

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 265**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/775 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2011 PCT/FR2011/050883**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11131896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2011 E 11731421 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2547692**

54 Título: **Derivados peptídicos, su preparación y sus usos como vectores**

30 Prioridad:

21.04.2010 FR 1053036

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 637 265 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados peptídicos, su preparación y sus usos como vectores

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

Contexto de la invención

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

De hecho, el cerebro está protegido frente a sustancias potencialmente tóxicas por la presencia de dos sistemas principales de barreras fisiológicas: la BHE, y la barrera sangre-líquido cefalorraquídea (BS-LCR). La BHE se considera la vía principal para la captación de ligandos plasmáticos. Su superficie es aproximadamente 5000 veces mayor que la de la BS-LCR. La longitud total de los vasos sanguíneos constituyentes de la BHE es de aproximadamente 600 km. Cada cm^3 de corteza cerebral contiene el equivalente a 1 km de vasos sanguíneos. La superficie total de la BHE se estima en 20 m^2 (*De Boer et al., 2007, Clin. Pharmacokinet., 46 (7), 553-576*). Por lo tanto, el endotelio cerebral, que constituye la BHE, representa un obstáculo principal para el uso de medicamentos potenciales contra numerosos trastornos del SNC, pero también es una superficie importante de intercambio potencial entre la sangre y el tejido nervioso.

Por regla general, solo pequeñas moléculas lipófilas de aproximadamente 450 a 600 Dalton pueden pasar a través de la BHE (es decir, solo el 2% de los medicamentos candidatos), es decir, para pasar desde la sangre hasta el cerebro. El peso molecular y el tamaño de numerosos medicamentos candidatos que muestran resultados prometedores en estudios *in vitro* y en animales, para el tratamiento de trastornos del SNC, son considerablemente mayores. Por tanto, la mayoría de las moléculas tales como los péptidos o las proteínas terapéuticas generalmente se excluyen del tránsito/transporte desde la sangre hasta el cerebro, debido a la baja permeabilidad transcelular de las células endoteliales de los capilares del cerebro (*brain capillary endothelial cells* o BCECs) para este tipo de medicamentos candidatos. Las BCECs organizadas en los vasos están rodeadas por una lámina basal, pies de astrocitos, pericitos y células de microglía y neuronales. La estrecha asociación de las células endoteliales con los pies de los astrocitos es responsable del desarrollo y el mantenimiento de las propiedades impermeables de la BHE para la mayoría de las moléculas, asegurando así un control estricto y eficaz de los intercambios moleculares entre la sangre y el cerebro con el fin de mantener la homeostasis cerebral. Las BCECs están estrechamente unidas por uniones estrechas, en comparación con otras células endoteliales de otros órganos, que están fenestradas. Por tanto, estas uniones estrechas impiden cualquier transporte paracelular a través de la BHE.

La BHE se considera el principal obstáculo a franquear en el desarrollo de nuevas terapias para tratar patologías del cerebro, y especialmente para el uso de moléculas capaces de tratar los trastornos del SNC (*Neuwelt et al., 2008, The Lancet Neurol., 7, 84-96*).

Una de las razones que pueden explicar por qué no está disponible actualmente ningún tratamiento eficaz para las principales patologías cerebrales (cáncer cerebral, enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, accidentes cerebrovasculares (ACV), etc.) es que las personas que desarrollan medicamentos candidatos destinados al tratamiento de patologías del cerebro, realizan internamente programas de investigación (*brain drug-discovery programs*), invirtiendo pocos esfuerzos en la problemática del cruce de la BHE y la orientación dirigida preferencial del SNC, y especialmente del cerebro (*brain drug-targeting programs*) (*Pardridge 2003, Mol. Interv., 3, 90-105*). Un medicamento candidato debe cumplir ciertas reglas estructurales, físicoquímicas, farmacológicas y farmacológicas con el fin de tener todas las posibilidades de convertirse en un medicamento para tratar una patología o un trastorno del SNC (*Pajouhesh y col., 2005, NeuroRx, 2 (4), 541-553*). Por lo tanto, en el desarrollo de un medicamento candidato, la selectividad y la especificidad (perfil farmacológico) de una molécula hacia su diana son esenciales para su actividad terapéutica (eficacia). La biodisponibilidad y la toxicidad potencial (perfil farmacéutico) de una molécula son cruciales para su futuro como medicamento. En otras palabras, cualquier molécula susceptible de convertirse en un medicamento destinado a tratar una patología o un trastorno del SNC, por una parte tiene que pasar a través de la BHE, por otra parte, conservar su actividad biológica y presentar buenas propiedades

farmacocinéticas (PK) de absorción, de distribución, de metabolismo y de excreción/eliminación (ADME) y farmacodinámicas (PD), con baja toxicidad (Tox). De hecho, encontrar el equilibrio hidrófilo/lipófilo de la molécula en desarrollo es particularmente difícil para los químicos médicos en esta área terapéutica del SNC.

5 El principal problema en el tratamiento de trastornos y patologías del SNC reside por tanto en el hecho de que las moléculas administradas no atraviesan la BHE y por lo tanto no pueden llegar a su(s) diana(s) en el SNC. Las células endoteliales de los vasos y los capilares del SNC que constituyen la BHE son un obstáculo para las moléculas que no pueden pasar desde la sangre al tejido nervioso. De hecho, como se ha mencionado anteriormente, estas células endoteliales y los pies de los astrocitos que las rodean constituyen una barrera física ligada en particular a la presencia de uniones estrechas entre las células endoteliales que limitan/impiden cualquier cruce/transporte por la vía paracelular, y también una barrera fisiológica, ya que estas células disponen de sistemas de flujo de salida eficientes que restringen cualquier cruce/transporte por la vía transcelular. Por tanto, estas propiedades limitan fuertemente el paso de sustancias desde el plasma sanguíneo hacia el espacio extracelular cerebral.

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

25 Una de las prioridades de la investigación en el descubrimiento de moléculas destinadas a tratar, diagnosticar o formar imágenes de trastornos o patologías cerebrales es, por lo tanto, encontrar medios que permitan aumentar la eficacia del paso de sustancias activas a través de la BHE.

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

Enfoques invasivos

35 Los enfoques invasivos pueden ser implementados por inyección intraventricular cerebral directa de la sustancia activa, inyección intracerebral o infusión intratecal o por perturbación de la BHE (ruptura temporal de la integridad de la BHE).

40 El principal problema de los enfoques de neurocirugía mediante inyección intraventricular, aparte de los costes relacionados con el acto neuroquirúrgico, es que el medicamento no se administra directamente a nivel de parénquima cerebral, sino en el líquido cefalorraquídeo. La infusión intraventricular implica la colocación de un catéter en los ventrículos (*Aird, 1984, Exp. Neurol., 86, 342-358*). Esta técnica muy invasiva no es eficaz para el transporte de sustancias activas en el parénquima cerebral. De hecho, el volumen del flujo desde el líquido cefalorraquídeo hasta el parénquima cerebral durante el suministro de un medicamento por infusión intraventricular, se rige por una difusión anormalmente lenta de su convección (de su transporte) ya que el cerebro no tiene un caudal volumétrico intraparenquimatoso.

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

50 La infusión intratecal implica la colocación de un catéter en el cerebro. Este catéter está conectado a una bomba que libera la sustancia activa con un flujo predefinido. Debido a que el cerebro es el único órgano que no tiene sistema linfático, que normalmente sirve para devolver los fluidos extracelulares a la circulación general, la distribución de una sustancia activa mediante infusión intratecal en el cerebro es muy lenta. Esto disminuye la concentración de la sustancia activa en el sitio de la lesión.

Por otra parte, los riesgos de infección son importantes durante tales actos neuroquirúrgicos, incluso por la presencia del catéter. En estas condiciones, la comodidad del paciente no es óptima.

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

Este es el caso de sustancias vasoactivas tales como los leucotrienos o bradiquininas (*Baba et al., 1991, J. Cereb. Blood Flow Metab., 11, 638-643*). Esta estrategia también es invasiva y requiere un acceso arterial a nivel de la arteria carótida en sujetos/pacientes sedados. El principal problema encontrado por la ruptura temporal de la integridad de la BHE, además de los gastos relacionados con el acto del radiólogo para acceder a la carótida, es que la BHE solo permanece abierta durante un corto período de tiempo, lo que limita de hecho la posibilidad de administrar de forma crónica un medicamento. Además, la ruptura temporal de la BHE permite que proteínas plasmáticas entren en el cerebro (aunque esas proteínas pueden ser tóxicas para el cerebro) y también puede facilitar la entrada de agentes infecciosos. Este tipo de ruptura de la BHE puede conducir por ello a trastornos neuropatológicos crónicos y se asocia con riesgos importantes de infección (*Salahuddin et al., 1988, Acta Neuropathol., 76, 1-10*).

Enfoques farmacológicos de transporte

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

La adición de un grupo lipídico o lipófilo permite la conversión química de moléculas hidrófilas en moléculas más hidrófobas, en particular, a través de enfoques de profármacos. Sin embargo, la síntesis de tales compuestos conduce a moléculas que superan el umbral de transporte óptimo para atravesar la BHE, especialmente en lo que respecta al peso molecular que se vuelve superior al límite óptimo de 450 Dalton (*Pajouhesh y col., 2005, NeuroRx, 2 (4), 541-553*). Por esta misma razón, los liposomas o incluso las vesículas pequeñas (micelas, etc.) o nanopartículas (nanoesferas, nanocápsulas) tienen generalmente un tamaño demasiado grande, no son lo suficientemente específicas para la BHE, y por lo tanto son relativamente ineficaces para el transporte de moléculas de interés terapéutico (o agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o cualquier otra molécula como una sonda molecular) a través de la BHE (*Levin, 1980, J. Med. Chem., 23, 682-684; Schackert et al., 1989, Selective Cancer Ther., 5, 73-79*). Por otra parte, este tipo de sistema vesicular presenta generalmente unos efectos tóxicos no despreciables a nivel cerebral. Por lo tanto, los principales problemas que afrontan las tecnologías de lipidización son su baja especificidad para dirigirse a una diana y atravesar específicamente la BHE, en comparación con otras membranas celulares, la disminución de los valores plasmáticos del área bajo la curva del fármaco (ABC) y su uso generalmente limitado al transporte de moléculas pequeñas.

En los enfoques de AMT (adición de un grupo catiónico a través de un acoplamiento covalente o cationización directa del fármaco), el principal problema encontrado es la baja especificidad para dirigir a una diana y atravesar específicamente la BHE en comparación con otras membranas celulares. De hecho, la AMT se basa en moléculas catiónicas que se adsorben sobre células en las que la membrana está cargada negativamente, que es el caso de la mayoría de las células. La disminución de los valores plasmáticos de la ABC del fármaco, su uso generalmente limitado al transporte de moléculas pequeñas y su citotoxicidad, son otros tantos factores que penalizan el enfoque de transporte a través de AMT.

Enfoques fisiológicos de transporte

Las estrategias basadas en enfoques fisiológicos de transporte consisten en explotar los diferentes mecanismos de transporte natural a nivel de la BHE. Estos mecanismos de transporte activo de moléculas a través de la BHE se realizan bien a través de un acoplamiento a un sustrato específico de un receptor o por mimetismo molecular con el sustrato específico de un receptor (*Carrier-Mediated Transport* o CMT), o a través de un acoplamiento o fusión con un ligando que se dirige específicamente a un receptor (*Receptor-Mediated Transport* o RMT).

