente mediante succión y la resina se lavó con DMF ($5 \times 30 \text{ s}$) y DCM ($5 \times 30 \text{ s}$). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20% en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un

tratamiento de 10 minutos.

El derivado protegido del tercer aminoácido se acopló al segundo aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-L-Val-OH, 4 eq, 800 μ moles, 271 mg) y el agente de acoplamiento TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina) seguido de la adición de DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

El derivado de aminoácido protegido del cuarto aminoácido se acopló al tercer aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-L-Pro-OH, 4 eq, 800 μ moles, 270 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min), para evaluar la eliminación del grupo Fmoc.

El derivado de aminoácido protegido del quinto aminoácido se acopló al cuarto aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 307 mg), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg), HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq, 2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min), para evaluar la eliminación del grupo Fmoc.

El derivado de aminoácido protegido del sexto aminoácido se acopló al quinto aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadió de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 421 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

El derivado de aminoácido protegido del séptimo aminoácido se acopló al sexto aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-L-Met-OH, 4 eq, 800 μ moles, 297 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

El derivado de aminoácido protegido del octavo aminoácido se acopló al séptimo aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-L-Pro-OH, 4 eq, 800 μ moles, 270 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min), para evaluar la eliminación del grupo Fmoc.

El derivado de aminoácido protegido del noveno aminoácido se acopló al octavo aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-L-Pro-OH, 4 eq, 800 μ moles, 270 mg), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg), HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq, 2,4 mmol, 408 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla

con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 5 10 minutos, y el tratamiento con DBU, tolueno, piperidina, DMF (al 5 %, 5 %, 20 %, 70 %) (2 x 5 min), para evaluar la eliminación del grupo Fmoc.

El derivado de aminoácido protegido del décimo aminoácido se acopló al noveno aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc-L-Arg 10 (Pbf)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 519 mg), PyBOP (4 eq, 800 μ moles, 416 mg), HOAt (12 eq, 2,4 mmol, 327 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (12 eq, 2,4 mmol, 408 μ l). La mezcla dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces en las mismas condiciones. El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de p-nitrofeniléster. El grupo Fmoc se 15 eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p) utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

El derivado de aminoácido protegido del undécimo aminoácido se acopló al décimo aminoácido ya anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc- 20 L-His(Trt)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 496 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min, un tratamiento de 25 10 minutos.

El derivado de aminoácido protegido del duodécimo aminoácido se acopló al undécimo aminoácido anclado en la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron de forma secuencial a la resina el aminoácido protegido (Fmoc- 30 L-Thr (tBu)-OH, 4 eq, 800 μ moles, 257 mg), TBTU (4 eq, 800 μ moles, 257 mg) disuelto en DMF (1-3 ml/g de resina), posteriormente se añadió DIEA (8 eq, 1,3 mmol, 267 μ l). Se dejó reaccionar la mezcla con agitación manual intermitente durante 1,5 h. El disolvente se eliminó mediante succión y la resina se lavó con DMF (5 x 30 s) y DCM (5 x 30 s). El grado de acoplamiento se comprobó mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (p/p), utilizando dos tratamientos de 1 min y un tratamiento de 10 minutos.

35 La etapa de escisión se realizó tratando la resina con una mezcla de TFA (al 94 %), H₂O (al 2,5 %), EDT (al 2,5 %) y TIS (al 1 %) (1 x 1 h). Se añadió al producto obtenido *tert*-butilmetil éter y la mezcla se centrifugó (2 x 8 min). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una mezcla de H₂O y MeCN (1:1). El producto se filtró y se liofilizó.

40 Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 mm, 100 A, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 4,95 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 1489,6; rendimiento (síntesis y purificación): el 12 %.

45 Ejemplo comparativo 2: Preparación de H-D-Thr-D-His-D-Arg-D-Pro-D-Pro-D-Met-D-Trp-D-Ser-D-Pro-D-Val-D-Trp-D-Pro-NH₂ (SEQ ID NO: 5)

50 Se repitió el Ejemplo comparativo 1 pero utilizando los correspondientes D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos.

