

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 250**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2014 PCT/EP2014/001025**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14180533**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2014 E 14718515 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2994152**

54 Título: **Conjugados para la protección de sustancias con efecto nefrotóxico**

30 Prioridad:

07.05.2013 EP 13002431

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

22.01.2019

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**KUEBELBECK, ARMIN;
LARBIG, GREGOR;
ARNOLD, STEFAN;
MIER, WALTER y
HABERKORN, UWE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 697 250 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

Conjugados para la protección de sustancias con efecto nefrotóxico

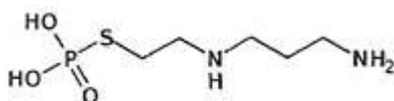
5 La presente invención se refiere a un conjugado que contiene al menos una molécula de soporte selectiva para los riñones y al menos un compuesto activo que presenta un efecto protector para los riñones frente a las sustancias con efecto nefrotóxico, a un procedimiento para la preparación del conjugado, al conjugado para usar para la protección de los riñones frente a sustancias tóxicas, así como a un medicamento que contiene el conjugado.

10 El riñón es importante principalmente para el transporte y la excreción de diversas sustancias y en la producción de hormonas. Una función de los riñones es la excreción de productos finales de metabolismo, las llamadas sustancias de presencia obligatoria en la orina, y toxinas del cuerpo mediante la formación de la orina, que finalmente es excretada del cuerpo a través del tracto urinario. El riñón regula el balance de agua y sirve, por lo tanto, para regular a largo plazo la presión sanguínea. El riñón regula el balance de electrolitos y el balance de ácido-base controlando la composición de la orina. Además, el riñón es un órgano importante para el metabolismo intermedio del cuerpo (efectúa gluconeogénesis). El riñón produce hormonas tales como, por ejemplo, eritropoyetina, para la formación de sangre y es el sitio de degradación de hormonas peptídicas. Pero también muchas funciones del riñón mismo son controladas por hormonas.

15 En la actualidad, aproximadamente 280 millones de personas sufren de enfermedades renales crónicas. Ya han sido desarrollados muchos procedimientos de diagnóstico y terapéuticos. A manera de ejemplo, para el tratamiento de los riñones y para influir en la función de los riñones se emplean inmunosupresores, citostáticos, inmunoterapéuticos, antiflogísticos, antibióticos, virostáticos, antihipertensivos, uricosúricos u otros diuréticos.

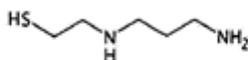
20 Una serie de sustancias activas aprobadas, principalmente citostáticos, muestran nefrotoxicidad como un efecto secundario indeseado limitante de la dosis. Ejemplos de sustancias con efecto nefrotóxico son cisplatino, carboplatino, gentamicina o ciclofosfamida. A manera de ejemplo, el ampliamente difundido citostático cisplatino daña las células de túbulo proximales (PTC) de los riñones, de modo que se restringen la dosis y la cantidad de ciclos de terapia en el caso de administración única. El daño a las PTCs es provocado por el estrés oxidativo intracelular (Matsushima H, et al. 1998, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 131:518-526). La publicación WO 2007/022774 A1 divulga el uso de determinados péptidos para la protección de los riñones frente a fallos renales inducidos por cisplatino.

25 La amifostina es un medicamento citoprotector para el cual ha sido comprobada una acción quimio- y radio protectora en una gran cantidad de organismos modelo y en humanos.



Amifostina

30 La amifostina misma es un profármaco que se disocia por las fosfatasa alcalinas localizadas en la membrana de las células endoteliales para dar lugar a la propia sustancia activa 2-((aminopropil)amino)etantiol.



2-((Aminopropil)amino)etantiol

35 Las fosfatasa alcalinas se expresan en una medida esencialmente menor en un tejido tumoral maligno que en un tejido sano. De esta manera, la amifostina es asimilada principalmente por células sanas. Esta selectividad (se encuentra en la región de 100:1) es necesaria para también impedir el desarrollo de la acción quimio- y radio protectora en las células tumorales. La especie activa es el grupo tiol antioxidante de 2-((aminopropil)amino)etantiol.

40 La amifostina no se encuentra disponible en forma oral. Habitualmente se administra mediante infusión media hora antes de la radioterapia o de la infusión de un agente quimioterapéutico. La dosis se encuentra en este caso en el intervalo de 740 a 900 mg/m² de área corporal. En más de la mitad de los pacientes se observa en este caso una hipotonía arterial como efecto secundario grave.

Por lo tanto, existe la necesidad de proteger el riñón mejor y más específicamente contra compuestos activos nefrotóxicos durante un tratamiento (por ejemplo, radioterapia o infusión de un agente quimioterapéutico) para impedir los efectos secundarios de los compuestos activos.

5 Fue objeto de la presente invención proporcionar una solución para proteger el riñón específicamente contra compuestos activos nefrotóxicos.

De manera sorprendente se ha encontrado que los conjugados de moléculas de soporte, selectivas para riñón y compuestos activos protectores de riñón son adecuados de manera sobresaliente para lograr este objetivo.

10 Por lo tanto, es objeto de la presente invención un conjugado que contiene al menos una molécula de soporte selectiva para el riñón y al menos una sustancia activa que presenta un efecto protector para el riñón frente a sustancias con efecto nefrotóxico, tal como se define en la reivindicación 1.

Por molécula de soporte selectiva para el riñón se entiende según la invención que puede servir como soporte (o transportador) para una sustancia activa y permite un transporte focalizado en el riñón. Como molécula de soporte puede usarse un compuesto que presenta una selectividad hacia el riñón suficientemente alta después de la conjugación con la sustancia activa.

15 En el estado de la técnica se conocen, por ejemplo, las siguientes sustancias que son adecuadas para dirigirse al riñón, es decir para el transporte controlado específico hacia los riñones:

proteínas endógenas relativamente pequeñas, tales como lisozima (14,3 kDa) pueden pasar a través del glomérulo de los riñones y son adecuadas como transportadores para el tratamiento de los riñones con sustancias activas (Franssen et al.: J. Med. Chem. 35, 7, 1992, 1246-1259; Zhang et al.: Biomaterials 30, 2009, páginas 1372-1381).

20 Además, existen diferentes péptidos con aproximadamente 5 a 20 aminoácidos que son asimilados selectivamente por los riñones. Por ejemplo, estos son APASLYN y HITSLLS (Denby et al.: Molecular Therapy 15, 9, 2007, 1647-1654) o ANTPCGPYTHDCPVKR (Kumar y Deutscher: The Journal of Nuclear Medicine 49, 5, 2008, 796-803; Geng et al.: Bioconjugate Chemistry 23, 2012, 1200-1210).

25 De acuerdo con la invención, la molécula soporte selectiva para el riñón es un péptido que se compone en más de 50% (con respecto a la cantidad de unidades de aminoácido) de secciones de secuencias seleccionadas del grupo que comprende -(KKEEE)-, -(RREEE)-, -(KKEE)-, -(KKKEEE)- und -(KKKKEE)-, y en cuyo caso

- el péptido se compone en al menos 80 % (con respecto a la cantidad de unidades de aminoácidos) de los aminoácidos K y E o R y E,
- y el péptido contiene 3 a 5 secciones de secuencia como se han definido antes.

30 Por un péptido se entiende según la invención un compuesto que resulta de una unión de dos o más aminoácidos mediante enlaces de amida. En tal caso, los aminoácidos individuales se unen en una secuencia definida para formar una cadena. De acuerdo con la invención, los aminoácidos son compuestos que tienen al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxilo. Ejemplos son aminoácidos naturales, proteinogénicos o no proteinogénicos que existen en organismos o aminoácidos preparados sintéticamente.

35 Las unidades de aminoácido pueden estar presentes en forma de A o en forma L. Un péptido comprende, por ejemplo, 5 a 100 aminoácidos. En una forma de realización, un péptido presenta una longitud de cadena de 5 a 40 unidades de aminoácido, o una longitud de cadena de 10 a 30 unidades de aminoácido.

40 Según la invención, el péptido se compone en más de 55% (con respecto a la cantidad de unidades de aminoácido) de secciones de secuencia, tal como se ha definido antes. Preferiblemente se compone en más de 70% de secciones de secuencia, tal como se ha definido antes; de modo particularmente preferido en más de 90%.

Un aminoácido con grupo lateral ácido (A) puede ser, por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, succinato de arginina y/o ácido sistémico. Preferiblemente se trata de aminoácidos que tienen función carboxilo, es decir ácido glutámico y/o ácido aspártico; de modo particularmente preferido, ácido glutámico.

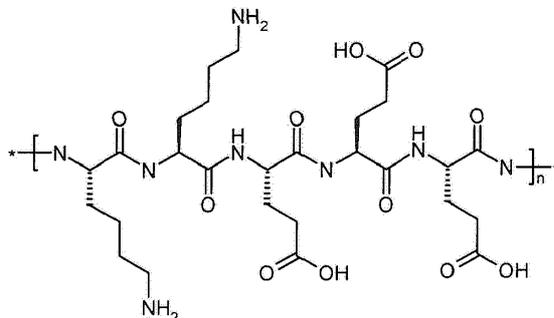
45 Un aminoácido con grupo lateral básico (B) puede ser, por ejemplo, lisina, arginina, histidina y/o ornitina. Preferiblemente se trata de lisina.

50 Un aminoácido (C) cualquiera puede ser, por ejemplo, alanina, arginina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina y/o citrulina. Preferiblemente son aminoácidos proteinogénicos que se enlazan de manera natural. Esto garantiza la degradación del péptido en las células de túbulo proximales de los riñones para formar metabolitos toxicológicamente benignos por completo.

Se utilizan los códigos de una letra de los aminoácidos: E (ácido glutámico), D (ácido aspártico), C (cisteína), K (lisina), R (arginina), H (histidina).

De acuerdo con la invención, la secuencia representa una secuencia seleccionadas del grupo que comprende - (KKEEE)-, -(RREEE)-, -(KKEE)-, -(KKKEEE) und - (KKKEE)-.

De manera particularmente preferida, la secuencia representa la secuencia -(KKEEE)-:



5 De acuerdo con la invención, el péptido se compone en al menos 50 % (con respecto a la cantidad de las unidades de aminoácidos) de los aminoácidos K y E o R y E. El péptido se compone preferiblemente en al menos 70% (con respecto a la cantidad de las unidades de aminoácidos) de los aminoácidos K y E o R y E, de manera particularmente preferida en al menos 80 %.

10 En una forma posible de realización, el péptido contiene varias secciones de secuencia directamente sucesivas. El péptido contiene preferiblemente 3 a 5 secciones de secuencia sucesivas.

Por ejemplo, el péptido puede componerse de 3 a 5 secciones sucesivas de secuencia, así como de uno o de varios otros aminoácidos en la terminal C y/o N. Esto es ilustrado en la fórmula (2):



donde la sección de secuencia es tal como se ha definido antes,

15 x representa 3, 4 o 5,

X e Y representan, independientemente entre sí, un aminoácido cualquiera, preferiblemente A, y

p y q representan, independientemente entre sí, un número entero entre 0 y 3, preferiblemente 0 o 1.

Ejemplos de péptidos posibles conjugado según la invención son péptidos seleccionados del grupo que comprende (RREEE)₃R, (KKEE)₅K, (KKKEE)₃K, (KKKEEE)₃K y (KKEEE)₃K.