A título de ejemplo, moléculas tales como la L-DOPA (enfermedad de Parkinson), melfalán (cáncer cerebral), α -metil-DOPA (hipertensión arterial) y gabapentina (epilepsia) pasan al cerebro por CMT a través de los *large neutral amino acid transporters 1 y 2* (LAT1 y LAT2), (*Pardridge, 2003, Mol. Interv., 3, 90-105*). Estas moléculas tienen estructuras químicas cercanas a la fenilalanina, uno de los sustratos naturales de LAT1/2. Sin embargo, los principales problemas encontrados por los enfoques CMT son su gran selectividad/especificidad hacia conjugados que imitan/mimetizan estrechamente al sustrato del receptor/transportador endógeno y, por lo tanto, su uso queda limitado al transporte de moléculas pequeñas.

El RMT utiliza un sistema de transporte dependiente de receptor. El transporte se realiza a través de mecanismos de endocitosis dirigiendo a receptores/transportadores endógenos presentes a nivel de los capilares cerebrales. Entre los diferentes receptores humanos de la BHE implicados en el RMT, se incluyen especialmente: el receptor de la transferrina (TfR), el receptor de la insulina (IR), los receptores de las *lipoproteínas de baja densidad* (LDL) que permiten el transporte de colesterol, entre los cuales el receptor de las LDL (LDLR) y los miembros de la familia de *proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad* (LRP), o también el receptor del *factor de crecimiento similar a la insulina* (IGFR), el receptor de la toxina diftérica (DTR) o el *factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina* (HB-EGF), así como los *receptores de barrido* (SCAV-Rs), entre los cuales el *receptor de barrido de clase B tipo I* (SR-BI). En el RMT, los receptores en la membrana de una

célula endotelial de la BHE se unen a su ligando, lo que provoca la endocitosis del complejo constituido por el receptor/transportador y su ligando en una vesícula que se forma en la superficie de la célula y luego penetra en la célula endotelial de la BHE. El complejo ligando/receptor puede pasar a través de la célula endotelial (transcitosis), y por lo tanto atravesar la BHE para actuar en el tejido nervioso. Este proceso de RMT no depende del tamaño de lo que se endocita. Por lo tanto, el RMT es un mecanismo que permite el transporte desde la sangre hasta el cerebro de moléculas tales como la insulina, proteínas transportadoras de hierro, colesterol, diversos derivados peptídicos y proteínas, etc. Por ejemplo, la transferrina se utiliza como vector, ligando de TfR presentes sobre la BHE (*Jefferies et al., 1984, Nature, 312, 162-163; Friden et al., 1983, Science, 259, 373-377; Friden, 1994, Neurosurgery, 35, 294-298*), y la molécula que se va a transportar (sustancia activa) se acopla a la transferrina (vector ligando). Aunque esta estrategia de transporte con ayuda de una macromolécula permite aumentar el paso de las moléculas de interés conjugadas a través de la BHE, tiene algunas desventajas. En primer lugar, el acoplamiento de la molécula con el vector se realiza normalmente por métodos de expresión genética (fusión), lo que limita la cantidad de moléculas que se van a transportar a únicamente polipéptidos o proteínas. Además, el sistema de acoplamiento de la molécula con el vector es bastante complejo, un acoplamiento químico o bioquímico tradicional no permite obtener sistemas macromoleculares bien definidos desde un punto de vista estructural y molecular. Además, la competencia potencial entre los conjugados y los ligandos endógenos por el receptor diana, puede conducir ya sea a una inhibición del proceso fisiológico de RMT o a una disminución de la concentración de ligandos endógenos, necesaria para el buen funcionamiento del cerebro. Los receptores RMT están involucrados en procesos de señalización celular a nivel cerebral y los conjugados podrían interferir potencialmente con esos procesos.

El documento de solicitud de patente internacional n° WO2010/046588 describe por primera vez péptidos o seudopéptidos que se unen al LDLR humano y son capaces de transportar a través de la BHE sustancias que pueden tener una masa y/o un volumen importante(s).

La presente solicitud se refiere a nuevos péptidos que se unen a LDLR humano, optimizados para el transporte de moléculas.

25 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona péptidos o seudopéptidos optimizados, capaces de transportar a través de las membranas celulares, y más específicamente la BHE, sustancias que pueden tener una masa y/o un volumen importante(s). La invención permite de este modo mejorar la biodistribución o la biodisponibilidad de moléculas de interés, en particular para mejorar su acceso (orientación) al SNC.

En el documento de solicitud WO2010/046588, los inventores han desarrollado derivados de péptidos capaces de unirse al LDLR humano. Los inventores han mostrado que esos derivados eran capaces de cruzar la BHE. Los inventores también han mostrado que esos derivados permitían transportar, en las células de la BHE, moléculas de interés terapéutico o de diagnóstico.

Continuando sus investigaciones, los inventores fueron capaces de diseñar y someter a ensayo nuevos péptidos que presentan propiedades ventajosas para el transporte de moléculas. Estos nuevos péptidos capaces de unirse al LDLR sin competir con el ligando natural y, por lo tanto, sin una interferencia con el transporte de la LDL endógena, representan nuevos productos (vectores) particularmente ventajosos para el diseño y el transporte de medicamentos o agentes de diagnóstico o de formación de imágenes, especialmente para llegar al SNC.

Un objeto de la invención reside por lo tanto en un péptido o seudopéptido, caracterizado por que responde a la siguiente fórmula general (I):



en la que A1 indica cisteína o uno de sus análogos o isómeros, A2 indica prolina o uno de sus análogos o isómeros y A3 indica glicina o uno de sus análogos o isómeros. Con la condición de que el residuo A2 sea un análogo de prolina cuando el residuo A1 es cisteína, y que sea capaz de unirse a un receptor humano de lipoproteínas de baja densidad (hLDLR). Según realizaciones preferidas, A1 indica cisteína (Cys) o uno de sus análogos seleccionado entre (D)-cisteína, penicilamina (Pen) y (D)-penicilamina ((D)-pen); A2 indica prolina (Pro) o uno de sus análogos seleccionado entre ácido piperídico (Pip) y ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz); y/o A3 indica glicina (Gly) o sarcosina (Sar).

Un objeto preferido de la invención reside en un péptido o seudopéptido con la siguiente fórmula general (I'):



en la que A1 indica cisteína o uno de sus análogos, seleccionado preferiblemente entre (D)-cys, Pen y (D)-pen; y A2 indica prolina o uno de sus análogos seleccionado preferiblemente entre Pip y Thz.

Otro objeto particular de la invención reside en un péptido o seudopéptido con la siguiente fórmula general (I''):



en la que A1 indica cisteína o uno de sus análogos seleccionado preferiblemente entre (D)-cys, Pen y (D)-pen; y A2 indica prolina o uno de sus análogos seleccionado preferiblemente entre Pip y Thz. La alanina (Ala) puede tener la configuración L o D.

5 Los péptidos de la invención presentan ventajosamente la capacidad de unirse al receptor humano de LDL (hLDLR), con una afinidad elevada. Por otra parte, también tienen un tamaño reducido, típicamente inferior a 10 aminoácidos, lo que es particularmente ventajoso. Ejemplos particulares de tales péptidos incluyen en particular los péptidos de las secuencias SEQ ID NOs: 1 a 10.

10 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un péptido o seudopéptido tal como se ha definido anteriormente, para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para transportar una sustancia activa o de interés diagnóstico, para la formación de imágenes o en terapia.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un péptido o seudopéptido tal como se ha definido anteriormente, para aumentar la actividad biológica o disminuir la toxicidad de una sustancia activa o de interés a la que está acoplado.

15 Otro objeto de la invención se refiere a un péptido o seudopéptido tal como se ha definido anteriormente, para su uso para transportar una sustancia activa o de interés diagnóstico, para la formación de imágenes o en terapia.

Otro objeto de la invención se refiere a un péptido o seudopéptido tal como se ha definido anteriormente, para su uso para aumentar la actividad biológica o disminuir la toxicidad de una sustancia activa o de interés a la que está acoplado.

La invención también tiene por objeto cualquier compuesto conjugado con la siguiente fórmula (II):

20 $Vx Dy$ (II)

en la que V representa un péptido o seudopéptido tal como se ha definido anteriormente, D representa una sustancia activa o de interés y x e y son números enteros comprendidos entre 1 y 5.

La invención también se refiere a cualquier compuesto conjugado con la siguiente fórmula (III):

$VxLz Dy$ (III)

25 en la que V representa un péptido o seudopéptido tal como se ha definido anteriormente, L representa un brazo espaciador, D representa una sustancia activa o de interés, x e y son números enteros comprendidos entre 1 y 5, y z es un número entero comprendido entre 1 y 10.

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

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

35 Otro objeto de la invención se refiere a un método para mejorar o permitir el paso de una molécula a través de la BHE, que comprende el acoplamiento de esa molécula a un péptido o seudopéptido tal como se ha definido anteriormente.

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

La invención se puede utilizar en cualquier mamífero, especialmente cualquier ser humano.

40 **Leyendas de las figuras**

Figura 1

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

Figura 2

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

Figura 3

A - Esquema del plásmido utilizado para clonar los hLDLR y mLDLR.

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

Figura 4

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

Figura 5

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

Figura 6

15 A - Células de la línea CHO-hLDLR-GFP que expresan hLDLR-GFP (verde) incubadas con Dil-LDL (rojo), la superposición de los marcados rojos y verdes es visible en amarillo/naranja, se debe tener en cuenta el fuerte marcado de las células.

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

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

Se debe tener en cuenta la diferencia de la intensidad del marcado entre A, por una parte, B y C por otra parte, en donde solo se detecta el marcado de los receptores hTfR y hLDLR fusionados a GFP.

Figura 7

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

Descripción detallada de la invención

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

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

35 El cerebro tiene una necesidad importante de LDL para su buen funcionamiento. Los ligandos naturales de LDLR son LDL y, más particularmente, la apolipoproteína B (ApoB) y la apolipoproteína E (ApoE), constitutivas de las partículas de LDL que permiten así el transporte de colesterol contenido en esas partículas a través de las membranas celulares y en particular de la BHE.

40 De este modo se ha demostrado que el LDLR permitía la transcitosis de partículas de LDL a través de la BHE (*Dehouck et al., 1997, J. Cell Biol., 138 (4), 877-889*), a través de un proceso de RMT, en vesículas endosómicas particulares que impiden la fusión con el lisosoma. Estas lipoproteínas, una vez que han pasado la BHE por transcitosis, son recogidas entonces por las neuronas y/o los astrocitos (*Spencer et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104 (18), 7594-7599*). Esta propiedad se ha utilizado para transportar moléculas de interés terapéutico mediante nanopartículas sobre las que se conjugan apolipoproteínas enteras (constitutivas de la LDL) (*Kreuter et al., 45 2007, J. Control Release, 118, 54-58*). En este estudio, sin embargo, se utilizó una apolipoproteína entera, y en forma acoplada a una nanopartícula con el fin de imitar la estructura de la partícula LDL.

El documento de solicitud de patente internacional nº WO2010/046588 describe por primera vez péptidos o seudopéptidos que se unen al LDLR humano y son capaces de transportar a través de la BHE sustancias que pueden tener una masa y/o un volumen importantes.

50 La presente solicitud se refiere a nuevos péptidos que se unen al LDLR humano, optimizados para el transporte de

moléculas. Los péptidos o seudopéptidos vectores se pueden sintetizar fácilmente por vía química, y la mayoría de las moléculas de interés terapéutico, o los agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, se pueden acoplar al péptido o seudopéptido vector de forma simple y eficaz a través de una estrategia de profármaco mediante un brazo espaciador (síntesis a través de *enlazador*) o por acoplamiento directo (síntesis en tándem) entre las dos entidades (Figura 2). Los péptidos y seudopéptidos de la invención están diseñados para adoptar una configuración cíclica, y por lo tanto más resistente a la proteólisis. Por otra parte, los péptidos y seudopéptidos de la invención se unen al LDLR sin competencia con el ligando natural.

