

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 890**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2014 PCT/DK2014/050402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15078477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2014 E 14821058 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3074032**

54 Título: **Derivados de ácidos grasos de inhibidores diméricos de la PSD-95**

30 Prioridad:

01.12.2013 DK 201370735

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

17.06.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF COPENHAGEN (100.0%)
Nørregade 10
1165 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**STRØMGAARD, KRISTIAN;
BACH, ANDERS y
NISSEN, KLAUS BERTRAM**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 716 890 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 de ácidos grasos de inhibidores diméricos de la PSD-95

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a compuestos capaces de unirse a los dominios PDZ de PSD-95 y su uso médico como inhibidores de la interacción proteína-proteína mediada por PSD-95.

10 **Antecedentes**

La proteína 95 de densidad postsináptica (PSD-95) es una proteína codificada en los seres humanos por el gen DLG4 (homólogo 4 de discos grandes). PSD-95 es un miembro de la familia de la guanilato quinasa asociada a la membrana (MAGUK) y junto con PSD-93 reclutada en los mismos receptores de NMDA y grupos de canales de potasio.

15

PSD-95 es el miembro mejor estudiado de la familia MAGUK de las proteínas que contienen el dominio PDZ. Como todas las proteínas de la familia MAGUK, incluye tres dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio similar a guanilato quinasa (GK) conectados por regiones enlazadoras. Se encuentra casi exclusivamente en la densidad postsináptica de las neuronas y participa en el anclaje de las proteínas sinápticas. Sus parejas de unión directa e indirecta incluyen los receptores de neuroigina, óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores de AMPA y los canales de potasio.

20

El dominio PDZ es un dominio estructural común de 80-90 aminoácidos que se encuentra predominantemente en proteínas de andamiaje de diversos organismos, incluidos los seres humanos. PDZ es un acrónimo de las tres primeras letras de proteínas: PSD-95, supresor de tumores de disco grande de *Drosophila* (Dlg1) y proteína 1 de *Zonula occludens* (ZO-1), que fueron las primeras proteínas descubiertas que comprenden el dominio.

25

En general, los dominios PDZ interactúan con otras proteínas mediante la unión a su extremo C-terminal. Esto se logra mediante el aumento de la película β , lo que significa que la película β en el dominio PDZ se extiende mediante la adición de la cola C-terminal de la proteína de pareja de unión y, formando así, una estructura similar a la película β extendida.

30

Los dominios PDZ se encuentran en un amplio intervalo de proteínas tanto en los reinos eucarióticos como en los eubacterianos, mientras que hay muy pocos ejemplos de la proteína en arqueas. Los tres dominios de PDZ de PSD-95, PDZ1-3, unen los ligandos peptídicos con una secuencia consenso similar, tales como Ser/Thr-X-Val/Ile/Leu-COOH.

35

La base estructural para la interacción de los dominios PDZ con péptidos C-terminales se aclaró primero mediante una estructura cristalográfica de rayos X de PDZ3 de PSD-95 complejada con un ligando peptídico nativo, CRIPT (secuencia:YKQTSV). PDZ3 contiene seis cadenas β antiparalelas (β A- β F) y dos hélices α (α A y α B), y el ligando peptídico C-terminal se une a una ranura entre la cadena β B y la hélice α B. Dos residuos en el ligando peptídico se consideran particularmente importantes para la afinidad y especificidad, el primer (P^0) y el tercer (P^{-2}) aminoácidos se cuentan desde el extremo C-terminal. La cadena lateral del aminoácido en la posición P^0 se proyecta en un bolsillo hidrófobo y se requiere un aminoácido con cadenas laterales alifáticas (Val, Ile y Leu). En la estructura cristalina de rayos X PDZ3-CRIPT, el oxígeno de hidróxilo de Ser o Thr (P^{-2}) forma un enlace de hidrógeno con el nitrógeno de una cadena lateral de imidazol de His372, y se ha demostrado que esta interacción es un determinante importante para la afinidad de la interacción de dominio/ligando de PDZ. Un motivo Gly-Leu-Gly-Phe conservado (posición 322-325 en PDZ3) y un residuo cargado positivamente (Arg318 en PSD-95 PDZ3) de dominios PDZ median la unión al grupo carboxilato C-terminal.