20 Una molécula soporte selectiva de riñón, alternativa es el conjugado ε-polilisina, tal como se describe en la publicación WO 2011/009539 A1. Esta molécula de soporte permite igualmente una concentración altamente selectiva en el riñón. El enlazamiento de las unidades de lisina en el polímero se efectúa por medio de sus grupos ε-amino.

25 Por una sustancia activa que presenta un efecto protector para el riñón frente a sustancias con efecto nefrotóxico se entiende según la invención una sustancia activa que reduce el daño de las células de túbulo proximales. Esta es, por ejemplo, una sustancia activa seleccionada de antioxidantes, inhibidores de apoptosis, sustancias activas con influencia en el ciclo celular, sustancias activas que activan los mecanismos de reparación de las células y combinaciones de las mismas.

30 En teoría puede reducirse el daño a las células de túbulo proximales en diferentes niveles con la ayuda de estas sustancias activas: en la primera etapa, bloqueando los mecanismos de transporte de las células de túbulo proximales puede impedirse la captación de compuestos citotóxicos en el interior de las células. El bloqueo puede efectuarse por medio de inhibidores especiales, pero también mediante cantidades suficientes de la molécula de transporte misma, la cual bloquea temporalmente los receptores de las células de túbulo proximales. Las sustancias que reducen la selectividad metabólica tienen un efecto similar; o respectivamente permiten a estas
 35 células permanecer en la fase G₀-del ciclo celular. En la segunda etapa, los compuestos nefrotóxicos transportados o difundidos a la célula pueden volverse inocuos por medio de "antídotos" que han sido conducidos hacia el interior de la célula por medio del transportador de sustancia activa antes de administrar la sustancia activa nefrotóxica. El objetivo de la tercera etapa es suprimir la apoptosis de células de túbulo proximales dañadas. Las sustancias citotóxicas como, por ejemplo, cisplatino causan daño al ADN en el núcleo de la célula. Si el nivel de daño excede
 40 cierto umbral, se provoca la muerte celular programada, la apoptosis. En células tumorales se desea esta operación, pero es fatal en el caso de células tumorales proximales de los riñones. Se conocen algunas sustancias (inhibidores de apoptosis) que son capaces de impedir la muerte celular programada o de incrementar el umbral para la iniciación de apoptosis en la célula. En la cuarta etapa, a las células pueden conducirse sustancias que activan los mecanismos naturales de reparación de las células y, por lo tanto, preparan el daño al ADN.

Bloqueo de los mecanismos de transporte (etapa 1):

Con las moléculas de soporte selectivas para el riñón pueden conjugarse sustancias activas que tienen una influencia en los mecanismos de transporte de las células de túbulo proximales. Seleccionando de manera específica las moléculas de la sustancia activa pueden bloquearse los transportadores celulares, tanto en el lado apical de las células de túbulo proximales, es decir el lado que se encuentra en el lumen y está en contacto con el ultrafiltrado glomerular, como también en el lado basolateral, es decir el lado que se enfrenta a los vasos sanguíneos. Los transportadores del lado basolateral de las células de túbulo proximales son de la mayor importancia para la secreción de túbulo proximal de sustancias endógenas y sustancias extrañas, tales como, por ejemplo, medicamentos. Las sustancias aniónicas son captadas por las células de túbulo proximales por medio del transportador orgánico de aniones 1 (OAT1). Las sustancias catiónicas, por el contrario, mediante el transportador orgánico de cationes 2 (OCT2). Ambos transportadores pueden inhibirse mediante determinadas sustancias activas. Un ejemplo de un inhibidor de OAT1 es el medicamento probenecid (Kurtz A, et al. 2009, *Physiologie*, ISBN 3-131-51496-5, página 365). Probenecid puede conjugarse sobre un péptido de acuerdo con la invención y, después de filtración glomerular, captarse por el lado apical de las células de túbulo proximales. A través de un enlazado lábil, por ejemplo, un grupo éster, con el cual el grupo carboxilo de probenecid se conjuga con la molécula de soporte, en el endosoma de las células de túbulo proximales puede liberarse la sustancia activa químicamente no modificada mediante esperanzas. La sustancia activa libre puede alcanzar el lado basolateral mediante difusión o transportadores y bloquear allí el transportador orgánico de aniones 1.

Un ejemplo de un inhibidor del transportador orgánico de cationes 2 es el medicamento tacrina (Sung JH, et al. 2005, *Drug Metab Dispos*, 33(3):440-448 PMID 15547049). Tacrina también puede conjugarse con un péptido según la invención, por ejemplo, como base de Schiff o de modo amídico. El transportador orgánico de cationes 2 puede bloquearse, por lo tanto, por la ruta descrita en el ejemplo de probenecid conjugado. Por ejemplo, el citostático nefrotóxico cisplatino es captado y se acumula por las células de túbulo proximales por medio de OCT2 en el lado basolateral. En las células de túbulo proximales, el cisplatino despliega luego su efecto nefrotóxico (Freissmuth M, et al. 2012, *Pharmakologie & Toxikologie*, ISBN 3-642-12353-8, p. 735).

Antioxidantes (etapa 2):

Con la molécula soporte selectiva de riñón puede conjugarse una serie de sustancias con efecto antioxidante. Como clases de sustancias activas se toman en consideración, entre otros, polifenoles (resveratrol, ácido cafeico, luteolina, quercetina, rutina, cianidina, xantohumol,...), ácido lipoico, ácido ascórbico, ácido nicotínico, amifostina, aliina, tioles (por ejemplo, 2-mercaptoetanosulfonato-sodio (Mesna)), tocoferoles, carotenoides y/o butilhidroxitolueno (BHT), o combinaciones de los mismos.

Como molécula soporte selectiva hacia el riñón se usa un conjugado de ϵ -polilisina, tal como se divulga en la publicación WO 2011/009539 A1; la estructura molecular del oligómero puede variar de manera que los bloques estructurales del aminoácido cisteína puedan incorporarse al oligómero. La cisteína tiene un grupo tiol libre con acción antioxidante. Con esta estructura, el portador puede modificarse para formar un medicamento activo con una acción antioxidante. De manera independiente de esto, en lugar de esto, o adicionalmente, puede conjugarse una serie de sustancias activas protectoras con el soporte peptídico, tal como se ha descrito antes.

Inhibidores de apoptosis (etapa 3):

Sobre el transportador de la sustancia activa son conjugables sustancias anti-apoptóticas. Ejemplos de este grupo de sustancia activa son pifithrin- μ (Nijboer et al. 2011, *Ann Neurol*:doi: 10.1002/ana.22413) y pifithrin- α (Komarova et al. 2000, *Biochemistry (Mosc)* 65(1):41-48), así como MDL 28170 (Kawamura et al. 2005, *Brain Res*. 1037(1-2):59-69) y NS3694 (Zhao et al. 2010, *Age (Dordr)*. 32(2):161-177). Pifithrin- α , un inhibidor p53, puede aumentar considerablemente el umbral para provocar la apoptosis en células tratadas y organismos modelo.

Una ventaja de los inhibidores de apoptosis es que también pueden administrarse, incluso después del daño a las células. La desventaja de la administración sistémica de los inhibidores de apoptosis, que puede tener como consecuencia opcionalmente un riesgo incrementado de cáncer, puede impedirse ventajosamente mediante administración específica para el órgano, con la molécula soporte según la invención.

Sustancias activas con influencia en el ciclo celular y en el metabolismo:

Además de los antioxidantes y de los inhibidores de apoptosis, igualmente son compuestos activos potenciales los compuestos que causan una detención (temporal) del ciclo celular de las células de túbulo proximales, con los cuales puede reducirse el daño a los riñones por los medicamentos nefrotóxicos.

Un ejemplo de estos es el compuesto apigenina (Ruela-de-Sousa et al. 2010, *Cell death & disease*. 1, e19).

Sustancias activas que activan los mecanismos de reparación de las células (etapa 4):

Activando determinados factores de transcripción como, por ejemplo, Sp1, o MDC1 (Luo et al. 2012, *The EMBO journal*, 31(13):3008-3019), una célula puede estimularse para una reparación incrementada de rupturas de la hebra (hélice) (doble) (Beishline et al. 2012, *Molecular and cellular biology*, DOI: 10.1128/MCB.00049-12. PMID 22826432).

El flavonoide baicaleína (5,6,7-trihidroxi-flavona) es un ejemplo de un compuesto que puede activar la reparación de ADN en las células (Kim et al. 2012, Cell Biol Toxicol, DOI: 10.1007/s10565-012-9233-y. PMID 23011636).

Además, parando el ciclo celular (etapa 1), la célula se pone en un estado en el cual se realizan esencialmente "trabajos de reparación" en el ADN dañado (Saleh et al. 2012, Cancer biology & therapy 11, PMID 22895066).

5 La administración (simultánea) de varias clases de sustancia activa (etapas 1 a 4 de los ejemplos anteriores) es particularmente ventajosa para mantener tan bajo como sea posible el daño de las células de túbulo proximal. Las sustancias activas individuales pueden conjugarse en este caso sobre moléculas transportadoras separadas o varias sustancias activas diferentes pueden conjugarse con una molécula transportadora.

10 Posibles sustancias activas en el conjugado pueden seleccionarse, por lo tanto, del grupo que comprende antioxidantes, inhibidores de apoptosis, sustancias activas con influencia del ciclo celular, sustancias activas que activan los mecanismos de reparación de las células, inhibidores de receptor y combinaciones de los mismos.

En una forma preferida de realización, la sustancia activa que tiene un efecto protector para el riñón frente a las sustancias con efecto nefrotóxico es un antioxidante y/o un inhibidor de apoptosis.

15 Antioxidantes preferidos son ácido lipoico, resveratrol, ácido cafeico, luteolina, quercetina, rutina, cianidina, xantohumol, ácido ascórbico, ácido nicotínico, amifostina, aliina, tioles, mesna, tocoferoles, carotenoides y butilhidroxitolueno (BHT).

Inhibidores de apoptosis preferidos son pifithrin- μ (Nijboer et al. 2011, Ann Neurol.:doi: 10.1002/ana.22413), pifithrin- α (Komarova et al. 2000, Biochemistry (Mosc) 65(1):41-48), MDL 28170 (Kawamura et al. 2005, Brain Res. 1037(1-2):59-69) y NS3694 (Zhao et al. 2010, Age (Dordr). 32(2):161-177).

20 Por lo tanto, en una forma particularmente preferida de realización de la presente invención, la sustancia activa que tiene un efecto protector para el riñón frente a sustancias con efecto nefrotóxico, es resveratrol, ácido cafeico, luteolina, quercetina, rutina, cianidina, xantohumol, ácido ascórbico, ácido nicotínico, amifostina, aliina, tioles, tocoferoles, carotenoides, butilhidroxitolueno (BHT), pifithrin- μ , pifithrin- α , MDL 28170 y/o NS3694, o mezclas de los mismos.

25 Según la invención, el conjugado contiene al menos una molécula soporte selectiva de riñón, como se ha definido antes, y al menos una sustancia activa que presenta una acción protectora para el riñón frente a sustancias con efecto nefrotóxico, tal como se ha definido antes.

El enlace de la sustancia activa a la molécula soporte es preferiblemente covalente y puede efectuarse opcionalmente por medio de un espaciador.

30 De acuerdo con la invención, por cada conjugado según la invención pueden estar enlazadas una o varias moléculas de sustancia activa, iguales o diferentes.