Caracterización del producto. HPLC de fase inversa: gradiente lineal de MeCN del 0 al 100 % en H₂O en 8 minutos, utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5 mm, 100 A, Waters), flujo de 1 ml/min; tiempo de retención: 4,3 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): [M + H]⁺: 1489,6; rendimiento (síntesis y purificación): el 9,8 %.

55 Ejemplo 21: Evaluación del transporte a través de la BHE utilizando un ensayo celular *in vitro*

El método de evaluación elegido para probar los compuestos de fórmula (I) y (II) de la invención fue un ensayo a base de células que consiste en un cocultivo de células endoteliales de cerebro y astrocitos, el cual permite evaluar 60 o predecir el transporte de compuestos a través de la BHE. El método de cocultivo utilizado fue el descrito por Gaillard y de Boer en 2008 (Gaillard, PJ *et al.* "2B-Trans technology: targeted drug delivery across the blood-brain barrier" *Methods Mol Biol* 2008, vol. 437 pág. 161-175) y consiste en la siembra de astrocitos de rata en un lado de un filtro del policarbonato (transpocillo) y la siembra de células endoteliales de cerebro bovino en el otro lado del filtro. En estas condiciones, las células endoteliales tienen la capacidad de alcanzar la confluencia imitando la BHE.

El sistema permite el estudio del transporte de compuestos que pueden cruzar la BHE mediante un mecanismo de transporte pasivo y/o activo. Es un modelo utilizado comúnmente para estudios de permeación y de toxicidad de compuestos a través de la BHE.

- 5 El ensayo de cocultivo se utilizó para determinar la capacidad de las construcciones carga-transportador para cruzar la BHE. La permeabilidad aparente de los compuestos se midió por triplicado a una concentración de 50 μM para los Ejemplos 1, 2, 3, 4 y 7, y a una concentración de 0,75 nM (referido a la concentración de partícula) para los Ejemplos 5 y 6. Todos los ensayos se realizaron con valores de resistencia eléctrica transendotelial iguales o mayores que $125 \Omega \cdot \text{cm}^2$ y se llevaron a cabo en presencia de amarillo lucifer para evaluar la integridad de la membrana celular durante la prueba. Las pruebas de permeabilidad se revisaron en tampón Ringer-HEPES a pH 7,4. El compuesto de interés se disolvió en el tampón hasta la concentración deseada.

- Una vez que las células endoteliales se encontraban confluentes en los filtros (transpocillos), estas se lavaron con tampón Ringer-HEPES. El pocillo aceptor se llenó con 800 μl de tampón Ringer-HEPES y el pocillo donante con 200 μl de la solución del compuesto a estudiar. El sistema se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ y CO_2 al 5 % durante 2 h. Después de ese tiempo, el contenido de los compartimentos aceptor y donante se analizaron mediante HPLC, ICP (siglas del inglés *inductively coupled plasma*: plasma acoplado de forma inductiva) o mediciones de fluorescencia (dependiendo de la carga anclada al transportador). El transporte se confirmó también por espectrometría de masas MALDI-TOF.

- 20 La permeabilidad aparente se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Pap} = (\text{dQ}/\text{dt}) * (1/\text{A}) * (1/\text{C}_0) \text{ (cm/s)}$$

- En donde (dQ/dt) es la cantidad de compuesto presente en el compartimento aceptor en función del tiempo (nmol/s).
25 A es el área del filtro (cm^2) y C_0 es la concentración inicial del compuesto aplicado en el compartimento donante (nmol/ml).

- En la [Tabla 2](#) se puede observar cómo el uso de la construcción transportador-carga permite que las cargas que no cruzan por sí mismas son capaces de hacerlo por medio del transportador de BHE. Siendo el transportador del ejemplo 1 notablemente más eficaz que el ejemplo comparativo 1 con L-aminoácidos o que el ejemplo comparativo 2 con D-aminoácidos. La versión de enantiómero retro con D-aminoácidos tiene, de forma sorprendente, un transporte elevado a través de la barrera hematoencefálica.