Los péptidos o seudopéptidos de la invención se pueden usar como vectores de moléculas de interés terapéutico, o agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o cualquier otra molécula como una sonda molecular, en el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías neurológicas, así como patologías infecciosas o cancerosas cerebrales o no.

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

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

Los péptidos o seudopéptidos descritos en la presente invención tienen la capacidad de dirigirse a receptores/transportadores celulares, a tipos celulares particulares y/o de atravesar las membranas celulares, especialmente las de las barreras fisiológicas del SNC para tratar en particular patologías infecciosas cerebrales u otras, de tipo bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas.

Los péptidos o seudopéptidos descritos en la presente invención poseen la capacidad de fijarse sobre un LDLR murino o humano de la membrana celular y de atravesar dicha membrana gracias a este receptor por transcitosis.

Los péptidos o seudopéptidos descritos en la presente invención poseen la capacidad de fijarse sobre el LDLR en la superficie de las membranas celulares de barreras fisiológicas del cerebro de tipo murino y humano y de atravesar dicha barrera fisiológica gracias a LDLR por RMT.

Un objeto de la invención se refiere por tanto a péptidos o seudopéptidos caracterizados por que responden a la siguiente fórmula general (I):

A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-A3-Cys (I)

en la que:

- A1 indica cisteína o uno de sus análogos o isómeros,
- A2 indica prolina o uno de sus análogos o isómeros, y
- A3 indica glicina o uno de sus análogos o isómeros.

Más particularmente, el grupo A1 indica un residuo seleccionado entre cisteína (Cys, C), de configuración D o L, o un derivado de la misma seleccionado entre ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico y sus derivados sustituidos en S, S-acetilcisteína o ácido 2-amino-3-(acetiltilio)propanoico, selenocisteína (Sec, U) o ácido 2-amino-3-(seleno)propanoico, cisteinol, ácido 3-mercaptopropanoico (Mpa) o penicilamina (Pen), de configuración D o L.

En una realización preferida, el grupo A1 se selecciona entre cisteína o penicilamina, de configuración L o D

El grupo A2 indica más preferiblemente un residuo seleccionado entre prolina (Pro, P) o ácido pirrolidin-2-carboxílico, homoprolina o ácido 2-(2-pirrolidinil)etanoico, 3-hidroxiprolina (3Hyp), 4-hidroxiprolina (4Hyp), 3-metilprolina, 3,4-deshidroprolina, 3,4-metanoprolina, 4-aminoprolina, 4-oxoprolina, tioprolina o ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz), ácido 2-oxotiazolidin-4-carboxílico, ácido indolin-2-carboxílico (Idc), ácido piperidínico (Pip) o ácido piperidín-2-carboxílico, ácido nipecótico (Nip) o ácido piperidín-3-carboxílico, ácido 4-oxopiperidínico, ácido 4-hidroxipiperidínico, ácido amino-1-ciclohexano carboxílico, prolinol.

En una realización preferida, el grupo A2 se selecciona entre prolina, ácido piperidínico (Pip) o ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz).

El grupo A3 indica más preferiblemente un residuo seleccionado entre glicina (Gly, G) o ácido 2-aminoetanoico, sarcosina (Sar) o N-metilglicina (MeGly), N-etilglicina (EtGly), alilglicina (alilGly) o ácido 2-aminopent-4-enoico, 2-ciclopentilglicina (Cpg), 2-ciclohexilglicina (Chg), 2,2-dipropilglicina (Dpg), 2-(3-indolil)glicina (IndGly), 2-indanilglicina (Igl), 2-neopentilglicina (NptGly), 2-octilglicina (OctGly), 2-propargilglicina (Pra) o ácido 2-amino-pent-4-inoico, 2-fenilglicina (Phg), 2-(4-clorofenil)glicina, azaglicina (AzGly) o glicinol o 2-aminoetanol.

En una realización preferida, el grupo A3 se selecciona entre glicina y sarcosina.

Entre los péptidos o pseudopéptidos de fórmula (I), se prefiere más particularmente los péptidos en los que el grupo A3 es glicina. Por lo tanto, un objeto particular de la invención se refiere a los siguientes péptidos de fórmula (I):

A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys (I')

5 en la que A1 indica cisteína o uno de sus análogos o isómeros, preferiblemente A1 indica Cys, (D)-cys, Pen o (D)-pen; y A2 indica un análogo de prolina, preferiblemente A2 indica Pip o Thz.

A continuación se describen ejemplos particulares de péptidos de acuerdo con la invención:

SEQ ID NO: 1, (D)-cys-Met-Pip-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 2, (D)-pen-Met-Pip-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys;

10 SEQ ID NO: 3, Pen-Met-Pip-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 4, (D)-cys-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 5, (D)-pen-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 6, Pen-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 7, (D)-cys-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Sar-Cys;

15 SEQ ID NO: 8, (D)-pen-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Sar-Cys;

SEQ ID NO: 9, Pen-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Sar-Cys;

SEQ ID NO: 10, (D)-cys-Met-Pro-Arg-Leu-Arg-(D)-ala-Cys.

20 Los resultados obtenidos por el solicitante muestran que los péptidos de la invención tienen una afinidad mejorada hacia el LDLR. Por lo tanto, en comparación con el péptido de referencia SEQ ID NO: 17, los péptidos sometidos a ensayo de fórmula (I) presentan todos una afinidad mejorada, como se desprende de la Tabla 1 (EJEMPLO III). Estos resultados son aún más notables dado que la modificación de otros residuos en la secuencia, como por ejemplo la sustitución de los residuos de arginina, da lugar a una caída sustancial de la afinidad (véanse los péptidos de referencia SEQ ID NO: 11-16).

SEQ ID NO: 11, (D)-Cys-Met-Pro-hArg-Leu-Arg-Gly-Cys;

25 SEQ ID NO: 12, (D)-Cys-Met-Pro-Agb-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 13, (D)-Cys-Met-Pro-Agp-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 14, (D)-Cys-Met-Pro-Cit-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 15, (D)-Cys-Met-Pro-Arg-Leu-Cit-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 16, (D)-Cys-Met-Pro-Arg-Leu-Arg(NO₂)-Gly-Cys;

30 SEQ ID NO: 17, (D)-Cys-Met-Pro-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys.

Estos resultados son igualmente particularmente notables, teniendo en cuenta el tamaño reducido de los péptidos (los péptidos anteriores comprenden 8 aminoácidos), lo que constituye una ventaja suplementaria en su uso industrial.

35 Como se ha indicado anteriormente, los péptidos o pseudopéptidos cíclicos de la invención pueden comprender enlaces peptídicos, no peptídicos y/o peptídicos modificados. En una realización preferida, los péptidos o pseudopéptidos comprenden al menos un enlace peptidomimético, seleccionado preferiblemente entre la intercalación de un grupo metileno (-CH₂-) o fosfato (-PO₂-), amino secundario (-NH-) u oxígeno (-O-), alfa-azapéptidos, alfa-alquilpéptidos, N-alquilpéptidos, fosfonamidatos, depsipéptidos, hidroximetilenos, hidroxietilenos, dihidroxietilenos, hidroxietilaminas, retro-inverso, metilenoxi, cetometileno, ésteres, fosfinatos, fosfínicos, fosfonamidas, análogos de carba.

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

45 Los péptidos o pseudopéptidos de la invención se pueden sintetizar mediante cualquier técnica conocida de por sí por una persona experta en la materia (síntesis química, biológica, genética, etc.). Se pueden conservar tal cuales, o formulados en presencia de una sustancia de interés o cualquier excipiente aceptable.

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

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

También se pueden obtener los péptidos de la invención, o una parte de los mismos de naturaleza proteica a partir de una secuencia de ácido nucleico que los codifica. La presente invención también tiene por objeto una molécula de ácido nucleico que comprende o que está constituida por una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido tal como se ha definido anteriormente. Más particularmente, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia que codifica un péptido de fórmula general (I). Estas secuencias de ácidos nucleicos pueden ser de ADN o ARN y estar asociadas con secuencias de control y/o estar insertadas en vectores de expresión biológicos.

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

Otro objeto de la invención reside en el uso de un péptido o seudopéptido cíclico, tal como se ha definido anteriormente, como vector para la transferencia/transporte de moléculas de interés terapéutico, o agentes de formación de imágenes o de diagnóstico o cualquier otra molécula.

Otro objeto de la invención reside en el uso de un péptido o seudopéptido cíclico, tal como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento capaz de atravesar la BHE.

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

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



en la que V representa un péptido o seudopéptido de la invención, D representa una sustancia activa o de interés, y x e y son números enteros comprendidos entre 1 y 5. En una realización particular, x e y son iguales a 1, x es superior a y, o y es superior a x.

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



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

La sustancia activa o de interés puede ser cualquier molécula de interés farmacéutico, en particular terapéutico, un agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas, o una sonda molecular. Se puede tratar especialmente de cualquier entidad química que tenga un interés biológico tal como una pequeña molécula química (antibiótico, agente antiviral, inmunomodulador, anticancerígeno, antiinflamatorio, etc.), un péptido o un polipéptido, una proteína (enzima, hormona, citocina, apolipoproteína, factor de crecimiento, antígeno, anticuerpo o una porción de anticuerpo), un ácido nucleico (ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico de origen humano, vírico, animal, eucariota o procariota, vegetal, sintético, etc., que puede tener un tamaño variable, que va desde un simple oligonucleótido hasta el genoma o un fragmento del genoma), un genoma vírico o un plásmido, una ribozima, un marcador o trazador. En general, la "sustancia de interés" puede ser cualquier principio activo de medicamento, que se trate de un producto químico, bioquímico, natural o sintético. La expresión "pequeña molécula química" se refiere a una molécula de interés farmacéutico que tiene un peso molecular de 1000 Dalton como máximo, típicamente comprende entre 300 y 700 Dalton.

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

VxLz (IV)

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

- 5 En los compuestos conjugados de la invención, el acoplamiento entre V y D o entre V y L por un lado y entre L y D por otro lado, se puede realizar por cualquier medio de unión aceptable, teniendo en cuenta la naturaleza química, el impedimento y el número de sustancia(s) activa(s) y de péptido(s) o seudopéptido(s) asociados. El acoplamiento se puede realizar de este modo a través de uno o varios enlaces covalentes, iónicos, de hidrógeno, hidrófobos o de Van der Waals, escindibles o no en medio fisiológico o en el interior de las células. Además, D puede estar acoplado a V, en su caso a través de L, a nivel de diferentes grupos reactivos, y en particular de un extremo o varios extremos N-term y/o C-term de V, y/o a nivel de uno o varios grupos reactivos transportados por las cadenas laterales de aminoácidos naturales o no, que constituyen V.

- 15 El acoplamiento se puede efectuar en cualquier sitio del péptido o seudopéptido, en el que grupos funcionales tales como -OH, -SH, -CO₂H, -NH₂, -SO₃H, -PO₂H están presentes de forma natural o se han introducido. Por lo tanto, una molécula de interés terapéutico, o un agente de diagnóstico (o de formación de imágenes médicas) o cualquier otra molécula como una sonda molecular, se puede unir (acoplar) al péptido o seudopéptido vector de la invención mediante un enlace covalente, ya sea a nivel de los extremos N-term o C-term, o bien a nivel de los grupos reactivos transportados por las cadenas laterales de los aminoácidos naturales o no, de esta secuencia peptídica.