Igualmente, el conjugado según la invención, en particular en el caso de macromoléculas tales como moléculas relativamente grandes de sustancia activa, por ejemplo, proteínas, también puede contener dos o más moléculas soporte que se unen a una molécula de sustancia activa para hacer posible la acumulación específica en el riñón de la sustancia activa. De manera típica, aquí también se efectúa un enlazamiento covalente de las moléculas de soporte a la macromolécula. Según la invención, como macromoléculas son válidas no solamente grandes moléculas como las proteínas, sino también cualquier forma de partículas (por ejemplo, nanopartículas), liposomas u otros sistemas con los cuales pueden transportarse sustancias activas o que pueden unirse a las sustancias activas.

40 Además, funcionalidades para focalización específica de una célula como, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o aptámeros pueden estar enlazadas al conjugado según la invención. También pueden estar enlazados colorantes fluorescentes o interleuquinas tales como IL-2.

Las sustancias activas u otras funcionalidades pueden estar enlazadas directamente o a través de un espaciador, de manera covalente, con el péptido.

45 Un espaciador, con frecuencia también denominado enlazador, provoca un enlazamiento covalente entre dos partes de una molécula, en el presente caso, por ejemplo, entre el péptido y una sustancia activa. Un espaciador se introduce, por ejemplo, si la conexión entre dos partes de la molécula no va a efectuarse solamente por medio de un enlace químico directo, sino que debe generarse cierta distancia entre dos partes de la molécula. Igualmente, un espaciador puede proporcionar las funcionalidades químicas que son necesarias para enlazar dos partes de una molécula que de otra manera no reaccionarían entre sí. La conjugación de un espaciador sobre la molécula de soporte o una sustancia activa se efectúa mediante un enlace de amida o de éster. Los espaciadores pueden ser, por ejemplo, hidrocarburos alifáticos, poliéteres (como polietilenglicoles), péptidos o elementos similares que tienen una estructura de cadena. El espaciador puede ser estable, es decir puede disociarse solamente muy poco o no disociarse en condiciones fisiológicas, o puede ser inestable, es decir que puede disociarse al menos en determinadas condiciones fisiológicas.

- Ejemplos de grupos funcionales a través de los cuales puede efectuarse un enlazamiento directo son -NH₂, -SH, -OH, -Hal (z.B. -Cl, -Br, -I), -alquino, -NCS, -NCO, SO₂Cl, -azida, -carbonato, -aldehído, -epóxido, -COOH, -COOR, donde R en este caso es preferiblemente un halógeno o preferiblemente un activador, es decir, un buen grupo de partida, por ejemplo, *N*-hidroxisuccinimida, pentafluorofenilo o para-nitrofenilo. Se encuentra un resumen de los diferentes tipos de acoplamiento covalente, por ejemplo, en "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson, Academic Press, 1996, en las páginas 137 a 165.
- Por ejemplo, en el conjugado según la invención, las sustancias activas pueden enlazarse por medio de un enlazador capaz de disociarse. Este enlazador se disocia *in vivo* luego en determinadas condiciones, por ejemplo, de modo enzimático o químico y libera la sustancia activa. Para este propósito son adecuados los enlazadores que contienen enlaces de carboxilatos y disulfuros, donde los primeros grupos son hidrolizados de modo enzimático o químico y los últimos son separados mediante intercambio de disulfuro, por ejemplo, en presencia de glutatona.
- Un ejemplo de un espaciador disociable también es un péptido que puede disociarse específicamente con la ayuda de enzimas endógenas específicas o alternativamente de aquellas que se adicionan al cuerpo. De esta manera, por ejemplo, la secuencia de péptido DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) se disocia después de la inducción de apoptosis por medio de caspasa-3. Por lo tanto, una sustancia activa que está enlazada mediante un espaciador de este tipo puede retirarse del riñón después de cierto tiempo de residencia allí, o de manera alternativa puede verificarse una funcionalidad correspondiente (presencia o ausencia de una enzima determinada) del riñón. Otros ejemplos son las secuencias de péptido CPEN↓FFWG_{GGG} (Salinas et al. 2008, Biomaterials 29, 2370-2377) o PENFF, que puede disociarse mediante la matriz metaloproteasa-13.
- Una forma sencilla de realización de un espaciador disociable es la formación de un éster de ácido carboxílico el cual puede disociarse fácilmente por medio de esterases.
- Por lo tanto, en una forma preferida de realización de la presente invención, la sustancia activa se une por medio de un enlace de éster. Esto hace posible una disociación exacta de la molécula de sustancia activa en el riñón. Simultáneamente, no obstante, el enlace es antes suficientemente estable para transportar hacia el riñón para impedir una disociación prematura.
- Además, un enlace de éster fácilmente disociable de la sustancia activa con el transportador de la sustancia activa hace posible una liberación relativamente rápida de la sustancia activa en el sitio de la diana. La disociación del enlace de éster se efectúa en el tiempo más rápido que la degradación del transportador de sustancia activa por medio de las proteasas.
- Como alternativa, el espaciador puede contener una estructura lábil de ácido, por ejemplo, una hidrazona, una elimina, una carboxilhidrazona, un acetal o cetal (véase, por ejemplo, Haag-R, Kratz-F, Angewandte Chemie pagina 1218 (2006)).
- De acuerdo con la invención, el al menos compuesto activo puede enlazarse al terminal N y/o C de la molécula soporte.
- En una forma alternativa de realización, la sustancia activa puede estar enlazada con un aminoácido en la cadena; en otra forma alternativa de realización, la sustancia activa en la cadena puede estar enlazada entre los aminoácidos.
- El conjugado según la invención es captado por los riñones de manera altamente selectiva y degradado de manera relativamente rápida.
- Seleccionando de manera adecuada un lugar de conexión, así como seleccionando de manera adecuada la longitud de cadena y la estructura molecular de la molécula soporte, es posible ajustar en este caso la farmacocinética deseada, es decir la liberación deseada de sustancia activa en el sitio diana, es decir en el riñón.
- De manera típica, las moléculas soporte más largas conducen a una liberación retrasada, en comparación con moléculas de soporte más cortas. Moléculas de soporte más largas tienen, por ejemplo, longitudes de cadena de 20 a 40 aminoácidos, preferiblemente 30 aminoácidos, mientras que por molécula de soporte más cortas normalmente se entienden longitudes de cadena de 3 a 10 aminoácidos, preferiblemente 5 aminoácidos.
- La liberación de sustancias activas conectadas en el terminal C se efectúa esencialmente más rápido que las sustancias activas conectadas en el terminal N. Sin estar ligados a esta teoría, se supone que la etapa determinante de velocidad en la degradación del péptido se ve influida ante todo por carboxipeptidasas que degradan el péptido empezando desde el terminal C.
- De acuerdo con la invención, las sustancias activas incorporadas a la cadena de una manera ramificada también se liberan significativamente más lento que aquellas enlazadas de una manera lineal. La degradación enzimática de estructuras de péptidos ramificados es fundamentalmente, de manera ostensible, más difícil que la degradación de péptidos lineales.

Además, la velocidad de liberación de la sustancia activa también puede controlarse según la invención por medio de este tipo de su conexión con el oligómero. Una conexión de éster fácilmente disociable hace posible una liberación relativamente rápida de la sustancia activa en el sitio diana (véase antes).

- 5 También es objeto de la presente invención un procedimiento para la preparación de un conjugado como se ha descrito antes, que se caracteriza porque una sustancia activa activada que presenta una acción protectora para el riñón frente a sustancias nefrotóxicas es conjugada con la molécula de soporte.

La preparación del conjugado según la invención presenta normalmente al menos las siguientes etapas procedimentales:

- a) proporcionar una molécula soporte, tal como se ha definido antes, la cual tiene al menos un grupo reactivo,
 10 b) conjugar al menos una sustancia activa opcionalmente activada, como se ha definido antes, con la molécula soporte de la etapa a).

Las moléculas soporte de los conjugados según la invención pueden prepararse principalmente mediante diferentes procedimientos conocidos por el experto en el campo de la síntesis de péptidos.

- 15 De manera típica, la preparación se efectúa mediante una síntesis en fase sólida. Una fase sólida es, según la invención, un material compuesto inorgánico u orgánico/inorgánico que puede emplearse como resina un soporte en la síntesis de fase sólida. Además, de acuerdo con la invención, como fase sólida también son válidas las superficies de cuerpos moldeados como, por ejemplo, placas de microtitulación o materiales en forma de partículas como, por ejemplo, nanopartículas orgánicas o inorgánicas, partículas metálicas o similares.

- 20 La síntesis en fase sólida se realiza de manera correspondiente a una síntesis de péptido convencional (por ejemplo, síntesis de péptido Fmoc/tBu o síntesis de péptido Boc/Bencilo). El experto en la materia conoce síntesis en fase sólida de este tipo. Libros de texto adecuados para la síntesis de péptidos son "Solid-Phase Peptide Synthesis": 289 (Methods in Enzymology) de Sidney P. Colowick (Autor), Gregg B. Fields (Herausgeber), Melvin I. Simon (editor) Academic Press Inc (noviembre 1997) o "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach" de W. Chan (Autor), W. C. Chan (editor), Peter D. White (editor) Oxford Univ Pr (2 de marzo de 2000). Los monómeros empleados respectivamente se seleccionan aquí de modo que resulte un péptido que corresponda a la presente invención. Según el tipo de unidad de aminoácido, para la síntesis puede usarse directamente una unidad de aminoácido derivatizada o una unidad de aminoácido protegida primero en el sitio previsto para la derivatización. Después de efectuar la síntesis del péptido, la derivatización final con la sustancia activa puede efectuarse ya sea en fase sólida o en solución después de disociarse de la fase sólida.

- 30 El enlazamiento de la sustancia activa se efectúa en este caso preferiblemente al péptido terminado, es decir todavía en la fase sólida después de efectuar la síntesis en fase sólida del péptido, o después de su disociación en solución.

- 35 Si la sustancia activa va a enlazarse, por ejemplo, al extremo terminal N del péptido, los péptidos se generan normalmente con un grupo protector amino-terminal, tal como, por ejemplo, Fmoc. Si la sustancia activa puede soportar las condiciones usadas para la disociación del péptido de la resina de síntesis, por una parte, y por otra parte para desproteger las cadenas laterales, el grupo Fmoc puede disociarse del terminal N del péptido completo enlazado a la resina de modo que la sustancia activa puede enlazarse a la amina N-terminal libre. En tales casos, la sustancia activa es activada normalmente mediante procedimientos que son conocidos generalmente en la técnica para generar un grupo activo de este o un grupo activo de carbonato que sea efectivo para formar un enlace de amida o de carbamato con el grupo amino del oligómero. Por supuesto también puede usarse otra química de conexión.

Para minimizar las reacciones secundarias, puede bloquearse los grupos guanidino y amidino usando grupos protectores convencionales como, por ejemplo, grupos carbobenciloxi (CBZ), di-*t*-BOC, PMC, Pbf, N-NO₂ y similares.

- 45 Se realizan reacciones de acoplamiento mediante procedimientos conocidos de acoplamiento en disolventes como, por ejemplo, N,N-dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP), diclorometano (DCM) y/o agua. Reactantes de acoplamiento ejemplares comprenden hexafluorofosfato de O-Benzotriazoliloxitetrametiluronio (HATU), dicitclohexilcarbodiimida, bromuro de bromo-tris(pirrolidino)fosfonio (PiBroP), etc. Pueden estar contenidos otros reactivos como, por ejemplo, N,N-dimetilaminopiridina (DMAP), 4-pirrolidinopiridina, N-hidroxisuccinimida o N-hidroxibenzotriazol (HOBt).