- Tabla 2: Permeabilidad aparente (Pap) y porcentaje de transporte tras un ensayo de 2 horas para los Ejemplos 11, 2, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 y 20. Se muestran como controles los ejemplos comparativos 1 y 2. Las cargas L-dopa, 5(6)-carboxifluoresceína, rodamina b, puntos cuánticos, nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION), el péptido H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH₂ y el anticuerpo Avastin, no se detectaron en los compartimentos aceptores tras el ensayo de 2 h.

Compuesto de referencia	Compuesto	Pap (x 10 ⁶) cm/s	Transporte (%) (2 h)
Ejemplo comparativo 1	H-L-Thr-L-His-L-Arg-L-Pro-L-Pro-L-Met-L-Trp-L-Ser-L-Pro-L-Val-L-Trp-L-Pro-NH ₂	12,5±5,2	14,9±2,5
Ejemplo comparativo 2	H-D-Thr-D-His-D-Arg-D-Pro-D-Pro-D-Met-D-Trp-D-Ser-D-Pro-D-Val-D-Trp-D-Pro-NH ₂	9,9±1,6	11,7±6,4
Carga	L-Dopa	--	--
Carga	5(6)-carboxifluoresceína	--	--
Carga	Rodamina b	--	--
Carga	Punto cuántico	--	--
Carga	SPION	--	--
Carga	H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH ₂	--	--
Carga	Anticuerpo Avastin parcialmente reducido y retenido con reactivo de Ellman	0,054±0,005	0,064±0,006
Ejemplo 1:	H-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂	21,4±2,1	25,1 ±3
Ejemplo 2:	H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂	19,4±1,8	22,3±2,6

Ejemplo 8:	L-Dopa-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂	8,46±2,1	10,1 ± 1,3
Ejemplo 9:	5(6)-carboxifluoresceína-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂	16,2±1,3	17,1±2,6
Ejemplo 10:	Punto cuántico-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂	0,27±0,03	0,31 ±0,02
Ejemplo 11:	SPION-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂	0,19±0,07	0,22±0,05
Ejemplo 12:	H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂	0,14±0,01	0,2±0,04

Compuesto de referencia	Compuesto	Pap (x 10 ⁶) cm/s	Transporte (%) (2 h)
Ejemplo 17:	Rodamina b-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂ tec. 3 (5 péptidos/Ac).	0,16±0,10	0,13±0,08
Ejemplo 18:	Rodamina b-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂ tec. 4.1.A y 4.3 (2-3 péptidos/Ac).	0,18±0,05	0,15±0,04
Ejemplo 20:	Rodamina b-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂ tec. 4.2 y 4.3 (8 péptidos/Ac).	0,36±0,19	0,30±0,16

Los valores de permeabilidad iguales a o mayores que 1×10^{-6} cm/s se consideran excepcionalmente buenos y los valores iguales a o mayores que $0,1 \times 10^{-6}$ cm/s se consideran buenos. Los valores de permeabilidad dependen de forma elevada de la carga utilizada. Para una carga grande, tal como los puntos cuánticos o SPION, los valores próximos a $0,1 \times 10^{-6}$ cm/s se consideran que son muy buenos.

Ejemplo 22: Estabilidad del transportador en suero humano

10 Una de las ventajas principales de los transportadores de la presente invención, a diferencia de la gran mayoría de los péptidos compuestos exclusivamente de L-aminoácidos (los cuales se metabolizan rápidamente por una serie de enzimas presentes en el suero de la sangre, limitando así sus efectos terapéuticos), es que estos están preparados con D-aminoácidos, por lo tanto, las enzimas metabólicas presentes en el suero no los reconocen, aumentando de este modo de manera significativa su semivida en suero.

15 Con respecto a los estudios de estabilidad de los transportadores de BHE en suero humano (ejemplos 1 y 2) y los péptidos presentados en los ejemplos comparativos 1 y 2, estos se incubaron a una concentración de 150 µM en tampón HBSS a 37 °C en presencia de suero humano al 90 %. Se recogieron alícuotas de 50 µl en una serie de tiempos a las que se añadieron metanol para precipitar las proteínas séricas. Las muestras se centrifugaron, se
20 filtraron y analizaron mediante HPLC para determinar el grado de degradación del transportador de BHE.