- 20 De manera similar, el acoplamiento se puede efectuar en cualquier sitio de la sustancia activa o de interés (molécula de interés terapéutico, agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas, cualquier otra molécula como una sonda molecular), en donde, por ejemplo, grupos funcionales tales como -OH, -SH, -CO₂H, -NH₂, -SO₃H, -PO₂H están presentes de forma natural o se han introducido.

- 25 Se prefiere que la interacción sea suficientemente fuerte para que el péptido no se disocie de la sustancia activa antes de haber alcanzado su sitio de acción. Por esta razón, el acoplamiento preferido de acuerdo con la invención es un acoplamiento covalente pero, sin embargo, podría ser un acoplamiento no covalente. La sustancia de interés puede estar acoplada directamente al péptido (síntesis en tándem) o a uno de sus extremos terminales (N-term y C-term), bien a nivel de una cadena lateral de uno de los aminoácidos constituyentes de la secuencia (*Majumdar y Sahaan, Med Res Rev., Epub ahead of print*). La sustancia de interés también se puede acoplar indirectamente a través de un brazo de unión o un brazo espaciador (síntesis a través de *enlazador*) o bien con uno de los extremos terminales de los péptidos, bien a nivel de una cadena lateral de uno de los aminoácidos constituyentes de la secuencia (Figura 2). Se puede mencionar como medio de acoplamiento químico covalente, haciendo referencia o no a un brazo espaciador, los seleccionados entre agentes bifuncionales o multifuncionales que contienen grupos alquilo, arilo o peptídico mediante ésteres, aldehídos o ácidos de alquilo o arilo, grupos anhídridos, sulfhidrilos o carboxilos, grupos derivados de bromuro o cloruro de cianógeno, carbonildiimidazol, ésteres de succinimida o haluros sulfónicos.

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

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

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

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

- 50 La expresión sales farmacéuticamente aceptables se refiere a sales no tóxicas que se pueden preparar generalmente haciendo reaccionar una base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Estas sales conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres. Como ejemplos representativos de tales sales se pueden citar las sales hidrosolubles e insolubles en agua, tales como acetatos, N-metilglucamina amonio, ansonatos (4,4-diaminoestilbenos-2,2'-disulfonatos), bencenosulfonatos, benzonatos, bicarbonatos, bisulfatos, bitartratos, boratos, bromhidratos, bromuros, buriratos, camsilatos, carbonatos, clorhidratos, cloruros, citratos, clavulatiatos, diclorhidratos, difosfatos, edetatos, edetatos de calcio, edisilatos, estolatos, esilatos, fumaratos, gluceptatos, gluconatos, glutamatos, glicolilarsanilatos, hexafluorofosfatos, hexilresorcinatos, hidrabaminas, hidroxinaftoatos, yoduros, isotionatos, lactatos, lactobionatos, lauratos, malatos, maleatos, mandelatos, mesilatos,

metilbromuros, metilnitratos, metilsulfatos, mucatos, napsilatos, nitratos, 3-hidroxi-2-naftoatos, oleatos, oxalatos, palmitatos, pamoatos (1,1-metilen-bis-2-hidroxi-3-naftoatos o emboatos), pantotenatos, fosfatos, picratos, poligalacturonatos, propionatos, p-toluenosulfonatos, salicilatos, estearatos, subacetatos, succinatos, sulfatos, sulfosalicilatos, suramatos, tanatos, tartratos, teoclatos, tosilatos, trietiodidos, trifluoroacetatos, valeratos.

- 5 Las composiciones de la invención comprenden ventajosamente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar entre los vehículos utilizados de manera clásica de acuerdo con cada uno de los modos de administración. Dependiendo del modo de administración previsto, los compuestos pueden estar en forma sólida, semisólida o líquida. Para las composiciones sólidas tales como comprimidos, píldoras, polvos o gránulos en estado libre o incluidos en cápsulas, la sustancia activa se puede
10 combinar con: a) diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina; b) lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol; c) aglutinantes, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona; d) desintegrantes, por ejemplo, almidón, agar, ácido algínico o su sal sódica, o mezclas efervescentes; y/o e) absorbentes, colorantes, aromatizantes y edulcorantes. Los excipientes
15 pueden ser, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y análogos de calidad farmacéutica. Para las composiciones semisólidas, tales como supositorios, el excipiente puede ser, por ejemplo, una emulsión o una suspensión oleosa, o a base de polialquilenglicol tal como polipropilenglicol. Las composiciones líquidas, particularmente inyectables o para incluir en una cápsula blanda, se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc. la sustancia activa en un
20 disolvente farmacéuticamente puro tal como, por ejemplo, agua, suero fisiológico, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, aceite y sus análogos.

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

- 30 Las composiciones farmacéuticas comprenden normalmente una dosis eficaz de un péptido o seudopéptido o conjugado de la invención. Una "dosis terapéuticamente eficaz" tal como se describe en el presente documento, se entiende como la dosis que proporciona un efecto terapéutico para una afección y un régimen de administración dados. Esto es típicamente la dosis media de una sustancia activa que se va a administrar para mejorar sustancialmente alguno de los síntomas asociados con una enfermedad o un estado patológico. Por ejemplo, en el
35 tratamiento de un cáncer cerebral o no, una patología, una lesión o un trastorno del SNC, la dosis de una sustancia activa que disminuye, previene, retrasa, suprime o detiene una de las causas o uno de los síntomas de la enfermedad o del trastorno, sería terapéuticamente eficaz.

- Una "dosis terapéuticamente eficaz" de una sustancia activa no cura necesariamente una enfermedad o un trastorno, pero proporcionará un tratamiento para esa enfermedad o ese trastorno de forma que su aparición se retrase, impida o evite, o que sus síntomas se mitiguen, o que se modifique su término o, por ejemplo, sea menos grave o que se acelere la recuperación del paciente.
40

- Se entiende que la "dosis terapéuticamente eficaz" para una persona en particular dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad/eficacia de la sustancia activa, la hora de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y su metabolismo, las asociaciones/interacciones medicamentosas y la gravedad de la enfermedad (o el trastorno) tratada a título preventivo o curativo, así como la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y/o el régimen alimentario del paciente.
45

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

- 50 A este respecto, la invención se refiere al uso de conjugados o composiciones farmacéuticas, tales como las que se han descrito anteriormente, para el tratamiento o la prevención de patologías o trastornos del SNC, tumores cancerígenos cerebrales u otras células cancerosas, y patologías infecciosas cerebrales u otras, de tipo bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas.

- La invención también se refiere al uso de conjugados o composiciones farmacéuticas, tales como las que se han descrito anteriormente, para el diagnóstico o la formación de imágenes de patologías o trastornos del SNC, tumores cancerígenos cerebrales u otras células cancerígenas, y patologías infecciosas cerebrales u otras, de tipo bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas.
55

La invención también se refiere al uso de un conjugado o una composición tales como las que se han definido anteriormente, para el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de un tumor cancerígeno cerebral u otro tipo de células cancerosas. Los estudios han mostrado de hecho que los pacientes con ciertos tipos de cáncer presentan hipocolesterolemia. Esta hipocolesterolemia es la consecuencia del uso excesivo de colesterol por las células cancerosas. Estas últimas inducen para sobrevivir un aumento del nivel de expresión del LDLR en el seno de órganos tumorales (*Henricksson et al., 1989, Lancet 2 (8673), 1178-1180*). Existe, pues, una correlación entre el aumento del nivel de expresión del LDLR por las células y ciertos tipos de cáncer. También se ha demostrado recientemente que el número de LDLR era muy importante en la superficie de ciertas células patológicas como las células cancerosas. En general se acepta que 1000 a 3000 LDLR están presentes en la superficie de una célula no patológica. Del mismo modo, las neuronas no patológicas solo presentan un bajo número de LDLR (*Pitas et al., 1987, J. Biol. Chem., 262, 14352-14360*). En el caso de glioblastoma, se ha demostrado una sobreexpresión del LDLR. Por lo tanto, se han contabilizado en la superficie de las células cerebrales tumorales desde 125000 (para las células U-251) hasta 900000 (para las células SF-767) LDLRs (*Malentiska et al., 2000, Cancer Res., 60, 2300-2303; Nikanjam et al., 2007, Int. J. Pharm., 328, 86-94*). Se debe tener en cuenta también que muchas de las células tumorales sobreexpresan el LDLR, tales como las del cáncer de próstata (*Chen et al., 2001, Int. J. Cancer, 91, 41-45*), cáncer de colon (*Niendorf et al., 1995, Int. J. Cancer, 61, 461-464*), leucemias (*Tatidis et al., 2002, Biochem. Pharmacol., 63, 2169-2180*), cáncer colorrectal (*Caruso et al., 2001, Anticancer Res., 21, 429-433*), cáncer de mama (*Graziani et al., 2002, Gynecol. Oncol., 85, 493-497*), así como los cánceres de hígado, páncreas, ovarios, pulmón, estómago, etc.

La invención también se refiere al uso de un conjugado o una composición tales como se han definido anteriormente en este documento para el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías infecciosas cerebrales u otras, de tipo bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas, tales como, y de manera no limitativa, SIDA o incluso meningitis, etc. El LDLR también está presente en las células del hígado. Se sabe ahora que la endocitosis del virus de la hepatitis C (VHC) se puede realizar a través del LDLR. El LDLR podría servir de receptor vírico en un estadio precoz de la infección de los hepatocitos humanos con los VHC (*Molina et al., 2007, J. Hepatol., 46 (3), 411-419*). Los conjugados de la invención se pueden utilizar por tanto para dirigirlos específicamente a células patológicas, infectadas con virus, tales como los de la hepatitis B y C, que expresan el LDLR y/o para modular el proceso de infección de las células sanas a través de los virus, vía el LDLR.

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

La invención también se refiere al uso de un conjugado o de una composición tales como se han definido anteriormente para el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías neurológicas tales como de manera no limitativa, la epilepsia, la migraña, las encefalitis, los dolores del SNC, etc.

La invención también se refiere al uso de un conjugado o de una composición tales como se han definido anteriormente para el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías neuropsiquiátricas tales como de manera no limitativa, la depresión, el autismo, la ansiedad, la esquizofrenia, etc.

Los términos "tratamiento", "tratar" y otras expresiones similares significan la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de las células cancerosas, la muerte de las células cancerosas o la mejoría de una enfermedad o un trastorno neurológico. El efecto puede ser profiláctico o preventivo con el fin de impedir total o parcialmente el agravamiento de una enfermedad o de un síntoma de la misma, en una persona enferma, o su propagación, en sujetos sanos, y/o puede ser terapéutico con el fin de tratar total o parcialmente una enfermedad y/o sus efectos adversos. El término "tratamiento" tal y como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, y más especialmente un ser humano, y comprende: (a) la prevención de una enfermedad (por ejemplo, la prevención del cáncer) o de una afección que puede producirse en una persona predispuesta a esa patología o trastorno, pero que aún no ha sido diagnosticada como aquejada, (b) la desaceleración de una enfermedad (por ejemplo, deteniendo su desarrollo) o (c) el alivio de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo los síntomas asociados a una enfermedad). Este término "tratamiento" también cubre cualquier administración de una sustancia activa con el fin de curar, sanar, aliviar, mejorar, disminuir o inhibir una afección en un individuo o paciente, y comprende, sin limitación, la administración a una persona que requiere un medicamento compuesto de un vector o de un conjugado como se han descrito en este documento.