45

Los dominios PDZ1 y PDZ2 de PSD-95 interactúan con varias proteínas, incluida la unión simultánea del tipo NMDA de receptores de glutamato ionotrópicos y el óxido nítrico (NO) que produce la enzima nNOS. Los receptores de NMDA son los principales mediadores de la excitotoxicidad, es decir, la neurotoxicidad mediada por glutamato, que está implicada en enfermedades neurodegenerativas y lesiones cerebrales agudas, y aunque los antagonistas del receptor de NMDA reducen eficazmente la excitotoxicidad al prevenir el flujo de iones mediado por glutamato, también impiden procesos fisiológicos importantes. Por ende, los antagonistas del receptor de NMDA han fracasado en los ensayos clínicos para, por ejemplo, un accidente cerebrovascular debido a la baja tolerancia y la falta de eficacia. En su lugar, se puede obtener una inhibición específica de la excitotoxicidad al perturbar el complejo receptor nNOS/PSD-95/NMDA intracelular usando inhibidores de PSD-95.

55

60

La PSD-95 se une simultáneamente al receptor de NMDA, principalmente a las subunidades GluN2A y GluN2B, y

nNOS a través de PDZ1 y PDZ2, respectivamente. La activación del receptor de NMDA causa el influjo de iones de calcio, que activa nNOS, lo que conduce a la generación de NO. Por lo tanto, PSD-95 media una asociación específica entre la activación del receptor de NMDA y la producción de NO, que puede ser perjudicial para las células si se prolonga durante un período más largo, y es un facilitador clave de la neurotoxicidad mediada por glutamato. La inhibición del complejo ternario de la interacción del receptor nNOS/PSD-95/NMDA dirigiendo PSD-95 es conocida por prevenir el daño cerebral isquémico en ratones, al alterar el enlace funcional entre la entrada de iones de calcio y la producción de NO, mientras que la función fisiológica, tal como las vías de señalización de flujo iónico y pro-supervivencia del receptor de NMDA permanecen intactas. El documento WO 2010/004003 divulga un concepto de la inhibición de PSD-95 por ligandos peptídicos diméricos unidos por un enlazador de polietilenglicol (PEG). Estos dímeros se unen simultáneamente a los dominios PDZ1 y PDZ2 de PSD-95.

Lim y col. (Journal of Controlled Release, 2013, 170, 2, 219-225) se refieren a la conjugación de ácidos grasos con pequeños péptidos terapéuticos para prolongar la semivida en suero, y divulgan la conjugación de ácidos grasos específica del sitio a un sitio permisivo de una proteína, usando cicloadición de azidas a alquinos catalizada por cobre, mediante la unión de un derivado de ácidos grasos a p-etilfenilalanina incorporada en una proteína que utiliza un par genomanipulado de ARNt de levadura/aminoacil-ARNt sintetasa.

Los ligandos diméricos que se dirigen a la PSD-95 están bajo evaluación preclínica como tratamiento para el dolor crónico (Andreasen y col., Neuropharmacol, 2013, 67, 193-200; Bach y col., PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322). Sin embargo, los péptidos terapéuticos son generalmente susceptibles a la eliminación de la sangre y la degradación por el aclaramiento renal y el metabolismo hepático. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar las propiedades farmacocinéticas y, de este modo, aumentar la estabilidad y la semivida de los ligandos peptídicos diméricos.

Resumen de la divulgación

Con el fin de abordar el problema establecido de proporcionar propiedades farmacocinéticas mejoradas y un aumento en la estabilidad in vivo de ligandos peptídicos diméricos de PSD-95, la presente divulgación describe una nueva clase de compuestos donde dos ligandos peptídicos están enlazados por un enlazador, tal como enlazador MPEG, donde uno o más ácidos grasos o derivados de ácidos grasos se han conjugado directamente con el enlazador MPEG o mediante un enlazador adicional.