- 50 Una molécula de soporte a base de un conjugado de ϵ -polilisina, tal como se describe en la publicación WO 2011/009539 A1, también puede prepararse a partir de la ϵ -polilisina. En este caso, típicamente se hace reaccionar ϵ -polilisina sintética o natural de una longitud de cadena uniforme o diferente, en solución, con los correspondientes compuestos que tienen grupos carboxilo. Para esto, primero pueden activarse, por ejemplo, los compuestos que tienen grupos carboxilo. Esto puede efectuarse, por ejemplo, mediante activación de uno o de varios de sus grupos carboxilo convirtiéndolos en ésteres activos o cloruros ácidos. A continuación, la conversión se efectúa con ϵ -polilisina, en cuyo caso la conjugación se efectúa preferiblemente con los grupos amino libres. De manera alternativa, uno o varios grupos carboxilo del compuesto que tiene grupos carboxilo pueden activarse con un

reactivo de acoplamiento como diciclohexilcarbodiimida (DCC) o HATU y reaccionar con la ϵ -pollisina, en cuyo caso la conjugación se efectúa preferiblemente con los grupos amino libres. Las condiciones de reacción para conversiones de este tipo son conocidas por el experto en la materia. Disolventes adecuados son, por ejemplo, agua, acetonitrilo, DMSO, DMF, dioxano, THF, metanol o mezclas de dos o más de los disolventes mencionados.

5 Los conjugados según la invención tienen la ventaja de que pueden suprimirse en gran medida los efectos secundarios sistémicos de sustancias activas para el tratamiento o la formación de imágenes del riñón ya que los conjugados hacen posible un transporte específico al riñón de sustancias protectoras del mismo. Las sustancias activas nefrotóxicas incluyen, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, gentamicina y ciclofosfamida; en estas sustancias la nefrotoxicidad es una limitante de la dosis o estas sustancias limitan la cantidad de ciclos de terapia.

10 En conexión con el tratamiento del riñón con sustancias nefrotóxicas, la administración de los conjugados según la invención (por ejemplo, mediante inyección a la corriente sanguínea o después de inyección subcutánea) antes, durante o después de la terapia permite una acumulación específica de las sustancias activas protectoras en el riñón. El paciente tratado con una sustancia nefrotóxica, por ejemplo, cisplatino, obtiene, por ejemplo, 30 minutos antes del inicio de la terapia una inyección del conjugado protector de riñón. El conjugado protector del riñón puede
15 en este caso tener lugar mediante una inyección sencilla o mediante infusión continua durante todo el período de administración de cisplatino, que habitualmente se extiende durante un período de una a dos horas.

Por lo tanto, también es objeto de la presente invención un conjugado según la invención, como se ha descrito antes, en calidad de medicamento tales como, principalmente, una composición terapéutica, principalmente para proteger el riñón frente a sustancias activas nefrotóxicas.

20 También es objeto de la presente invención un conjugado según la invención, como se ha descrito antes, para usar en la protección del riñón frente a sustancias activas nefrotóxicas.

En este contexto, el uso de una molécula de soporte, tal como se ha definido antes, es particularmente ventajoso ya que ésta es adecuada de manera extraordinariamente bien para focalización del riñón: en comparación con otras estructuras conocidas de bajo peso molecular, en la conjugación con la sustancia activa también se muestra una
25 muy buena acumulación en el riñón. La comparación con los péptidos descritos en la bibliografía que son captados selectivamente por los riñones (APASLIN y HITSLLS, los aminoácidos se indican con el código de una letra (Denby et al.: Molecular Therapi 15, 9, 2007, 1647-1654)), da lugar a que si bien, la mayoría de los péptidos presentan una selectividad hacia el riñón más o menos fuertemente pronunciada después de la aplicación intravenosa, no obstante, no en la conjugación con una sustancia activa. La utilidad farmacológica de las estructuras de péptido como sistema
30 de transporte para la protección especificada al objetivo de los riñones frente a sustancias nefrotóxicas surge, no obstante, solamente si estos péptidos conjuntamente con las sustancias activas conjugadas son captadas casi exclusivamente por los riñones, más precisamente por las células de tu los proximales. Solamente en este caso resulta una ventaja significativa frente a la administración sistémica de la sustancia activa.

35 Además, los conjugados según la invención permiten que, además de la administración intravenosa de péptidos/proteínas, descrita en la bibliografía, para el transporte de sustancia activa hacia los riñones, la administración subcutánea e intraperitoneal del conjugado de péptido-sustancia activa según la invención también pueda dirigirse exitosamente hacia los riñones.

La ruta de administración intraperitoneal y, especialmente, la subcutánea es ventajosa para el médico y el paciente para aplicar una sustancia activa potencial frente a la ruta intravenosa.

40 También es objeto de la presente invención un medicamento o una composición farmacéutica, principalmente una composición terapéutica o una composición que intensifica la formación de imágenes que contiene al menos un conjugado según la invención, como se ha descrito antes.

De acuerdo con la invención, el conjugado también puede estar presente en forma de sus sales y estereoisómeros farmacéuticamente utilizables, incluidas sus mezclas en todas las proporciones.

45 El uso de los conjugados según la invención para la preparación de una composición farmacéutica o de un medicamento, principalmente una preparación terapéutica también se encuentra de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la invención, la presente invención también puede referirse a un kit para la preparación de un medicamento o una composición farmacéutica, principalmente una composición terapéutica, que contiene al menos
50 un conjugado según la invención. Este conjugado puede hacerse reaccionar luego, por ejemplo, con un compuesto activo adecuado, dependiendo de la aplicación, para la preparación de una composición terapéutica.

La presente invención se refiere además a los conjugados según la invención y/o a las sales y estereoisómeros utilizables de los mismos, incluidas las mezclas de los mismos en todas las proporciones, y opcionalmente excipientes y/o adyuvantes

- como medicamento
- 55 • para usar como medicamento

- como sustancia activa o componente efectivo en un medicamento
- para uso para proteger el riñón frente a sustancias con efecto nefrotóxico
- así como, principalmente, como medicamento para proteger el riñón frente a sustancias con efecto nefrotóxico.

5 Una composición terapéutica, una composición terapéutica o un medicamento se componen por lo regular al menos de una sustancia activa (en este caso del conjugado según la invención con la sustancia activa enlazada) y uno o varios disolventes y/o excipientes adecuados que permiten la aplicación de la composición terapéutica.

10 Las composiciones farmacéuticas, fármacos y medicamentos pueden adaptarse para administración por medio de cualquier vía adecuada deseada, por ejemplo, por vía oral (incluida bucal y sublingual), rectal, nasal, tópica (incluida bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluida subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales formulaciones pueden prepararse mediante todos los métodos conocidos en el campo de la farmacia, por ejemplo, combinando la sustancia activa con el o los excipiente(s) o adyuvante(s).

15 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden administrarse como unidades separadas tales como, por ejemplo, cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos, espumas comestibles o alimentos en forma de espuma; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.

20 Por lo tanto, por ejemplo, en el caso de administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, el componente de sustancia activa puede combinarse con un excipiente oral, no tóxico e inerte farmacéuticamente inocuo tal como, por ejemplo, etanol, glicerina, agua, entre otros. Los polvos se preparan triturando el compuesto a un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un excipiente farmacéutico de una manera similar de modo que, por ejemplo, se encuentre presente un carbohidrato comestible tal como, por ejemplo, almidón o manitol. Igualmente pueden estar presentes un saborizante, preservante, agente de dispersión y colorantes.

25 Las cápsulas se preparan preparando una mezcla de polvo, tal como se describió antes, y llenando envolturas de gelatina moldeadas con la misma. Pueden agregarse agentes de deslizamiento y lubricantes como, por ejemplo, ácido silícico altamente disperso, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol en forma sólida a la mezcla de polvo antes de la operación de llenado. Igualmente pueden adicionarse desintegrantes o solubilizantes tales como, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio con el fin de mejorar la disponibilidad del medicamento después de haber ingerido la cápsula.

30 Además, si se desea o si es necesario, asimismo a la mezcla pueden incorporarse aglutinantes, lubricantes y desintegrantes, como también colorantes adecuados. Aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como, por ejemplo, glucosa o β -lactosa, edulcorantes hechos de maíz, gomas naturales y sintéticas tal como, por ejemplo, acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, entre otros. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, entre otros. Los desintegrantes, sin limitarse a estos, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma de xantano, entre otros. Los comprimidos se formulan preparando, por ejemplo, una mezcla de polvo, granulándola o prensando en seco, se adicionan un lubricante y un desintegrante y todo esto se comprime para formar comprimidos. Una mezcla de polvos se prepara mezclando el compuesto triturado de manera adecuada con un diluyente o una base, como se ha descrito antes, y opcionalmente con un aglutinante como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, un arginato, gelatina o polivinilpirrolidona, un retardante de disolución como, por ejemplo, parafina, un acelerante de absorción tal como, por ejemplo, una sal cuaternaria y/o un agente de absorción como, por ejemplo, bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla de polvo puede granularse humedeciéndola con un aglutinante como, por ejemplo, jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales de celulosa o poliméricos y prensándola a través de un tamiz. Como alternativa para la granulación, la mezcla de polvo puede hacerse correr a través de una máquina de comprimidos, en cuyo caso resultan grumos con forma no uniforme, los cuales se quiebran para formar gránulos. Los gránulos pueden lubricarse adicionando ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral para impedir que el comprimido se pegue a los moldes de colada. La mezcla engrasada se prensa luego para formar comprimidos. Los compuestos según la invención también pueden combinarse con un excipiente inerte de flujo libre y luego prensarse directamente para formar comprimidos sin llevar a cabo las etapas de granulación o prensando en seco. Pueden estar presente una capa protectora transparente u opaca compuesta de una capa de sello de goma laca, una capa de azúcar o material polimérico y una capa lustrosa hecha de cera. A estos recubrimientos pueden agregarse colorantes para poder identificar entre las diferentes unidades de dosificación.

55 Líquidos orales tales como, por ejemplo, soluciones, jarabes y elixires pueden prepararse en forma de unidades de dosificación para que una cantidad dada contenga una cantidad pre-especificada del compuesto. Los jarabes pueden prepararse disolviendo el compuesto en una solución acuosa con un sabor adecuado, mientras que los elixires se preparan usando un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones pueden formularse mediante dispersión del compuesto en un vehículo no tóxico. Igualmente pueden agregarse solubilizantes y emulsionantes tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietileno-sorbitol, conservantes,

aditivos saborizantes como, por ejemplo, aceite de pimienta o endulzantes naturales o sacarina u otros endulzantes artificiales, entre otros.

5 Las formulaciones de unidad de dosificación para administración oral pueden encapsularse en microcápsulas, si se desea. La formulación también puede prepararse de manera que la liberación se tienda o se retrase, por ejemplo, recubriendo o incrustando material particulado en polímeros, cera, entre otros.