La presente invención se refiere además al uso de un péptido o seudopéptido de la invención para aumentar la actividad biológica de una sustancia activa o de interés (molécula de interés terapéutico, agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas, cualquier otra molécula como una sonda molecular) a la que está acoplado.

La presente invención también se refiere al uso de un péptido o seudopéptido de la invención, para disminuir la toxicidad de la sustancia activa o de interés (molécula de interés terapéutico, agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas, cualquier otra molécula como una sonda molecular) a la que está acoplado.

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

EJEMPLOS

EJEMPLO I

- 5 Construcción de líneas celulares CHO que expresan de forma estable LDLR humanos y murinos.

Los inventores han identificado péptidos basándose en su interacción y afinidad hacia los receptores humanos y murinos de *lipoproteínas de baja densidad* (hLDLR y mLDLR), que participan en particular en la endocitosis y la transcitosis (transporte transcelular, en particular a través de la BHE) del colesterol. El requisito previo a la caracterización de estos péptidos era el establecimiento en células eucariotas (*células ováricas de hámster chino* CHO) de líneas estables que expresaban constitutivamente y con tasas elevadas hLDLR y mLDLR. Estas líneas se utilizan: i) para caracterizar péptidos que se fijan al hLDLR expresado en la superficie celular, en su configuración natural; ii) para verificar que el hLDLR y mLDLR pueden internalizar los péptidos seleccionados por endocitosis.

La construcción de estas líneas se ha descrito en el documento de solicitud WO2010/046588. Brevemente, las secuencias de ARN mensajero que codifican hLDLR y mLDLR están disponibles en bases de datos (números de acceso: NM_000527 y NM_010700, respectivamente). Los cebadores necesarios para la amplificación de los ADNc mediante PCR se seleccionaron, comprendiendo en su extremo (en negrita) sitios de restricción necesarios (HindIII y Sall para el LDLR humano y HindIII y KpnI para el LDLR murino) para la clonación en el vector de expresión pEGFP-N1 (Clontech)

hLDLR

- 20 Cebador *Directo*: ATATATA**AAGCTT**CGAGGACACAGCAGGTCGTGAT (SEQ ID NO: 18)

Cebador *Inverso*: TTAATT**GTCGACC**ACGCCACGTCATCCTCCAGACT (SEQ ID NO: 19)

mLDLR

Cebador *Directo*: ATATATA**AAGCTT**GACGCAACGCAGAAGCTAAG (SEQ ID NO: 20)

Cebador *Inverso*: TTAATT**GGTACCG**TTGCCACATCGTCCTCCAG (SEQ ID NO: 21)

- 25 Los ARN totales preparados a partir de cerebros humanos y murinos se transformaron en ADNc mediante transcripción inversa para la amplificación con PCR de fragmentos de ADN que codificaban hLDLR y mLDLR. Después de la amplificación, los productos de la PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción HindIII-Sall y HindIII-KpnI, respectivamente, y se ligaron en el vector de expresión pEGFP-N1 (Clontech) digerido con las mismas enzimas de restricción. Después de la transfección en células eucariotas, este vector permite la expresión, bajo el control del promotor CMV, de LDLR fusionado a GFP en su extremo C-term, es decir, al final de sus dominios intracelulares (Figura 3). Después de la transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5 α , la obtención de colonias aisladas, la preparación del ADN de los plásmidos, se secuenciaron completamente las estructuras artificiales de las 2 hebras para verificar.

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

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

- 50 Se muestra una colocalización entre el hLDLR y su ligando natural la LDL, que emitía fluorescencia mediante la adsorción de Dil, un marcador fluorescente. Este ligando natural fluorescente (Dil-LDL) se internaliza rápidamente (endocitosis) como se observa con un microscopio de fluorescencia sobre células fijadas (Figura 6-A). Por el contrario, Dil-LDL no es endocitado por la línea de control CHO-GFP, o por otra línea de control de células CHO, que sobreexpresa por ejemplo el receptor humano de la transferrina (hTfR, la Figura 6-B), otro receptor implicado en

la transcitosis. Además, la actividad endocítica de la línea CHO-LDLR-GFP es específica del ligando de LDLR, ya que en esa línea no se observa endocitosis de ligando que no sea específica, a título de ejemplo la transferrina (Tf) marcada con un fluorocromo rojo (*rojo de Texas*, Figura 6-C).

5 La funcionalidad de los receptores (capacidad de endocitosis) se confirma por experimentos en tiempo real, con video-microscopía de fluorescencia que muestra que la LDL, el ligando natural de hLDLR, marcada con Dil, se transporta efectivamente de forma rápida y muy eficazmente en las células que expresan hLDLR-GFP, en comparación con las células que expresan solo GFP o las células que expresan otro receptor implicado en la endocitosis, tal como hTfR (controles negativos). Por el contrario, experimentos de video-microscopía realizados con Tf marcada con *rojo de Texas*, que es endocitada de manera muy eficaz por las células que expresan hTfR-GFP, confirman que la transferrina no es endocitada por las células de una línea de control GFP ni por células de una línea hLDLR.

15 A pesar de la tasa elevada de expresión de hLDLR en las líneas CHO-hLDLR-GFP, el sistema de endocitosis no es solo eficaz, sino que ha conservado su selectividad. La presencia de la fusión GFP no ha alterado ni las propiedades de inserción en la membrana de hLDLR, ni la exposición en el exterior de la célula del dominio extracelular de hLDLR, ni la funcionalidad del receptor en el proceso de endocitosis.

Ejemplo II

Síntesis peptídicas y acoplamiento a una molécula trazadora (biotina, fluoresceína o S-Tag con actividad enzimática).

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

25 Los aminoácidos protegidos en N con un Fmoc (o un Boc para ciertos extremos N-term) y/o protegidos con funciones ortogonales (ácido-lábiles particularmente) a nivel de sus cadenas laterales, los reactivos químicos de acoplamiento y desprotección, y los disolventes se compraron a empresas especializadas y se utilizan tal cuales.

30 Las resinas Rink Amida y Wang permiten sintetizar las secuencias peptídicas completamente desprotegidas en sus cadenas laterales y sus extremos C-term. Esto se denomina síntesis peptídica SPPS ortogonal en 2 dimensiones (Fmoc/tBu).

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

40 Las protecciones laterales ortogonales (Prot₂) estándar, utilizadas para cada aminoácido a lo largo de la síntesis peptídica son: Arg(N-Pbf), Arg(N-Pmc), Asn(N-Trt), Asp(O-tBu), Cys(S-Acm), Cys(S-Mmt), Cys(S-4MeBn), Cys(S-tBu), Cys(S-Tmob), Cys(S-Trt), Glu(O-tBu), Gln(N-Trt), His(N-Trt), Lys(N-Boc), Pen(S-Acm), Pen(S-Trt), Ser(O-tBu), Thr(O-tBu), Trp(N-Boc), Tyr(O-tBu) (*Applied Biosystems, 1998, Cleavage, Deprotection, and Isolation of Peptides after Fmoc Synthesis. Technical Bulletin*). Gly, Sar, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Met, Pro, Pip y Thz no tienen protecciones laterales ya que sus estructuras químicas respectivas no lo requieren.

Los acoplamiento de aminoácidos se realizan a través de la activación de la función ácido del aminoácido n+1 con ayuda de DIEA/HBTU/HOBt o DIPC/HOBt en DMF.

50 La desprotección del grupo Fmoc (Prot₁) de un nuevo aminoácido acoplado de este modo, se realiza utilizando 20% de piperidina en DMF.

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

55 En función del péptido sintetizado, los puentes disulfuro se obtienen mediante ciclación intramolecular a partir de 2

funciones tiol de 2 Cys protegidas de forma adecuada (Acm, Trt, tBu, etc.), ya sea en solución o sobre la resina, con ayuda de reactivos usados convencionalmente por el experto en la técnica: H₂O/AcOH/(NH₄)₂CO₃/DMSO, H₂O/AcOH/(NH₄)₂CO₃, I₂/DMF, I₂/HFIP/DCM, TFA/DMSO/anisol, I₂/DCM/MeOH/H₂O, etc. Una Cys en la posición N-term se puede reemplazar ventajosamente por Pen o Mpa para la ciclación a través de un puente disulfuro. Los puentes de lantioninas (mediante ciclación a través de deshidroalanina) o dicarba (mediante ciclación a través de alilGly) también se pueden obtener por rutas de síntesis conocidas por el experto en la materia. Un puente de lactama se puede crear entre la función ácido lateral de un residuo Glu (o Asp) y una función amino lateral en una Lys o un amino N-term. Del mismo modo, una ciclación entre la función amino N-term y la función ácido C-term (cabeza/cola) se puede llevar a cabo a través de un enlace amida, al igual que una ciclación entre la función amino lateral de una Lys y la función ácido C-term del péptido (*Majumdar y Siahaan, Med Res Rev., Epub ahead of print*).

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

Las desprotecciones de las cadenas laterales y la escisión de los péptidos de las resinas Rink Amida o Wang, se llevan a cabo por métodos usados convencionalmente por el experto en la técnica: ya sea con una mezcla de TFA/H₂O/TIS o TIPS (95/2,5/2,5), o bien con TFA/H₂O/EDT/TIS o TIPS (94/2,5/2,5/1), o bien con TFA/tioanisol/H₂O (94/5/1) o bien con TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2), o bien con TFA/H₂O/fenol/tioanisol/EDT (82,5/5/5/2,5), etc.

Las biotinas, fluoresceínas o S-Tag (véase el EJEMPLO IV, más adelante) se introducen generalmente en C-term, estos trazadores a veces se acoplan en N-term, de acuerdo con los procedimientos de síntesis y de acoplamiento clásicos conocidos por el experto en la materia.

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

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

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

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

- columna C18 Chromolith Flash (4,6 x 25 mm),
- caudal de 3 ml/min,
- gradiente lineal de 0 a 100% de B en 2,5 min (A: H₂O/0,1% de HCO₂H; B: ACN/0,1% de HCO₂H).

La adquisición de los espectros de masas en modo de electropulverización positiva se realiza con un caudal de 100-200 µl/min. Los datos se obtienen en modo exploración desde 200 a 1700 *m/z* con intervalos de 0,1 s.

40 EJEMPLO III

Diseño de péptidos vectores.

El péptido de secuencia SEQ ID NO: 17/S-Tag, descrito en el documento de solicitud WO2010/046588, se utilizó como referencia.

A partir de ese péptido, se han realizado diferentes enfoques para tratar de mejorar las propiedades de unión, de síntesis y de transporte. De este modo se han sintetizado numerosos péptidos, que difieren de SEQ ID NO: 17 por la delección y/o sustitución y/o modificación química de uno o varios residuos de aminoácidos.

Se ha determinado la capacidad de los péptidos sintetizados de este modo para unirse a hLDLR.

Para este propósito, células CHO-hLDLR-RFP adherentes y confluentes, se cultivaron en placas de 6 pocillos. Se emplearon tres pocillos de células por cada afección.

50 Se preparó una solución que contenía 10 µM de péptido SEQ ID NO: 17/S-Tag en medio de cultivo HamF12-1% de BSA. A esta solución se añadió 10 µM del péptido que se iba a evaluar (competencia).

También se prepararon varias soluciones de control:

- (i) Medio HamF12-1% de BSA.
- (ii) Medio HamF12-1% BSA + 10 µM de péptido control CTRL-S-Tag (evaluación de la unión no específica de cualquier péptido que comprende un S-Tag).
- 5 (iii) Medio HamF12-1% de BSA + 10 µM de péptido SEQ ID NO: 17/S-Tag + 10 µM de péptido de control CTRL (evaluación de la competencia "no específica" entre el péptido de interés y el péptido de control CTRL).