En la Tabla 3, puede observarse cómo los transportadores con D-aminoácidos muestran un aumento dramático de su tiempo de semivida en suero humano, mientras que la versión con L-aminoácidos (Ejemplo comparativo 1) se degrada rápidamente.

25 En resumen, los ejemplos 1 y 2 son sobre transportadores estables a proteasas que tienen un transporte sorprendentemente alto a través de la barrera hematoencefálica.

Tabla 3: tiempo de semivida del transportador de BHE. Como control se muestra el Ejemplo comparativo 1.

30

Compuesto de referencia	Compuesto	Tiempo de semivida en suero
Ejemplo comparativo 1	H-L-Thr-L-His-L-Arg-L-Pro-L-Pro-L-Met-L-Trp-L-Ser-L-Pro-L-Val-L-Trp-L-Pro-NH ₂	< 1 h

Ejemplo comparativo 2	H-D-Thr-D-His-D-Arg-D-Pro-D-Pro-D-Met-D-Trp-D-Ser-D-Pro-D-Val-D-Trp-D-Pro-NH ₂	> 24 h
Ejemplo 1	H-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂	> 24 h
Ejemplo 2	H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH ₂	> 24 h

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Universitat de Barcelona Fundació Privada Institut de Recerca Biomèdica
- <120> Compuestos resistentes a proteasas útiles como transportadores a través de la barrera hematoencefálica y construcciones de transportador-carga
- 10 <130> AVCRI173
<150> ES P201230294
<151> 27-02-2012
- <160> 6
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 12
<212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Transportador peptídico de D-aminoácidos
- 25 <400> 1
- Pro Trp Val Pro Ser Trp Met Pro Pro Arg His Thr
1 5 10
- 30 <210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Transportador peptídico de D-aminoácidos
- 35 <400> 2
- Gly Pro Trp Val Pro Ser Trp Met Pro Pro Arg His Thr
1 5 10
- 40 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> D-aminoácidos de carga
- 50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa en la posición 2 es N-metilfenilalanina

ES 2 617 853 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa en la posición 3 es N-naftilalanina
 5
 <400> 3

 Ala Xaa Xaa Val Leu Lys Lys
 1 5

 10 <210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Carga acoplada al péptido transportador
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 20 <223> Xaa en la posición 2 es N-metilfenilalanina

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 25 <223> Xaa en la posición 3 es N-naftilalanina

 <400> 4

 Ala Xaa Xaa Val Leu Lys Lys Pro Trp Val Pro Ser Trp Met Pro Pro
 1 5 10 15

 Arg His Thr
 30
 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> péptido de L-aminoácidos

 <400> 5

 40 **Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro**
 1 5 10

 <210> 6
 <211> 12
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

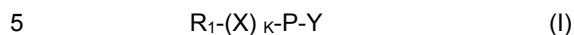
 <220>
 <223> péptido de D-aminoácidos
 50 <400> 6

 Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro
 1 5 10

 55

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en la que:

10 R_1 es el grupo unido al N terminal del primer aminoácido de la secuencia P, de forma opcional a través del ligando X, y se selecciona del grupo que consiste en H, $CH_3C(=O)-$ y maleimida;

X es un birradical seleccionado del grupo que consiste en $-NH-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-S(CH_2)_r-$, $-S-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-O-(CH_2)_r-$, $-S-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)-$, $-O-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-NH-O-CH_2-C(=O)-NH-$, $(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-$, $-(CH_2)_r-C(=O)-NH-(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-$ y $-NH-(CH_2)_r-CH(NHC(=O)CH_2NH_2)-C(=O)-$; en la que el birradical X está unido a R_1 y al N de la secuencia P como sigue: $R_1-NH-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-S-(CH_2)_r-N(H)_{m-}$, $R_1-S-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-O-(CH_2)_r-N(H)_{m-}$, $R_1-S-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)-N(H)_m$, $R_1-O-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_m$, $R_1-NH-O-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-N(H)_m$, $R_1-(CH_2)_r-C(=O)-NH-(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-N(H)_m$ y $R_1-NH-(CH_2)_r-CH(NHC(=O)CH_2NH_2)-C(=O)-N(H)_m$;

r es un número entero de 1 a 5;