Los conjugados según la invención también pueden administrarse en forma de sistemas de introducción de liposomas tales como, por ejemplo, vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Pueden formarse liposomas a partir de diversos fosfolípidos tales como, por ejemplo, colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

10 Los conjugados según la invención también pueden introducirse usando anticuerpos monoclonales como portadores individuales a los cuales se acoplan los conjugados. Los conjugados también pueden acoplarse con polímeros solubles como soportes de medicamento orientados. Tales polímeros pueden comprender polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietil-aspartamida-fenol o polietilenoóxido-polilisina, sustituidos con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables que son adecuados para lograr una liberación controlada de un medicamento, por ejemplo, polímero láctico, poli-ε-caprolactona, polímero ácido hidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polihidroxipiranos, policianoacrilatos y copolímeros en bloques reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

20 Formulaciones farmacéuticas adaptadas a la administración transdérmica pueden administrarse como apósitos independientes para contacto extendido, estrecho con la epidermis del receptor. Por lo tanto, por ejemplo, el ingrediente activo puede entregarse desde el apósito mediante iontoforesis, tal como se describe en términos generales en *Pharmaceutical Research*, 3(6), 318 (1986).

Compuestos farmacéuticos adecuados a la administración tópica pueden formularse en forma de ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, espráis, aerosoles o aceites.

25 Formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal pueden administrarse en forma de supositorios o enemas.

30 Formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal en las cuales la sustancia portadora es un sólido contienen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 20-50 micras, las cuales se administran de la manera en que se consume el tabaco rapé, es decir mediante inhalación rápida a través de las vías de la nariz desde un recipiente que contiene el polvo, sostenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas para administración en forma de spray nasal o gotas para nariz con un líquido en calidad de sustancia portadora comprenden soluciones de sustancia activa en agua o en aceite.

Formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración por inhalación comprenden polvos o nieblas en forma de partículas finas que pueden generarse mediante diversos tipos de dispensadores presurizados con aerosoles, nebulizadores o insufladores.

35 Formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles, acuosas y no acuosas, que contienen antioxidantes, reguladores de pH, bacteriostáticos y solutos, por medio de los cuales la formulación se hace isotónica con la sangre del receptor que va a tratarse; y suspensiones estériles, acuosas y no acuosas, que pueden contener medios de suspensión y espesantes. Las formulaciones pueden administrarse en recipientes de dosis única o de dosis múltiples, por ejemplo, viales y ampollas selladas y almacenarse en estado congelado en seco (liofilizado) de manera que solamente se necesite la adición del líquido portador estéril, por ejemplo, agua, para propósitos de inyección. Las soluciones y suspensiones para inyección que se preparan de acuerdo con la formulación pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Los conjugados según la invención se administran preferiblemente por vía parenteral.

45 Se entiende que las formulaciones también pueden contener otros agentes habituales en la técnica con respecto al tipo particular de formulación, en adición a los componentes particularmente mencionados antes; por lo tanto, por ejemplo, las formulaciones que son adecuadas para administración oral pueden contener saborizantes.

Una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado según la invención depende de una serie de factores que incluyen el tipo de sustancia activa acoplada, la edad y el peso del paciente, la condición exacta de la enfermedad que requiere tratamiento y su severidad, la naturaleza de la formulación y la vía de administración.

50 También es objeto de la presente invención un kit para la preparación de una composición farmacéutica, principalmente una composición que intensifica la imagen o una composición terapéutica que contienen al menos un conjugado según la invención. El conjugado según la invención pueden estar presente en forma disuelta en un disolvente en el kit (por ejemplo, un regulador acuoso de pH), o preferiblemente en forma de liofilizado.

55 Se ha encontrado que los conjugados según la invención ya después de un breve tiempo después de la aplicación se han acumulado específicamente, es decir exclusivamente o casi exclusivamente en el riñón. En el caso de la

administración intravenosa preferida de los conjugados según la invención, la acumulación en el riñón se observa después de sólo 5 minutos. Después de una hora, más del 30%, preferiblemente más del 50%, de modo particularmente preferido más de 70%, de modo muy particularmente preferido más de 80% de la dosis inyectada se localiza en el riñón (las indicaciones de % se basan en la medición de la radioactividad).

- 5 En estudios de distribución en el órgano con conjugados radio-etiquetados según la invención (por ejemplo, mediciones de PET u otras formaciones de imágenes no invasivas), los conjugados según la invención presentan normalmente una acumulación de al menos el doble, preferiblemente de al menos cinco veces, de modo particularmente preferido de al menos 10 veces en el riñón, en relación con el resto del cuerpo (sangre, corazón, pulmón, bazo, hígado, músculo, cerebro) una hora después de la aplicación. Esto significa que la señal que se correlaciona directamente con la cantidad de compuestos radio-etiquetados en el riñón es de al menos dos veces más fuerte que la suma de todas las señales juntas, obtenidas de la sangre, corazón, pulmón, bazo, hígado, músculo y cerebro.

- 15 Según la invención, la focalización del riñón significa el logro de una ingestión incrementada de la sustancia aplicada en el riñón en relación con el resto del cuerpo. En el caso de la focalización en el riñón con el conjugado según la invención, preferiblemente se logra al menos una acumulación de dos veces, preferiblemente de al menos cinco veces, de modo particularmente preferible de al menos 10 veces en el riñón, en relación con el resto del cuerpo (sangre, corazón, pulmón, bazo, hígado, músculo, cerebro) mediante administración de un conjugado según la invención. Estos valores se determinan por medio de estudios de distribución en órganos como conjugados radio-etiquetados según la invención (por ejemplo, mediciones de PET u otros procedimientos no invasivos de formación de imágenes). La acumulación en el riñón se efectúa, según el tipo de aplicación, normalmente después de 30 minutos hasta 8 horas.

Figuras:

- 25 La figura 1 muestra la influencia de la longitud de cadena en la liberación de sustancia activa para las estructuras MAG3-KKEEEEKKEEEEKKEEEE y MAG3-KKEEEEKKEEEEKKEEEEKKEEEEKKEEEEKKEEEE (conexión N-terminal de la sustancia activa -figura 1, parte superior) y KKEEEEKKEEEEKKEEEE-y y KKEEEEKKEEEEKKEEEEKKEEEEKKEEEEKKEEEE-y (conexión C-terminal de la sustancia activa -figura 1, parte inferior).

- 30 La figura 2 muestra la influencia de la longitud de cadena en la liberación de sustancia activa para la estructura y-KKEEEEKKEEEEKKEEEEK (conexión N-terminal de la sustancia activa -figura 2, parte inferior) y las estructuras KKEEEEKKEEEEKKEEEE-y y KKEEEEKKEEEEKKEEEEKKEEEEKKEEEEKKEEEE-y (conexión C-terminal de la sustancia activa - figura 2, parte superior).

La figura 3 compara la distribución en órganos del conjugado etiquetado con ^{125}I -y(KKEEEE)₃K dependiendo de la ruta de administración.

La figura 4 muestra la distribución cintigráfica del conjugado de sustancia activa ácido diacetilcafeico - (KKEEEE)₃K enlazado en el terminal N después de administración intravenosa en un ratón NMRI.

- 35 La figura 5 muestra la distribución cintigráfica de la molécula conjugada dos veces yKKK(DCA)EEEEKKEEEEKKK(DCA)EEEEK (CDA= ácido diacetilcafeico) después de la aplicación intravenosa en un ratón NMRI.

La figura 6 muestra la distribución cintigráfica de ^{125}I -y(KKKε(Liponsäure)EEE)₃K después de aplicación intravenosa en un ratón NMRI.

- 40 Incluso sin más detalles, se supone que una persona versada en la materia será capaz de utilizar la descripción anterior en el alcance más amplio. Las formas preferidas de realización y los ejemplos deben considerarse, por lo tanto, solamente como una divulgación descriptiva que no es limitante absolutamente de ninguna manera.

Ejemplos

1. Síntesis de materiales

- 45 1.1. Síntesis de los péptidos con grupos laterales ácidos y básicos

Síntesis de péptidos en fase sólida

- 50 Los péptidos se preparan en un sintetizador de péptidos completamente automático ABI 433A de la compañía Applied Biosystems GmbH (Carlsbad, CA, Estados Unidos de América) según la estrategia de Fmoc/tBu usando resina Tentagel S RAM (grado de carga: 0.24 mmol/g; Rapp Polymere, Tübingen, Alemania) en calidad de soporte polimérico. Aminoácidos Fmoc (Fmoc-AS-OH; Novabiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) con grupos protectores de cadena lateral ácidos-lábiles (por ejemplo, Arg(tBu), Asn(Trt), Asp(tBu), Cis(Trt), Gln(Trt), Glu(tBu), His(Trt), Lis(Boc), Ser(tBu), Thr(tBu), Tyr(tBu)) se usan como materias primas. El sitio de síntesis se compone de a) disociación del grupo protector de Fmoc con piperidina al 20% en NMP, b) etapas de lavado con NMP, c) acoplamiento: Fmoc-AS-OH/HBTU/DIPEA/resina de péptido 10/10/20/1, 8 minutos, d) etapas de lavado con NMP.

La efectividad de las disociaciones de se controlan por medio de mediciones de conductividad automatizadas. Los péptidos son disociados de la resina con TFA/H₂O/triisopropilsilano (95 : 2,5 : 2,5) (2 h a temperatura ambiente), precipitados en éter metil-ter.-butílico frío, separado por medio de centrifugación (4000 rpm, 5 min), secado al vacío y liofilizado a partir de MeCN/H₂O (1 : 1).

5 Purificación y caracterización de péptidos

La purificación del péptido disociados de la resina se efectúa por medio de HPLC semi-preparativa usando un equipo LaPrep (VWR GmbH, Darmstadt, Alemania). Como columna se usa una columna Waters XBridge BEH130 PREP C18 (5 µm, 19 x 150 mm) (velocidades de flujo: 9 - 20 ml/min; disolvente: TFA al 0,1 % en agua a TFA al 0,1 % en acetonitrilo). Para la separación se usa un gradiente de agua a acetonitrilo que se adapte a las propiedades físico químicas de los péptidos correspondientes. El péptido purificado se obtiene después de liofilización.

Para la caracterización, los péptidos preparados se analizan por medio de HPLC analítica (Agilent 1100) y HPLC-MS (Exactive, Thermo Fisher Scientific). El análisis con HPLC en condiciones estándar se efectúa con base en un gradiente lineal de 0,1 % de TFA en agua a 0,1 % de TFA en acetonitrilo en 5 min (condiciones: columna ChromolithR Performance RP-18e, 100 x 3 mm; velocidad de flujo: 2 ml/min, longitud de onda = 214 nm). Para la espectrometría de masas sirve un Agilent 1200 en calidad de sistema de HPLC (condiciones: columna Hypersil Gold C18, 0.21 x 200 mm, gradiente de 0,05 % de TFA en agua a 0,05 % de TFA en acetonitrilo en 30 min, velocidad de flujo: 200 µl/min, horno de columna: 60 °C, longitud de onda = 214 nm).

Yodación radioactiva de péptidos Iodierung von Peptiden

El etiquetado se efectúa usando una solución madre de 1 mM del péptido que va a etiquetarse en agua (eventualmente tiene que agregarse DMSO para una mejor solubilidad). Los péptidos que contienen tirosina se etiquetan con yodo-123, yodo-125 o yodo-131 por medio del procedimiento cloroamina T (Perquin-Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos de América). Para este propósito a 10 µl de la solución madre se agregan 20 µl de regulador de pH de fosfato (0,25 M, pH 7,4) y se adiciona la cantidad deseada de yodo reactivo. Para el etiquetado se agregan 5 µl de cloramina-T (2 mg/ml de H₂O). La reacción se efectúa durante 30 segundos y se termina a continuación con 10 µl de una solución saturada de metionina. Para separar el yodo libre y los productos secundarios, la mezcla de reacción se purifica mediante HPLC semi-preparativa (Chromolith RP-18e, 100 x 4.6 mm). Para separar se usa un gradiente lineal de 0,1 % de TFA en agua a 0,1 % TFA en acetonitrilo en 10 minutos (velocidad de flujo: 2 ml/min, absorción de UV a 214 nm, detección de γ). A continuación, el solvente se retira en un evaporador rotatorio y el péptido etiquetado se lleva al regulador de pH deseado.