Los enfoques de FRET utilizados son los descritos en el EJEMPLO IV.

10 Los resultados obtenidos para los mejores péptidos se presentan en la Tabla 1 a continuación. La tabla proporciona los resultados de competencias en % de péptido vector de referencia (SEQ ID NO: 17/S-Tag), con afinidad hacia hLDLR, desplazado por los péptidos de la invención. Cuanto más elevado es el valor del desplazamiento, más afín es el péptido hacia hLDLR. Cuando este valor es superior al 50%, el péptido posee una afinidad superior a la del péptido de referencia (SEQ ID NO: 17).

Tabla 1

Pruebas de péptidos	Desplazamiento del péptido de control
SEQ ID NO: 1	66%
SEQ ID NO: 2	70%
SEQ ID NO: 3	75%
SEQ ID NO: 4	88%
SEQ ID NO: 5	91%
SEQ ID NO: 6	77%
SEQ ID NO: 7	74%
SEQ ID NO: 8	84%
SEQ ID NO: 9	80%
SEQ ID NO: 10	54%
SEQ ID NO: 11	22%
SEQ ID NO: 12	23%
SEQ ID NO: 13	8%
SEQ ID NO: 14	9%
SEQ ID NO: 15	<5%
SEQ ID NO: 16	<5%
SEQ ID NO: 17	50%

15 Los resultados presentados muestran que los péptidos con las secuencias SEQ ID NOs: 1 a 10 muestran una afinidad mejorada hacia el receptor humano de las HDL. Estos resultados son particularmente interesantes teniendo

en cuenta el tamaño reducido de los péptidos, y son particularmente notables y sorprendentes, teniendo en cuenta los efectos negativos sobre la afinidad, observados con los péptidos SEQ ID NO: 11-16.

Por lo tanto, basándose en un enfoque de optimización química basada en la química medicinal, los inventores han hecho progresos en la comprensión de las relaciones estructura/actividad (afinidad) del péptido vector de referencia (SEQ ID NO: 17), y en particular:

- 5 (i) la importancia de cada uno de los residuos de aminoácidos (Ala-scan, D-scan), es decir, la sustitución alternativa (uno por uno) de cada uno de los residuos de origen bien por una alanina, bien por su análogo no natural de configuración D;
- (ii) la importancia de los extremos N- y C-terminales (acetilación, amidación, etc.);
- 10 (iii) la importancia/interés de la ciclación del péptido.

Las principales limitaciones atribuidas generalmente a los derivados peptídicos para fines terapéuticos son:

- (i) su baja biodisponibilidad oral (por lo general se requiere su administración por vía intravenosa);
- (ii) un tiempo de semivida corto debido a su rápida degradación por enzimas proteolíticas (tales como proteasas o peptidasas) del aparato digestivo y del plasma sanguíneo;
- 15 (iii) su eliminación rápida de la circulación sanguínea a través del hígado (aclaramiento hepático) y los riñones (aclaramiento renal);
- (iv) su baja capacidad para pasar a través de membranas biológicas o fisiológicas debido a su carácter generalmente hidrófilo;
- 20 (v) su gran flexibilidad conformacional, que a veces conduce a una falta de selectividad que implica interacciones con diversos receptores o dianas (lo que da como resultado una biodistribución específica baja), lo que tiene como efecto la activación de varias dianas y da lugar a efectos secundarios o indeseables;
- (vi) el costo elevado de la síntesis y la producción industrial (el coste de producción de un péptido de peso molecular 5 kDa es mayor que el coste de producción de una molécula orgánica de peso molecular 500 Da).

De forma remarcable, los péptidos o pseudopéptidos de la invención presentan los requisitos previos farmacológicos:

- 25 (i) una afinidad fuerte hacia el hLDLR;
- (ii) características físico-químicas (ciclación a través de un puente disulfuro; hasta 3 aminoácidos no naturales para algunos de ellos, un tamaño reducido a 8 aminoácidos) que favorecen su especificidad para ese receptor;
- (iii) una mayor resistencia a la proteólisis enzimática debido a su ciclación, la introducción de aminoácidos no naturales y, para algunos de ellos, un enlace pseudo-peptídico, pero también mediante la modificación/bloqueo de los extremos N- y C-term;
- 30 (iv) un tamaño pequeño y un peso molecular cercano a 1 kDa que permite reducir el costo de la síntesis y la producción futura a escala industrial.

EJEMPLO IV

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

- 35 Los péptidos de la invención que tienen afinidad hacia hLDLR-GFP están acoplados/conjugados en C-term a diferentes moléculas "trazadoras", o bien rodamina, o S-Tag, separados por un brazo espaciador constituido generalmente por 3 residuos Gly (Figura 7). El S-Tag (péptido de 15 aminoácidos obtenido a partir de la secuencia 1-15 de la ribonucleasa A pancreática bovina) puede ser reconocido por un lado por un anticuerpo anti-S-Tag para los enfoques de inmunocitoquímica o FACS, y por otro lado puede reconstituir una actividad enzimática mediante la
- 40 unión a la proteína S ribonucleasa (porción C-term, aminoácidos 21-124) en las pruebas de actividad *in vitro* utilizando el kit de ensayo de S-Tag FRETWorks (Novagen 70724-3). La ribonucleasa activada de ese modo digiere un sustrato de ARN liberando un agente fluorescente enmascarado revelado por FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) y se cuantifica en placa de 96 pocillos en un espectrofluorímetro Beckmann. Para estos experimentos de FRET, se emplearon células CHO controles y la GFP fusionada en C-term a hLDLR y mLDLR lo que genera un ruido de fondo importante en las longitudes de onda utilizadas, para FRET se ha sustituido por la *Red Fluorescent Protein* (RFP). Las líneas estables generadas para los experimentos de FRET son, por tanto, CHO-RFP y CHO-hLDLR-RFP.

- Para los enfoques de FRET, las células se lavan 2 veces con 2 ml de PBS y después se incuban durante 1 h a 37°C con 250 µl de solución de péptido. Se lavan de nuevo 2 veces con 2 ml de PBS y luego 2 veces con 1 ml de PBS y luego se raspan en 1 ml de PBS y se centrifugan durante 5 min a 1250 rpm. El material sobrenadante se aspira
- 50

después y el sedimento celular se lisa en 80 µl de PBS + 0,1% de Triton X100. Se analizan veinte µl de cada lisado celular midiendo la emisión de fluorescencia después de la reacción de FRET.

5 Por lo tanto, se llevan a cabo experimentos de incubación de los péptidos sobre diferentes células que expresan el hLDLR y permiten demostrar que los péptidos se unen bien a las células CHO-LDLR-GFP y que son endocitadas por acumularse en las células de la línea que expresa hLDLR, lo que no es el caso de los péptidos de control. En estos experimentos, incubaciones previas de los péptidos conjugados con S-Tag, con un anticuerpo primario (Ac primario) dirigido contra el S-Tag, y un anticuerpo secundario (Ac secundario) dirigido contra el anticuerpo primario, muestran que el complejo entre un péptido/S-Tag, un Ac primario y un Ac secundario se une a células que expresan el hLDLR y se internaliza por endocitosis. Estos resultados indican que los péptidos cíclicos de esta familia se pueden unir a células que expresan hLDL y transportar cargas importantes (2 anticuerpos), es decir, internalización mediante endocitosis de esas cargas.

EJEMPLO V

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

15 Los efectos tóxicos potenciales de los péptidos sobre células endoteliales, la unión/acumulación de los péptidos en estas células y el paso mediante transcitosis de los péptidos, se evalúan en modelos de BHE *in vitro*. Las células necesarias para la aplicación del modelo (cocultivo de células endoteliales procedentes de microvasos cerebrales y astrocitos) son células bovinas (*bovine brain microvascular endothelial cells*, BBMECs) distribuidas por la empresa Cellial Technologies (Lens, Francia) o células de rata (células endoteliales de capilares del cerebro de rata, BCECs de rata) que permitieron el desarrollo interno de un modelo murino. Este tipo de modelos de BHE *in vitro* se utiliza para evaluar el paso pasivo o el transporte activo de muchas moléculas, en particular agentes farmacológicos, a través de las BCECs y, por lo tanto, por extrapolación, su capacidad para alcanzar el tejido nervioso en el SNC *in vivo*. Los modelos bovinos y murinos tienen propiedades ultraestructurales características del endotelio cerebral, en particular las uniones estrechas, la ausencia de poros, la ausencia de canales transendoteliales, la baja permeabilidad para moléculas hidrófilas y una resistencia eléctrica elevada. Además, estos modelos han mostrado buenas correlaciones entre los resultados de mediciones efectuadas en diferentes moléculas evaluadas *in vitro* e *in vivo* por su propiedad de pasar a través de la BHE. Hasta la fecha, todos los datos obtenidos revelan que estos modelos de BHE *in vitro* imitan de cerca la situación *in vivo* mediante la reproducción de algunas de las complejidades del entorno celular que existen *in vivo*, al tiempo que conservan los beneficios asociados con la experimentación en cultivo celular.

A título de ejemplo, el modelo bovino de BHE *in vitro* implica un cocultivo de BBMECs y astrocitos. Antes del cultivo celular, insertos de placa (Millicell-PC 3,0 µM, 30 mm de diámetro) se tratan en la parte superior con colágeno de cola de rata para permitir una adhesión óptima de las BBMECs y crear las condiciones de una lámina basal. Los cultivos primarios de astrocitos mixtos se establecen a partir de corteza cerebral de rata recién nacida (*Dehouck et al., 1990, J. Neurochem., 54, 1798-1801*). Brevemente, después de retirar las meninges, el tejido cerebral se pasa a través de una malla de nailon de 82 µm. Los astrocitos se distribuyen en los pocillos de microplacas a una concentración de $1,2 \times 10^5$ células/ml y 2 ml de medio de cultivo óptimo (DMEM) complementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado por calentamiento. El medio se cambia dos veces por semana. Las BBMECs obtenidas a partir de Cellial Technologies se cultivan en presencia de medio DMEM complementado con 10% (v/v) de suero de caballo y 10% de suero de ternera inactivado por calentamiento, glutamina 2 mM, 50 µg/ml de gentamicina y 1 ng/ml de factor de crecimiento básico de fibroblastos, añadido cada dos días. Las BBMECs se distribuyen entonces sobre el lado superior de los filtros en 2 ml de cocultivo. Este medio de BBMECs se cambia tres veces por semana. En estas condiciones, las BBMECs diferenciadas forman una monocapa de células confluentes 7 días más tarde.

45 Para someter a ensayo su toxicidad, los péptidos de la invención acoplados a rodamina se incuban en la cámara superior del sistema de cultivo, en contacto con las células endoteliales durante 1 h, 5 h y 24 h. El medio de cultivo de la cámara inferior se recoge en diferentes momentos y la fluorescencia se cuantifica mediante un análisis fluorimétrico. Los resultados se expresan en permeabilidad de la superficie endotelial (o P_e) expresada en 10^{-3} cm/min. El *Lucifer Yellow* (LY), una pequeña molécula fluorescente que atraviesa poco la BHE, se utiliza por una parte para controlar la integridad de la BHE *in vitro*, en todos los pocillos analizados, pero por otro lado en incubación conjunta con los péptidos, con el fin de controlar la ausencia de toxicidad de los péptidos para las células endoteliales que forman esta BHE. La barrera *in vitro* se considera "permeable" o "abierta" si el valor de paso P_e de LY es mayor que $1 \cdot 10^{-3}$ cm/min. La medición de la *Trans Endothelial Electrical Resistance* (TEER), medida con un óhmetro y expresada en $\text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$, también permite medir la integridad de la BHE *in vitro* después de las pruebas de paso a través de esta BHE. El valor del umbral de calidad se establece en $>500 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$.