20 P es un birradical de una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr (SEQ ID NO: 1);

Y es el grupo unido al C terminal del último aminoácido de la secuencia P, y se selecciona del grupo que consiste en $-NH_2$, $-OH$, $-OR_2$ y $-NHR_2$;

R_2 es un radical seleccionado del grupo que consiste en (C_1-C_6) -alquilo y $(CH_2)_2-NH-C(=O)-CH_2-O-NH_2$;

25 k es un número entero de 0 a 2;

m es un número entero de 0 a 1;

a condición de que cuando el birradical X es $-C(=O)(CH_2)_rC(=O)-$, entonces R_1 es H; a condición de que cuando el N del aminoácido de la secuencia P al cual está unido el birradical X es un birradical $-NH-$, entonces m es 1, y cuando es un birradical $-N-$, entonces m es 0; y

30 a condición de que cuando R_1 es maleimida entonces el birradical X es $-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-CH(NH_2)-C(=O)-$, $-(CH_2)_r-C(=O)-$ y $-(CH_2)_r-C(=O)-NH-(CH_2)_r-CH(NH_2)-C(=O)-$.

2. El compuesto peptídico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

35 R_1 es el grupo unido al N terminal del primer aminoácido de la secuencia P, de forma opcional a través del ligando X, y se selecciona del grupo que consiste en H y $CH_3C(=O)-$;

X es un birradical seleccionado del grupo que consiste en $-NH-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-S(CH_2)_r-$, $-S-(CH_2)_r-C(=O)-$, $-O-(CH_2)_r-$, $-S-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)-$ y $-O-(CH_2)_r-C(=O)-$; en el que el birradical X está unido a R_1 y al N de la secuencia P como sigue: $R_1-NH-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$,

40 $R_1-C(=O)-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-S-(CH_2)_r-N(H)_{m-}$, $R_1-S-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$, $R_1-O-(CH_2)_r-N(H)_{m-}$, $R_1-S-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)-N(H)_m$ y $R_1-O-(CH_2)_r-C(=O)-N(H)_{m-}$;

r es un número entero de 1 a 3;

P es un birradical de una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr (SEQ ID NO: 1);

45 Y es el grupo unido al C terminal del último aminoácido de la secuencia P y se selecciona del grupo que consiste en $-NH_2$, $-OH$, $-OR_2$ y $-NHR_2$;

R_2 es un radical (C_1-C_6) -alquilo;

k es un número entero de 0 a 2;

m es un número entero 0 a 1;

50 a condición de que cuando el birradical X es $-C(=O)(CH_2)_rC(=O)-$, entonces R_1 es H y a condición de que cuando el N del aminoácido de la secuencia P al cual está unido el birradical X es un birradical $-NH-$, entonces m es 1, y cuando es un birradical $-N-$, entonces m es 0.

3. El compuesto peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el cual P se selecciona del grupo que consiste en un birradical que consiste en la SEQ ID NO: 1 y un birradical que es la secuencia Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr- (SEQ ID NO: 2).

4. El compuesto peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que k es un número entero de 0 a 1.

60 5. El compuesto peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que Y se selecciona de $-NH_2$, $-OH$ and $-NHR_2$.

6. El compuesto peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, el cual se selecciona del grupo que

consiste en:

H-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (Ia); y
H-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (Ib).