30 1.2. Preparación de ácido lipoico -y(KKEEE)₃K

El péptido y(KKEEE)₃K se prepara tal como se describe en 1.1 por medio de síntesis en fase sólida de la estrategia de Fmoc/tBu usando los aminoácidos Fmoc-Lis(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH y Fmoc-Tyr(tBu)-OH (Novabiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en el sintetizador de péptidos. El péptido no se disocia primero de la resina, sino suspendido en NMP después de la desprotección final de Fmoc (por 100 mg de resina de péptido se usa 1 ml de NMP). (RS)-ácido lipoico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania; 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) se disuelven mientras tanto en NMP (1 ml por 100 mg), se mezclan con HBTU (4 equivalentes) y se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. La mezcla de reacción se adiciona a la resina de péptido, se mezcla con DIPEA (10 equivalentes) y se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 h. La resina se lava 5 x con NMP y 5 x con DCM y se seca al vacío durante aproximadamente 4 h. El conjugado ácido lipoico-péptido se disocia de la resina con TFA/tioanisol/EDT/anisol (90/5/3/2) durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente, se precipita en éter metil-ter.-butílico frío, se separa mediante centrifugación (4000 rpm, 5 min), se seca al vacío, se liofiliza a partir de MeCN/H₂O (1 : 1) y se purifica tal como se describe en el punto 1.1 Purificación y caracterización de los péptidos.

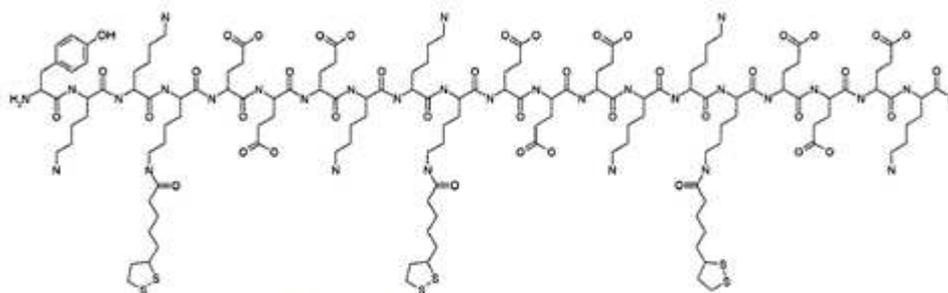
De manera análoga también pueden prepararse conjugados con otras sustancias activas.

45 1.3 Preparación de yKKK(ácido diacetilcafeico)(EEEK)₂K(ácido diacetilcafeico)EEEE

Para la conjugación péptica de ácido diacetilcafeico a una cadena lateral de lisina, el aminoácido Fmoc-Lis(Mmt)-OH se incorpora la secuencia de la columna vertebral del péptido. La resina de péptido preparada en el punto 1.1 semestre en este caso, antes de la disociación, durante 3 minutos con diclorometano (DCM)/triisopropilsilano/TFA (94 : 5 : 1) y se lava 5 x con DCM. Esta operación se repite 3 x. Para el acoplamiento a la cadena lateral desprotegida ortogonalmente de lisina, se disuelven 4 equivalentes del ácido diacetilcafeico en NMP, se mezcla con 4 equivalentes de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), 4 equivalentes de etilciano(hidroxiimino)acetato (Oxima Pure) y 10 equivalentes de diisopropiletilamina (DIPEA), se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min y, a continuación, se adiciona a la resina de péptido. La mezcla de reacción es agitada durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente, se lava 5 x con NMP y 5 x con DCM y se seca al vacío. El péptido funcionalizado se disocia de la resina tal como se describe en el punto 1.1 y se purifica.

De manera análoga también pueden prepararse conjugados con otras sustancias activas.

1.4 Preparación de y(KKKε(ácido lipoico)EEE)₃K



Peso molecular = 3188,95

Masa exacta = 3185

Fórmula molecular = C₁₃₈H₂₃₁N₃₁O₄₂S₁₆

Composición molecular = C 51,98 % H 7,30 % O 21,07 % S 6,03 %

1.4.1 Síntesis del bloque de construcción Fmoc-lisina(ácido ε-lipoico)-OH

- 5 N-Hidroxisuccinimida (1,15 g, 10 mmol), ácido α-lipoico (2,02 g, 9,8 mmol) y (1,92 g, 10 mmol) de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) se disuelven en 50 ml de DMF y se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 h. Después, el lote se mezcla con 60 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lava tres veces con 60 ml de agua destilada, tres veces con 60 ml de solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y una vez con solución saturada de cloruro de sodio. La fase de acetato de etilo se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra hasta secarse.

Rendimiento: 2,23 g (73,5 %)

- 10 Fmoc-Lis-OH (2,65 g, 7,2 mmol) se suspende en 110 ml de regulador de pH HEPES (pH= 7,4) y se mezcla con (2,14 g, 7,05 mmol) de éster activo de ácido lipoico (disuelto en 130 ml de acetona) y se agita a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 3 h de tiempo de reacción, la solución se ajusta a pH 7 por medio de una solución de NaOH de 0,1 N y se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 h. Después, el lote se lleva a pH 9 con NaOH de 0,1 N y se lava dos veces con aproximadamente 30 ml de acetato de etilo; a continuación, se ajusta a pH 3 con HCl de 1 N y se extrae tres veces con aproximadamente 40 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas unidas se lavan con solución saturada de cloruro de sodio, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran hasta secarse.

15 Pesaje de producto crudo: 4,14 g (103, 25 %)

- 20 La purificación del producto crudo se efectúa mediante cromatografía flash (fase estacionaria: gel de sílice 60, tamaño de grano: 15 - 40 μm, pre-empacado por la compañía Götec-Labortechnik GmbH, fase móvil: cloroformo, metanol (con 0,1% de HOAc), flujo: 60 ml/min, carga: aproximadamente 2 g, gradiente: de 100 % a 75 % de cloroformo en 18 minutos). Las fracciones de producto (Rt = 9,1 min) se combinan y se concentran hasta secarse.

Pesaje: 3,18 g (77 %)

1.4.2 Síntesis de péptidos en fase sólida

- 25 Los péptidos se preparan usando un sintetizador de la compañía Applied Biosystems GmbH (Carlsbad, CA, Estados Unidos de América), Modell 433A, usando la estrategia Fmoc/tBu. Las cadenas laterales de activas de los aminoácidos se protegen tal como sigue: Lis(Boc), Glu(tBu) y Tyr(tBu). La resina de amida Rink de la compañía Rapp-Polymere GmbH (grado de carga: 0,24 mmol/g) sirve como fase sólida. Los aminoácidos correspondientes, el bloque de construcción Fmoc-lisina (ácido ε-lipoico)-OH y HBTU se emplean en exceso cuádruple. Como disolvente se usa NMP y se utiliza piperidina para la respectiva disociación de Fmoc (20% en NMP).

30 El péptido protegido es disociado TFA:tioanisol:anisol = 90:8:2 (1 ml por 100 mg) de la resina (1 - 2 h), se precipita en MTBE, se centrifuga y se seca.

1.4.3 Yodación radioactiva de péptidos

- 35 Los péptidos que contienen tirosina se etiquetan con ¹²⁵yodo mediante el método de cloramina-T. Para el etiquetado se usa una solución madre de 1 mM en agua. Si se necesita, se agrega DMSO para una mejor solubilidad. Para esto, 10 μl de la solución madre se mezclan con 20 μl de regulador de pH de fosfato (0,25 M, pH 7,4) la cantidad deseada se agrega a yodo radiactivo. Para el etiquetado se agregan 5 μl de cloramina-T (2 mg/ml de H₂O). La reacción se efectúa durante 30 segundos y se detiene a continuación con 10 μl de una solución saturada de metionina.

Después del etiquetado se purifica el péptido por medio de HPLC semi-preparativa para retirar el yodo libre excesivo y otros productos secundarios. Se usan respectivamente 100 µl de la solución madre de 0,1 mM para la inyección. Antes de la inyección, la radioactividad se registra por medio de un contador Geiger.

De manera análoga también pueden prepararse conjugados con otras sustancias activas.

5 2. Ejemplos de aplicación

2.1. Estudios de distribución en órganos

Para determinar la farmacocinética, las moléculas etiquetadas radiactivamente del ejemplo 1.1 que van a investigar se se inyectan en ratones hembras NMRI por la vena de la cola (aproximadamente 100 µl por animal). Los animales (n = 3 por punto en el tiempo) se sacrifican a continuación en los correspondientes puntos de tiempo, se diseccionan y se cuantifica la distribución de la radioactividad en los órganos aislados (hígado, riñones, pulmones, bazo, intestino, cerebro, corazón, sangre,...) mediante un contador y (Berthold LB951G). Se determina la radioactividad medida por gramo de órgano/tejido con respecto a la dosis inyectada (ID) y se indica como % de ID/g.

Se investiga la influencia de la longitud de cadena en la liberación de sustancia activa. Se investigan las estructuras MAG3-KKEEEEKKEEEKKEEEK, MAG3-KKEEEEKKEEEKKEEEKKKEEEKKKEEEKKKEEEE y γ-KKEEEEKKEEEKKEEEK (conexión N-terminal de la sustancia activa - figura 1, parte superior y figura 2 parte inferior) y las estructuras KKEEEKKEEEKKKEEEE-γ y KKEEEKKKEEEKKKEEEKKKEEEKKKEEEKKKEEEE-γ (conexión C-terminal de la sustancia activa - figura 1, parte inferior y figura 2, parte superior) y en este caso representa tirosina; MAG3 representa un fragmento de péptido que forma un complejo con ^{99m}Tc.

El resultado se representa en las figuras 1 y 2 (ID/g representa aquí "Injected Dose per Gram of Tissue): la liberación de tirosina radio-etiquetada (como "sustancia activa") es muy influenciada, por una parte, por la longitud de cadena y, por otra parte, por el sitio de conexión de la "sustancia activa" (terminal C o N). Péptidos más largos conducen fundamentalmente a una liberación retrasada. Adicionalmente, la liberación de marcadores conectados con el terminal C (yodo-tirosina o también MAG3 con ^{99m}Tc) transcurre esencialmente más rápido que en la conexión con el terminal N. La etapa que determina la velocidad en la degradación del péptido es influenciada obviamente, ante todo, por carboxipeptidasas, las cuales degradan el péptido comenzando desde el terminal C.

Mediante la estructura molecular del péptido y el sitio de conexión de la sustancia activa (terminal C o N) puede ajustarse conscientemente la cinética de liberación de una sustancia activa.