55 Los experimentos realizados demuestran una ausencia de toxicidad de los péptidos, así como para el péptido de control utilizado, y una ausencia de efectos perjudiciales sobre las propiedades de permeabilidad de la BHE.

El paso a través de la BHE de un péptido de la invención conjugado con rodamina se verifica en el modelo bovino de BHE *in vitro* descrito anteriormente. Este análisis se realiza midiendo por fluorimetría la cantidad de fluorescencia acumulada en el pocillo receptor en diferentes momentos (1 h, 4 h, 24 h). La integridad de la BHE en los diferentes

pocillos analizados se evalúa mediante la medición simultánea de la tasa de LY que pasa de un compartimento a otro en función del tiempo.

EJEMPLO VI

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

En una molécula de interés terapéutico o un agente de formación de imágenes o de diagnóstico o cualquier otra molécula como una sonda molecular, se puede escindir/liberar/recolocar el vector después del transporte y el paso a través de las membranas celulares y más particularmente de la BHE, por ejemplo, a través de una estrategia profármaco por hidrólisis o escisión enzimática de un enlace químico entre el vector y la sustancia activa.

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

- síntesis en tándem (es decir, acoplamiento directo sin intermediario entre las 2 entidades),

15 - síntesis a través de un *enlazador* (Temsamani et al., 2004, *Drug Discov. Today*, 23, 1012-1019).

En función del péptido vector seleccionado y de la molécula de interés terapéutico elegida, se aplica una u otra de las diversas estrategias, ya sea sobre el C-term, ya sea sobre el N-term, ya sea sobre una función reactiva de una cadena lateral de ese péptido vector (Majumdar y Siahaan, *Med Res Rev.*, Epub ahead of print). Idealmente, en una estrategia profármaco, los brazos espaciadores seleccionados deben permitir una buena liberación de la sustancia activa y la mejora de la solubilidad del conjugado (Molema et al., 2001, *Drug targeting, organ-specific strategies. In Methods and principles in medicinal chemistry, vol. 12*). Diversos enlaces químicos covalentes lábiles se pueden generar de este modo entre las 2 entidades (vector y sustancia activa) a través o no de un brazo espaciador: amidas, carbamatos, ésteres, tioéster, disulfuro, etc. Por ejemplo, se ha mostrado en la bibliografía que los enlaces disulfuro, relativamente estables en el plasma, pueden ser escindidos por enzimas tales como la proteína-disulfuro reductasa en el interior del compartimento intracraneal para devolver una función tiol libre (Saito et al., 2003, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 199-215).

Otros compuestos interesantes son aquellos en los que el brazo espaciador representa un polímero tal como polietilenglicol (PEG). De hecho, se ha mostrado en la bibliografía que la conjugación de una molécula orgánica de interés biológico con un posible PEG permitía aumentar la semivida en plasma de esta molécula (Greenwald et al., 2003, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 217-250) y disminuir su aclaramiento.

Los conjugados vectores/sustancias activas o de interés se pueden utilizar en diagnóstico, formación de imágenes o terapia de una patología, una lesión o un trastorno del SNC para la preparación de un medicamento capaz de atravesar la BHE, de un tumor canceroso cerebral u otro tipo de células cancerosas para la preparación de un medicamento capaz de atravesar las membranas celulares cancerosas, y/o de patologías infecciosas para la preparación de un medicamento capaz de atravesar las membranas celulares y de dirigirse a las células infectadas de patologías infecciosas cerebrales u otras, de tipo bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas.

EJEMPLO VII

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

La técnica de perfusión cerebral *in situ* (en un ratón macho adulto OF1) se utiliza para ilustrar el paso al cerebro a través de la BHE.

45 Previamente, los péptidos vectores se marcan radiactivamente con tritio (^3H), elemento que ofrece la sensibilidad más fuerte para la detección de compuestos radiactivos, en particular en secciones de tejido. La preparación de péptidos radiactivos con alta radiactividad específica (RAS, que puede llegar hasta 100 Ci/mmol) se lleva a cabo por una estrategia de acilación de la función amino N-term por anhídrido propiónico (o propanoico) tritiado o propionil-N-succinimida (NPS) tritiada. Este método de trititación se puede aplicar a todos los péptidos (vectores, o conjugados entre un péptido terapéutico y un péptido vector en tándem o mediante un enlazador (que puede ser de naturaleza peptídica u orgánica)), siempre que la modificación del N-term no afecte a la afinidad de los péptidos hacia el receptor diana (es decir, LDLR) o a su actividad biológica en el caso de péptidos terapéuticos.

50 La reacción de trititación del péptido vector en N-term mediante propionilación se lleva a cabo en DMF (1 mg de péptido en 100 a 450 μl según la solubilidad) mediante la adición de 0,1 equivalentes de NPS tritiada durante 5 min a T ambiente, después 0,9 equivalentes de NPS fría (no tritiada) durante 1 h, a continuación, un nuevo equivalente de NPS fría durante 5 h. El medio de reacción se deja entonces a 4°C durante la noche y se purifica al día siguiente por

HPLC. La RAS para cada péptido tritiado está comprendida típicamente entre 5 y 10 Ci/mmol. La cantidad total de radiactividad preparada mediante síntesis está comprendida generalmente entre 600 y 950 μ Ci.

El acoplamiento covalente de los péptidos radiomarcados (en ^3H por ejemplo) con una sustancia activa radiomarcada (en ^{14}C por ejemplo) se lleva a cabo como se ha descrito por ejemplo en el EJEMPLO VI. Como se ha mencionado anteriormente, este acoplamiento covalente se lleva a cabo en función de la estructura y las propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa, en particular, la presencia de grupos químicos funcionales que se pueden modificar sin disminuir la actividad biológica de esa sustancia. Las síntesis de los conjugados radiomarcados se realizan mediante una extrapolación a partir de las vías de síntesis puestas a punto en los conjugados no radiomarcados.

Las técnicas resumidas brevemente a continuación se han desarrollado previamente para estudiar la distribución cerebral de sustancias activas y, en particular, el papel de la BHE y más especialmente del LDLR en la penetración de estas moléculas en el cerebro. Las técnicas de perfusión cerebral *in situ* están entre las más exigentes técnicamente y las más difíciles de realizar en el ratón. Sin embargo, la perfusión cerebral *in situ* (como los modelos *in vitro*) permite un control total de la composición del material perfundido artificial, con el fin de mantener las células y la vascularización del cerebro en condiciones fisiológicas y anatómicas normales dentro del animal, sin el factor perturbador de distribución sistémica.

Esta estrategia de perfusión cerebral *in situ* llevada a cabo normalmente en la rata, se ha adaptado en el ratón (Dagenais et al., 2000, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 20 (2), 381-6) para ampliar su aplicación para evaluar los parámetros cinéticos de transporte a nivel de la BHE y la barrera sangre-retina, y esto también en ratones transgénicos y KO mutantes para los receptores, enzimas o transportadores de sustancias activas. Se trata de una cateterización de una carótida en los ratones (típicamente OF1) anestesiados, y la ligadura de ciertas ramas de esta carótida (externa, tiroidea, occipital) con el fin de perfundir específicamente la carótida interna y las arterias pterigopalatinas, que se utilizan para evaluar la captación cerebral de los vectores y conjugados. El catéter permite sustituir la circulación general por una infusión con un material perfundido bien controlado (tampón bicarbonato, plasma o sangre) al pasar por la carótida. El tampón bicarbonato de Krebs oxigenado se utiliza primero con el fin de evaluar las capacidades de paso cerebral de los vectores y conjugados. Después de una cateterización de la carótida, el caudal sanguíneo endógeno se detiene mediante la sección de los ventrículos del corazón con el fin de evitar la mezcla del tampón con la sangre y una elevación de la presión sanguínea. La duración de la infusión con un caudal fijo está controlada. La perfusión con tampón se puede extender hasta 20 minutos o hasta 1 h en presencia de transportadores de oxígeno (eritrocitos lavados) para los estudios de *Receptor-Mediated Transport* (RMT).

Los experimentos realizados han permitido determinar el transporte cerebral, o coeficiente de transferencia (K_{in} : relación entre el volumen de distribución y el tiempo de perfusión cerebral), de varios péptidos vectores de la invención. El tiempo de perfusión cerebral para estos experimentos es de 5 min con un caudal de perfusión de 2 ml/min. Por lo tanto, el K_{in} de los péptidos vectores de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, radiomarcados con una RAS de 2 Ci/mmol, es respectivamente de 3,3 y $3,0 \times 10^{-4}$ ml/s/g.

A título comparativo, la transferrina (Tf) tiene un K_{in} de $3,0 \times 10^{-4}$ ml/s/g (Demeule et al., 2008, *J. Neurochem.*, 106 (4), 1534-1544), y el péptido de referencia, SEQ ID NO: 17 presenta, en las mismas condiciones experimentales, un K_{in} de $3,2 \pm 0,4 \times 10^{-4}$ ml/s/g.

Estos resultados muestran por lo tanto que los péptidos vectores de la invención, aunque de pequeño tamaño y configuración ventajosa, poseen un coeficiente de transferencia cerebral muy elevado, mayor que el de la transferrina.

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

Las etapas clave de los estudios de perfusión cerebral *in situ* en el ratón se pueden resumir como sigue para los vectores y conjugados estudiados:

- i) Evaluación de la tolerancia (sin toxicidad) de los vectores y conjugados a nivel de la BHE, conservación de la integridad de esta barrera fisiológica.
- ii) Estudio de la cinética y la linealidad de la captación cerebral a través de RMT mediante el LDLR.
- iii) Estudio de la tasa de captación cerebral en función de la concentración en vectores o conjugados (T_{max} , K_m).

- iv) Estudio de los mecanismos de transporte con ayuda de sustratos inhibidores o moduladores del LDLR.
- v) Distribución en los compartimentos del cerebro: agotamiento capilar (*Triguero et al., 1990, J Neurochem., 54 (6), 1882-8*).
- 5 vi) Evaluación de la tasa de unión de vectores y conjugados con proteínas plasmáticas (albúmina, etc.), estudio de su influencia sobre la captación cerebral de esas moléculas.
- vii) Administración intravenosa y evaluación de la distribución en los tejidos (cerebro y otros órganos) en función del tiempo.

REIVINDICACIONES

1. Péptido o seudopéptido, caracterizado por que responde a la siguiente fórmula general (I):



5 en la que A1 indica cisteína (Cys) o uno de sus análogos o isómeros, A2 indica prolina (Pro) o uno de sus análogos o isómeros y A3 indica glicina (Gly) o uno de sus análogos o isómeros, siempre que el residuo A2 sea un análogo de prolina cuando el residuo A1 es una cisteína, y por que es capaz de unirse a un receptor humano de lipoproteínas de baja densidad (hLDLR).

2. Péptido o seudopéptido según la reivindicación 1, caracterizado por que A1 indica Cys o uno de sus análogos seleccionados entre (D)-cys, penicilamina (Pen) y (D)-penicilamina ((D)-pen).

10 3. Péptido o seudopéptido según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que A2 indica un análogo de Pro seleccionado entre ácido pipecólico (Pip) y ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz).