5 7. Una construcción de fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,



en la que:

10

X, P, Y, k son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1-6;
q es un número entero de 1 a 2, y

15

Z es un radical de una sustancia biológicamente activa o una sustancia para su uso en un método de diagnóstico, siendo dicha sustancia sustancialmente incapaz de cruzar la BHE por sí misma; en la que cuando q es 1, entonces Z está unido al N terminal del primer aminoácido de la secuencia P, de forma opcional a través del ligando X, y cuando q es 2, entonces un Z está unido al N terminal del primer aminoácido de la secuencia P, de forma opcional a través del ligando X, y el otro Z está unido a un nitrógeno del birradical X.

8. La construcción de fórmula (II) de acuerdo con la reivindicación 7, la cual tiene la fórmula (II')

20



en la que:

25

X, P, Y, k son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, q es 1, y
Z es un radical de una sustancia biológicamente activa o una sustancia para su uso en un método de diagnóstico, siendo dicha sustancia sustancialmente incapaz de cruzar la BHE por sí misma.

9. La construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en la que Z es un radical de un principio farmacéutico activo que tiene la capacidad de formar un enlace amida, un enlace éster, un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace oxima, un enlace amina o un enlace hidrazona con X, y se selecciona del grupo que consiste en agentes antirretrovíricos, agentes anticancerosos, agentes antipsicóticos, agentes antineurodegenerativos, agentes de terapia sustitutiva y agentes antiepilépticos.

35 10. La construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8, la cual se selecciona del grupo que consiste en:

40 L-Dopa-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (IIa);
H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-
Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (IIb);
5(6)-carboxifluoresceína-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (IIc);
Punto cuántico-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (IId);
SPION-Gly-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-NH₂ (IIe),
5(6)-Carboxifluoresceína-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-
45 His-D-Thr-NH₂ (IIf); y
Rodamina b-L-Lys(Anticuerpo)-D-Pro-D-Trp-D-Val-D-Pro-D-Ser-D-Trp-D-Met-D-Pro-D-Pro-D-Arg-D-His-D-Thr-
NH₂ (IIg).

50 11. Una composición farmacéutica o una composición para fines diagnósticos que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7-10, junto con cantidades apropiadas de vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y/o aceptables para el diagnóstico.

55 12. Compuesto de fórmula (I), como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso como un transportador a través de la barrera hematoencefálica.

13. La construcción de fórmula (II), como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que Z es un radical de una sustancia biológicamente activa, para su uso como un medicamento.

60 14. La construcción de fórmula (II), como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde Z es un radical de dopamina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, o en donde Z es un radical peptídico del péptido H-D-Ala-D-NMePhe-D-Nal(2)-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 3), para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

15. La construcción de fórmula (II), en la que Z es una nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético o un

complejo de gadolinio, para su uso como un agente de contraste para un método de diagnóstico de formación de imágenes de resonancia magnética o en donde Z se selecciona del grupo que consiste en 5(6)-carboxifluoresceína, rojo Texas, rodamina y puntos cuánticos, para su uso como una sonda fluorescente para un método de diagnóstico por imagen.

5

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 2008025867 A [0010] [0011]
 • WO 2012007625 A [0011]
 • WO 200244329 A [0013]
 • WO 2007098415 A [0014]
 • WO 2009008725 A [0015]
 15 • WO 2008050133 A [0050]
 • EP 973804 A [0051]
 • ES P201230294 [0219]
 •
 •

20

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **J. TEMSAMANI et al.** Improved Brain Uptake and Pharmacological Activity Profile of Morpholine-6-Glucuronide Using a Peptide Vector-Mediated Strategy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, vol. 313, 712-719 [0009]
 25 • **LEE et al.** *Eur J. Biochem*, 2001, vol. 268, 2004-2012 [0013]
 • **M. AMBLARD et al.** Methods and protocols of modern solid-phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology*, 2006, vol. 33, 239-254 [0058]
 • **E. KAISER et al.** Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, 1970, vol. 34, 595-598 [0072]
 30 • **A. MADDER et al.** A novel sensitive colorimetric assay for visual detection of solid-phase bound amines. *Eur. J. Org. Chem*, 1999, 2787-2791 [0072]
 • **GAILLARD, PJ et al.** 2B-Trans technology: targeted drug delivery across the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol*, 2008, vol. 437, 161-175 [0208]