2.2. Ruta de administración

En otros experimentos se investiga la ruta de administración. Para este propósito se dividen nueve ratones NMRI en tres grupos. Todos los animales reciben 10 mg/kg de peso corporal de un conjugado de D-tirosina enlazado con (KKEEEE)₃K en el terminal N. Una parte del conjugado es etiquetada por medio del método de cloramina-T en la D-tirosina con 131yodo. El conjugado etiquetado se administra por vía intravenosa al grupo 1, por vía subcutánea al grupo 2 y por vía intraperitoneal al grupo 3. El conjugado se disuelve en este caso en 100 µl de regulador de pH PBS. En diferentes momentos (40, 60, 120 y 240 minutos) se realizan registros de SPECT de los animales del grupo respectivo. Los resultados de esta serie experimental se representan en la figura 3. Además de la administración intravenosa de péptidos/proteínas, descrita en la bibliografía para transporte de sustancia activa hacia los riñones, la administración subcutánea e intraperitoneal de los péptidos o de conjugados de péptidos/sustancia activa según la invención también puede dirigirse exitosamente a los riñones.

2.3. Distribución cintigráfica de conjugados de ácido diacetilcafeico

En otros experimentos, la sustancia activa potencial ácido diacetilcafeico (DCA) se enlaza tanto en el terminal N, como también varias veces a las cadenas laterales de lisina de la columna vertebral del péptido. La preparación del conjugado N-terminal con γ(KKEEEE)₃K se efectúa de manera análoga como se ha descrito en el punto 1.2; la preparación de la molécula doblemente conjugada (estructura: γKKK(DCA)EEEEKKEEEKKK(DCA)EEEEK) como se ha descrito en el punto 1.3. Se investiga la selectividad hacia el riñón de los conjugados de péptido-sustancia activa obtenidos de esta manera después de etiquetar por medio de yodo-125 y de aplicar por vía intravenosa en el modelo animal.

Resultado (véanse las figuras 4 y 5): los conjugados de péptidos/sustancia activa preparados retienen su alta especificidad hacia el riñón, tanto después del enlazamiento N-terminal de ácido diacetilcafeico (figura 4), como también en caso de enlazamiento doble de ácido diacetilcafeico en diferentes cadenas laterales de lisina de la columna vertebral del péptido (figura 5).

2.4. Protección del riñón

En un estudio preclínico se trataron ratones BALB/c con doxorubicina. Cada animal experimental recibe una dosis de 11 mg/kg de peso corporal. A un grupo de control se administra solución salina isotónica. Los animales tratados con doxorubicina se dividen en varios grupos. El grupo B recibe una inyección de ácido lipoico libre en forma de su sal de potasio en adición a la doxorubicina inyectada. En el caso del grupo C, el conjugado de ácido lipoico/péptido

ES 2 697 250 T3

LA-(KKEEE)₃(ácido lipoico N-terminal a (Lis-Lis-Glu-Glu-Glu)₃) es administrado mediante inyección, en lugar del ácido lipoico libre.

	Control	Doxorrubicina	Conjugado de doxorrubicina + ácido lipoico	Doxorrubicina + ácido lipoico
Cantidad de animales	6	6	6 por dosis; en el caso de tres dosis = 18 animales	6 por dosis; en el caso de tres dosis = 18 animales
Tratamiento	0,9 % de solución salina	Doxorrubicina-clorhidrato diluida en 0,9% de solución salina por 11 mg/kg de peso corporal	Doxorrubicina-clorhidrato diluida en 0,9% de solución salina por 11 mg/kg de peso corporal	Doxorrubicina-clorhidrato diluida en 0,9% de solución salina por 11 mg/kg de peso corporal

2.5 Distribución cintigráfica de conjugados de ácido lipoico según el ejemplo 1.4

- 5 En otros experimentos, la sustancia activa potencial ácido lipoico se enlaza mediante las cadenas laterales de lisina de la columna vertebral del péptido. La preparación del conjugado γ (KKK ϵ (ácido lipoico)EEE)₃K se efectúa tal como se describe en el ejemplo 1.4. La selectividad por los riñones del conjugado de péptido-sustancia activa obtenido de esta manera es investigada después de etiquetar con yodo-125 y de aplicar por vía intravenosa en el ratón modelo animal.
- 10 Resultado (véase figura 6): el conjugado de péptido-sustancia activa preparado presenta una alta especificidad por el riñón.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Conjugado que contiene al menos una molécula soporte selectiva para el riñón y al menos una sustancia activa que presenta un efecto protector para el riñón frente a sustancias con efecto nefrotóxico, caracterizado porque la al menos una molécula soporte selectiva para el riñón es un péptido que se compone en más de 50 % (con respecto a la cantidad de las unidades de aminoácidos) de secciones de secuencia seleccionadas del grupo que comprende - (KKEEE)-, -(RREEE)-, - (KKEE)-, -(KKKEEE)- y -(KKKEE)-
- y en cuyo caso
- el péptido se compone en al menos 80 % (con respecto a la cantidad de las unidades de aminoácidos) de los aminoácidos K y E o R y E,
- 10 - y el péptido contiene 3 a 5 secciones de secuencia como se han definido antes.
2. Conjugado según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido representa un péptido seleccionado del grupo que comprende (RREEE)₃R, (KKEE)₅K, (KKKEE)₃K, (KKKEEE)₃K y (KKEEE)₃K.
- 15 3. Conjugado según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la al menos una sustancia activa se selecciona de antioxidantes, inhibidores de apoptosis, sustancias activas con influencia en el ciclo celular, sustancias activas que activan los mecanismos de reparación de las células, inhibidores de receptor y combinaciones de los mismos.
4. Conjugado según la reivindicación 3, caracterizado porque la al menos una sustancia activa es un antioxidante y/o un inhibidor de apoptosis.
- 20 5. Conjugado según la reivindicación 4, caracterizado porque la sustancia activa se selecciona de ácido lipoico, resveratrol, ácido cafeico, luteolina, quercetina, rutín, cianidina, xantohumol, ácido ascórbico, ácido nicotínico, amifostina, aliina, tioleá, tocoferoles, carotenoides, butilhidroxitolueno (BHT), pifithrin- μ , pifithrin- α , MDL 28170 y/o NS3694.
6. Procedimiento para la preparación de un conjugado según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque con la molécula soporte se conjuga una sustancia activa opcionalmente activada que presenta un efecto protector en los riñones frente a sustancias nefrotóxicas.
- 25 7. Conjugado según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5 para usar como medicamentos.
8. Conjugado según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5 para usar para la protección del riñón frente a sustancias con efecto nefrotóxico.
9. Medicamento que contiene al menos un conjugado según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5.