4. Péptido o seudopéptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que A3 indica Gly o sarcosina (Sar).

15 5. Péptido o seudopéptido según la reivindicación 1, caracterizado por que responde a la fórmula general (I') siguiente:



20 en la que A1 indica cisteína o uno de sus análogos o isómeros, preferiblemente A1 indica Cys, (D)-cys, Pen o (D)-pen; y A2 indica Pro o uno de sus análogos o isómeros, preferiblemente A2 indica Pip o Thz, siempre que el residuo A2 sea un análogo de prolina cuando el residuo A1 es una cisteína y por que es capaz de unirse a un receptor humano de lipoproteínas de baja densidad (hLDLR).

6. Péptido o seudopéptido que comprende una secuencia seleccionada entre la secuencia SEQ ID NOs: 1 a 10.

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

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

30 9. Péptido o seudopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la función N-terminal (N-term) está protegida por una acilación y/o por que la función C-terminal (C-term) está protegida por una amidación o una esterificación.

10. Péptido o seudopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso para transportar una sustancia activa o de interés en diagnóstico, formación de imágenes o terapia.

35 11. Péptido o seudopéptido según la reivindicación 10, para su uso para transportar dicha sustancia al sistema nervioso central.

12. Péptido o seudopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso para aumentar la actividad biológica o disminuir la toxicidad de una sustancia activa o de interés a la que está acoplado.

13. Compuesto conjugado con la fórmula (III) siguiente:



40 en la que V representa un péptido o seudopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, L representa un brazo espaciador, D representa una sustancia activa o de interés, x e y son números enteros comprendidos entre 1 y 5, y z es un número entero comprendido entre 0 y 10

14. Compuesto conjugado según la reivindicación 13, caracterizado por que $x=y=z=1$; $x=z>y$, $y=z>x$ o $z>x>y$; o por que z es igual a 0 y x e y son igual a 1 o y es superior a x.

45 15. Compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 13 a 14, caracterizado por que la sustancia activa o de interés es una molécula de interés terapéutico, un agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas, o una sonda molecular seleccionada preferiblemente entre una pequeña molécula química, un péptido o polipéptido, una proteína, un antígeno, un anticuerpo o una porción de anticuerpo, un ácido nucleico o un oligonucleótido, una ribozima, un marcador o un trazador.

16. Compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado por que el acoplamiento entre V y D o entre V y L y por una parte y entre L y D por otra parte, se realiza por uno o varios enlaces covalentes, iónicos, de hidrógeno, hidrófobos o de Van der Waals, escindibles o no en medio fisiológico o en el interior de las células.
- 5 17. Compuesto conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, caracterizado por que D está acoplado a V, en su caso a través de L, a nivel de uno o varios extremos N-term y/o C-term de V y/o a nivel de uno o varios grupos reactivos transportados por las cadenas laterales de aminoácidos naturales o no, constitutivos de V.
18. Procedimiento de preparación de un compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 13 a 17, caracterizado por que comprende una etapa de acoplamiento entre un péptido o seudopéptido V y una sustancia D, en su caso a través de L, preferiblemente por vía química, bioquímica, enzimática o mediante ingeniería genética.
- 10 19. Composición farmacéutica caracterizada por que comprende al menos un compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 13 a 18 y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.
20. Composición de diagnóstico caracterizada por que comprende un agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas constituido por un compuesto conjugado según una de las reivindicaciones 13 a 18.

Figura 1

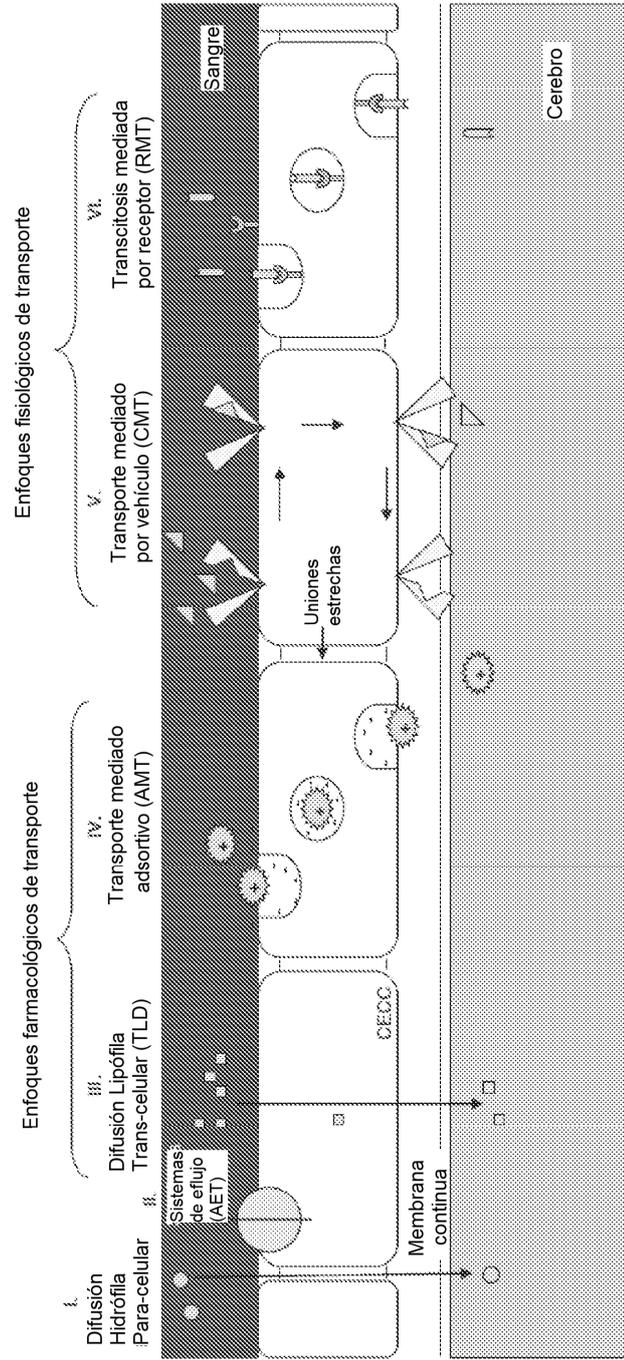
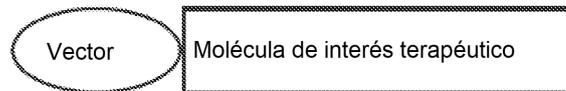


Figura 2

a). Síntesis en tándem



b). Síntesis a través de un enlazador

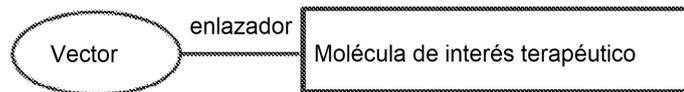


Figura 3

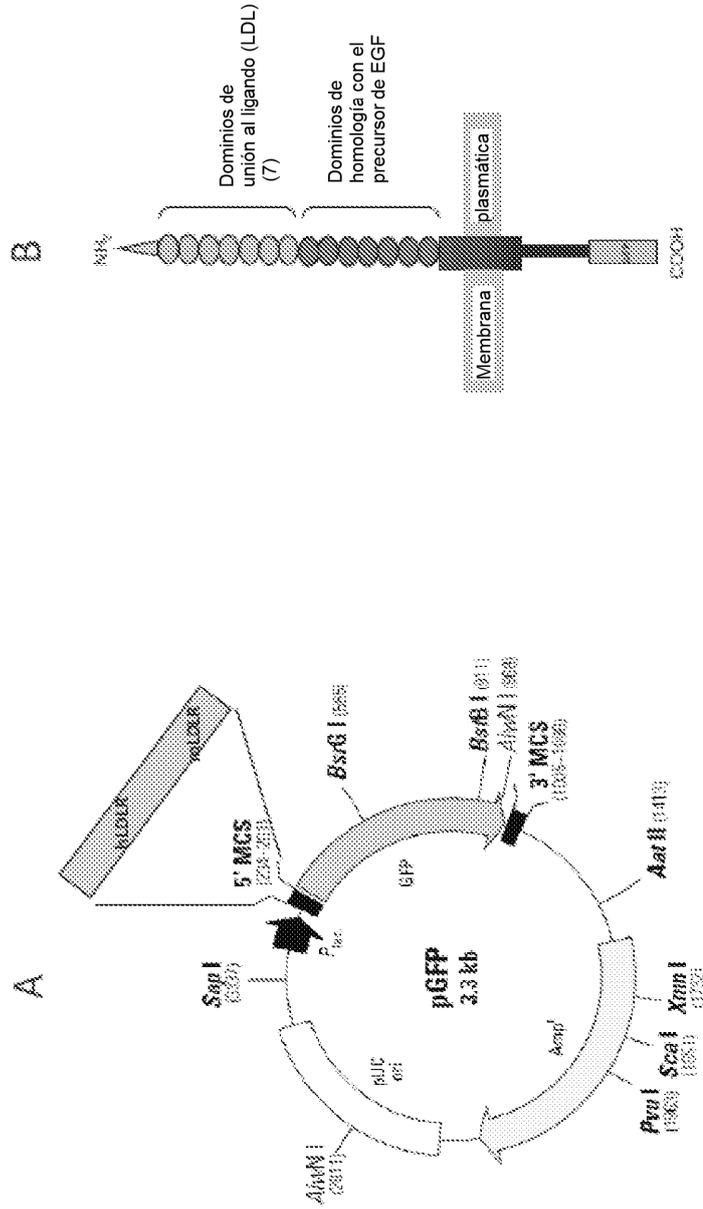


Figura 4

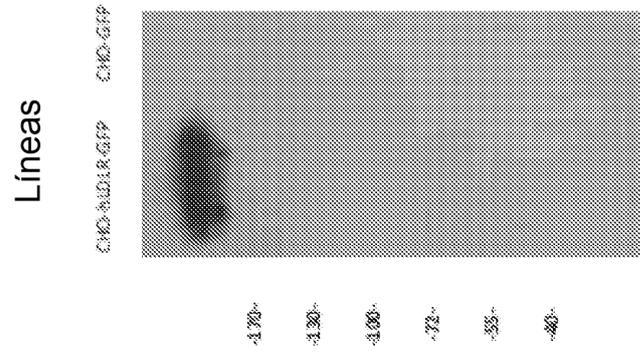


Figura 5

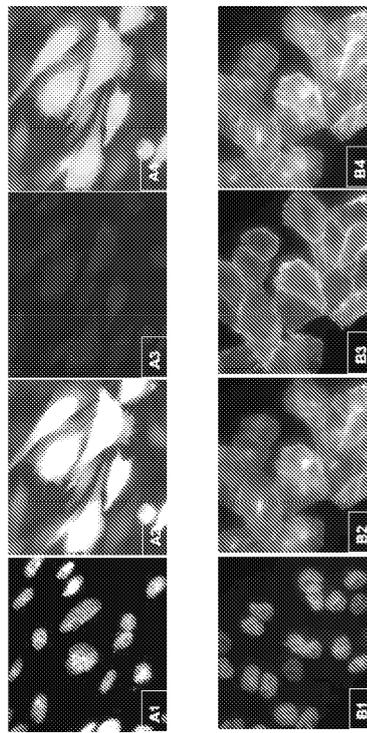


Figura 6

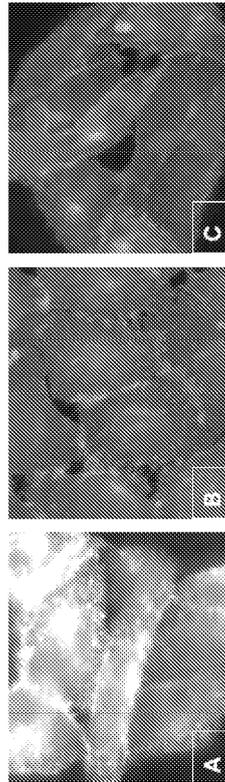


Figura 7