Fig. 1

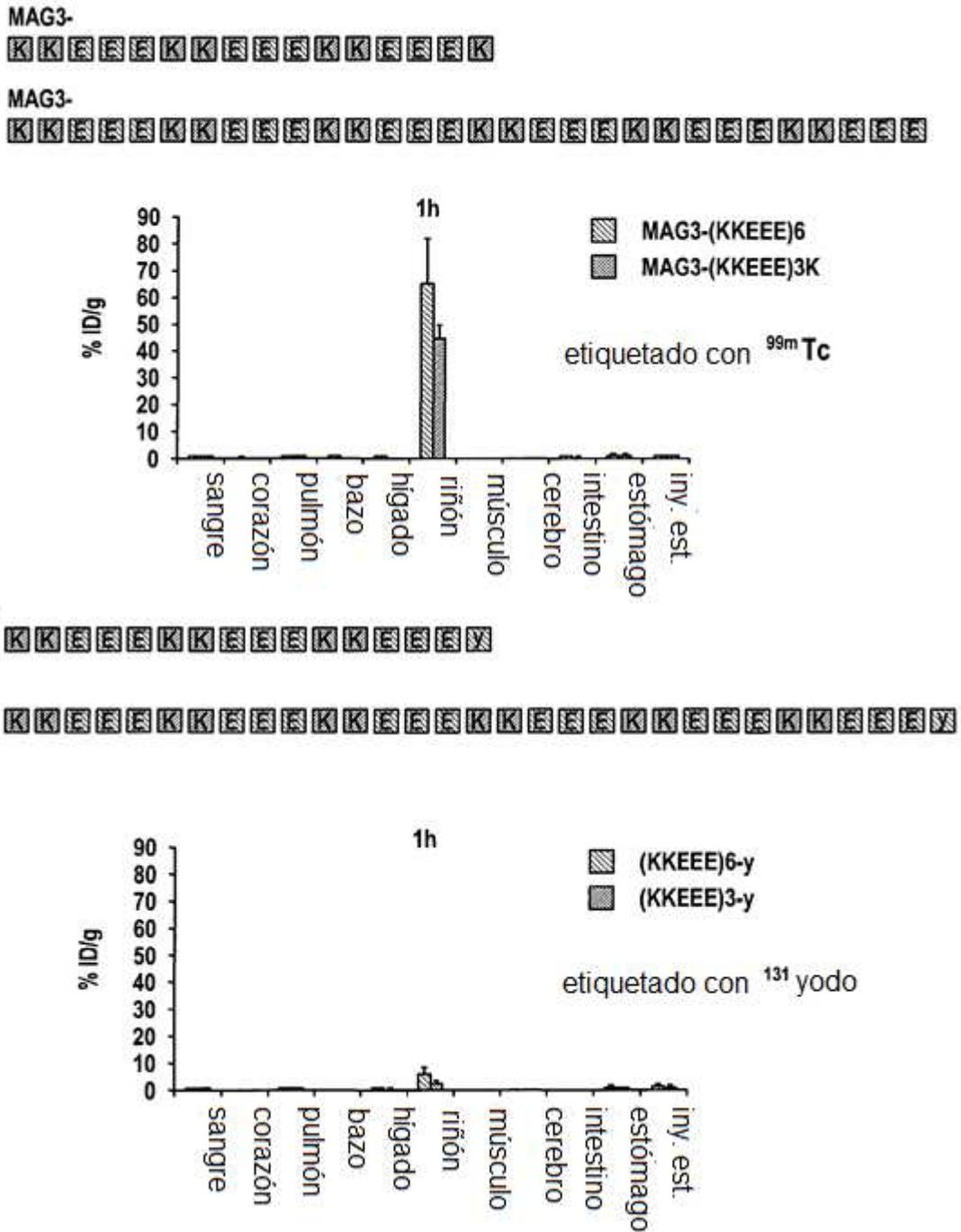


Fig. 2

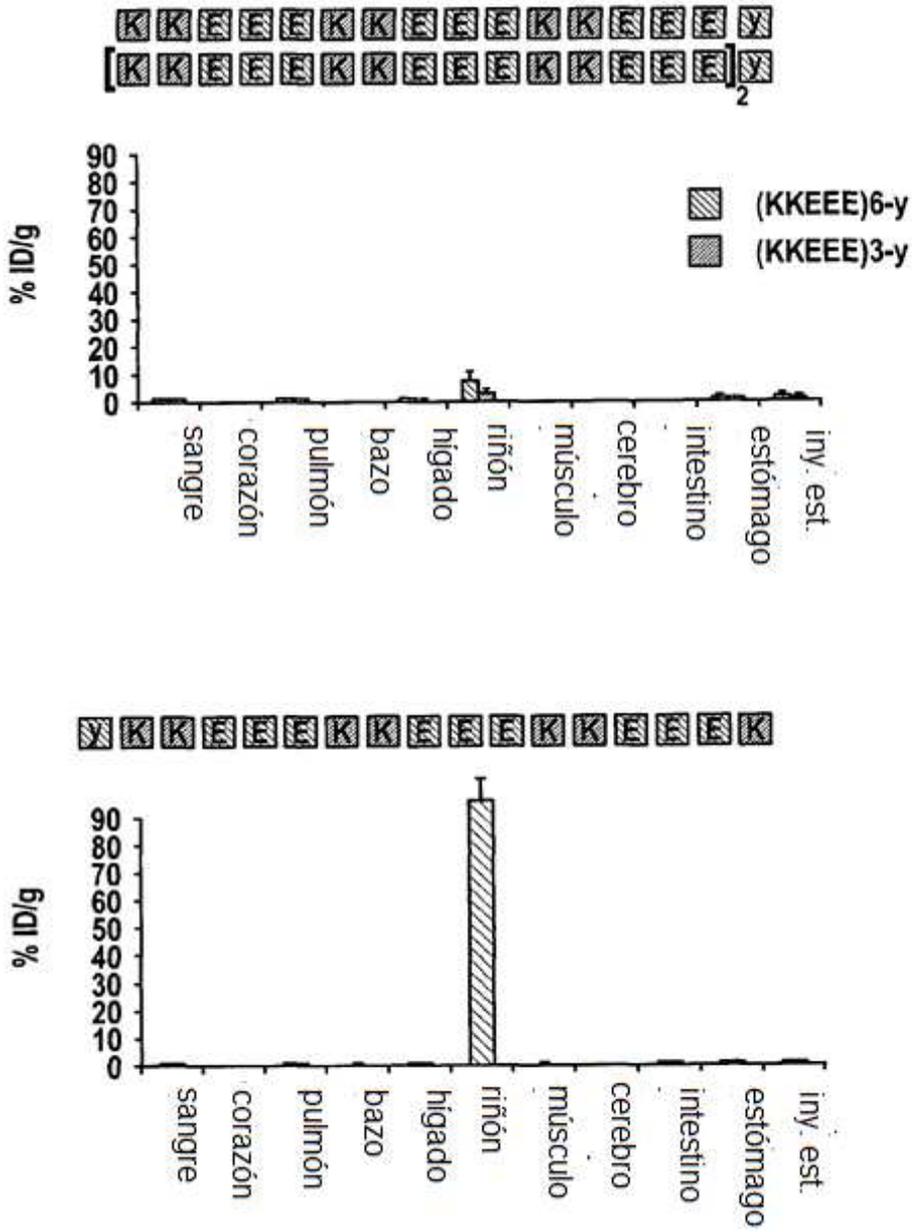


Fig. 3

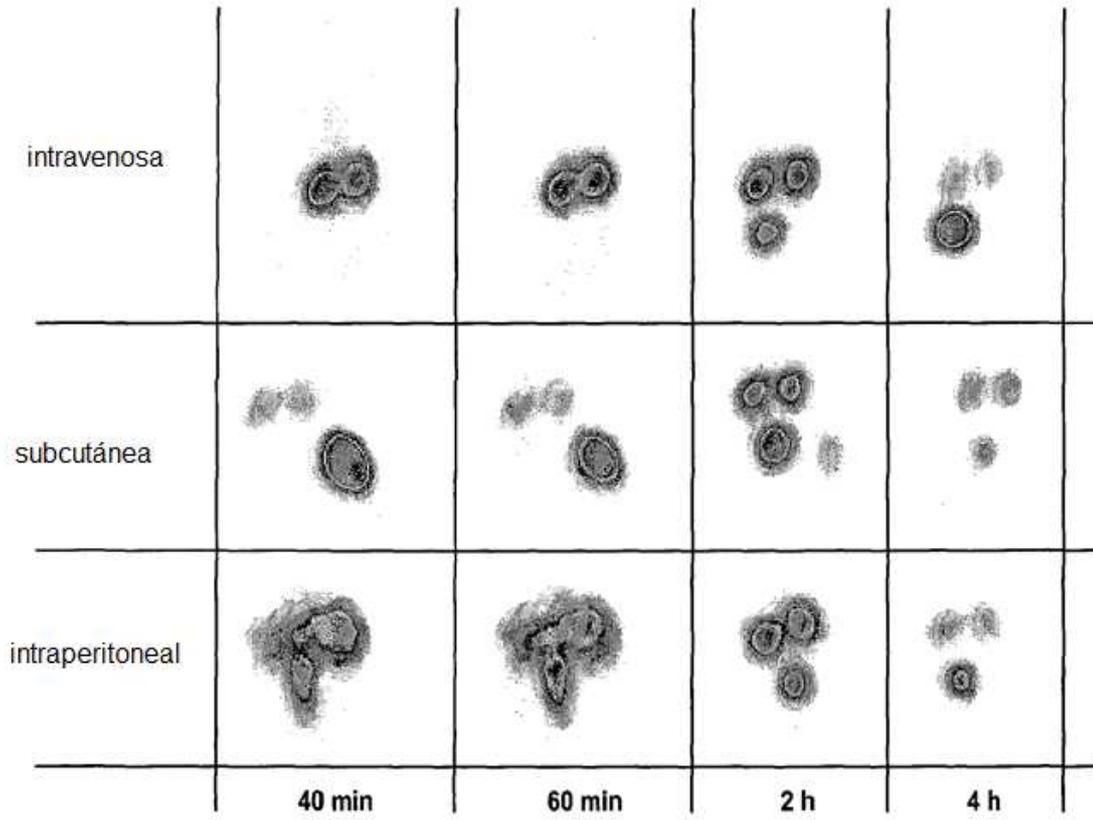


Fig. 4

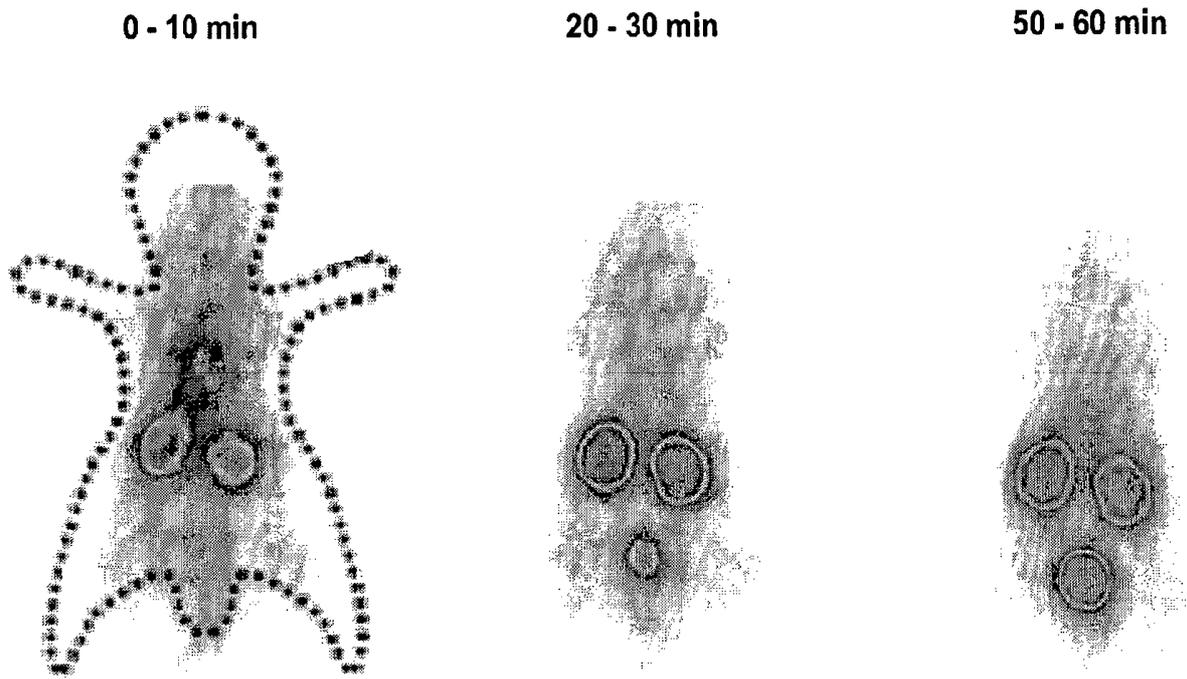


Fig. 5

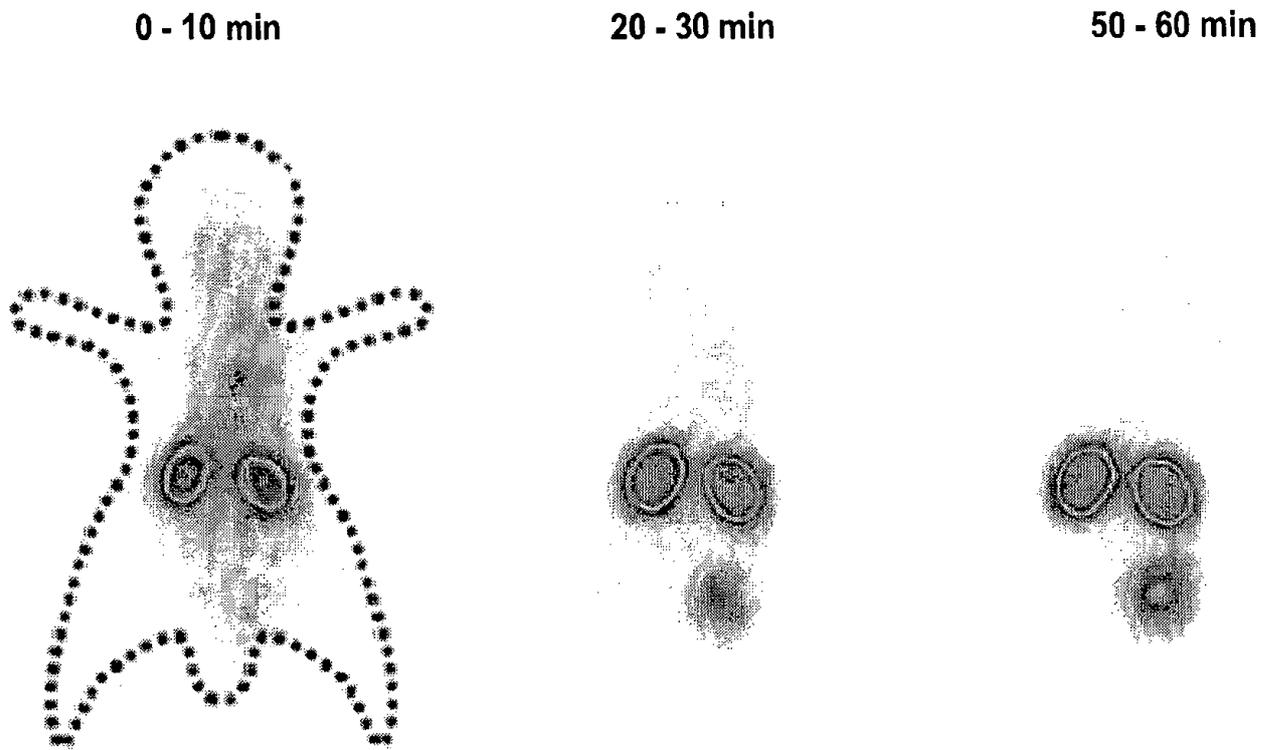
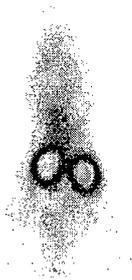


Fig. 6

0 - 10 min



10 - 20 min



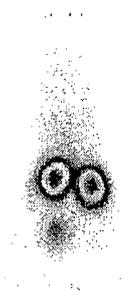
20 - 30 min



30 - 40 min



40 - 50 min



50 - 60 min



2 h