Por lo tanto, los presentes inventores han desarrollado derivados de ligandos de PSD-95 diméricos que tienen semividas en plasma in vitro mejoradas en comparación con compuestos sin ácidos grasos unidos, por ejemplo, los compuestos divulgados en el documento WO2010/004003. Además, los compuestos muestran un mayor tiempo de residencia en un depósito subcutáneo tras la administración subcutánea.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un compuesto que comprende un primer péptido (P_1) y un segundo péptido (P_2), donde P_1 y P_2 comprenden individualmente al menos dos residuos de aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos, y donde P_1 y P_2 se conjugan a un primer enlazador L_1 a través de sus extremos N-terminales respectivos, y donde L_1 comprende polietilenglicol (PEG), donde al menos un átomo de oxígeno de dicho PEG está sustituido con un átomo de nitrógeno para dar MPEG, y donde un resto de unión a albúmina está enlazado al átomo de nitrógeno de MPEG mediante un enlace amida, o a través de un enlazador opcional L_2 .

Se ha demostrado que los compuestos de la presente divulgación se unen a PDZ1-2 de PSD-95 cuando se eligen P_1 y P_2 como se define en la presente memoria. Como PSD-95 es un objetivo importante para la terapéutica, la presente divulgación, en un aspecto, se refiere al compuesto como se define en la presente memoria para su uso como un medicamento.

Más específicamente, los compuestos de la divulgación, se pueden usar, en un aspecto, para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad relacionada excitotóxica, o para la profilaxis y/o el tratamiento del dolor.

Los compuestos de la presente divulgación se pueden sintetizar esquemáticamente mediante un procedimiento que comprende las etapas que consisten en:

- a) preparar un enlazador diácido de Ns-MPEG,
- b) preparar un péptido utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida a base de Fmoc,
- c) dimerizar el péptido Fmoc desprotegido con el enlazador diácido de Ns-MPEG,
- d) acoplar un ácido graso al conjugado de enlazador-dímero, opcionalmente a través de un enlazador intermedio, tal como un enlazador de aminoácidos (L_2).

Descripción de los dibujos

Figura 1: Estructura de los ligandos de referencia, UCCB01-125 y UCCB01-144. Las letras mayúsculas indican L-aminoácidos, a excepción de "N" (nitrógeno), "O" (oxígeno).

5 **Figura 2:** Afinidad por HSA de ligandos diméricos enlazados a FA (**1-12**), UCCB01-125 y UCCB01-144. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n = 3.

Figura 3: Afinidad a PSD-95 PDZ1-2 de ligandos diméricos enlazados a FA (**1-12**), UCCB01-125 y UCCB01-144 según lo determinado por FP. A) Medido en TBS; B) Medido en TBS + HSA; C) Medido en TBS + HSA corregido para fu. Los
10 datos se muestran como la media \pm SEM, n = 3.

Figura 4: Estabilidad plasmática *in vitro* de compuestos (UCCB01-125, **1**, **4**, **7**, **13**). Las semividas calculadas son: UCCB01-125: 1,7 h; **1**: 23,6 h; **4**, **7** y **13**: > 24 h.

15 **Figura 5:** Perfiles de plasma de ligandos diméricos UCCB01-125 (dos dosis) y el compuesto **1**, **4**, **7** y **13** después de la administración s.c. en ratas.

Figura 6: Síntesis de ligandos diméricos enlazados a FA (**1-12**). Las condiciones de reacción de la síntesis ilustradas en el esquema 1 de esta figura fueron como se indica: (a) Fmoc-GABA-OH/Fmoc-(L)-Glu-OtBu/Fmoc-5-Ava, HATU, colidina, DMF (1 h x 2), después piperidina al 20 % en DMF; (b) FA1/FA2/FA3/FA4, HBTU, DIPEA, DMF/DCM, 45 min, después TFA/TIPS/H₂O (90/5/5); (c) LiOH 0,5 M, H₂O/ACN (75/25), 30 min, después TFA a pH < 2. El triángulo indica que E y T son cadenas laterales protegidas (terc-butilo).
20

Figura 7: Mono saponificación de éster dimetilico de octadecandioato. Condiciones de reacción: (a) NaOH (1 eq.), MeOH, 45 °C, O/N.
25

Descripción detallada de la divulgación

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no se encuentre dentro del
30 alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

I. Definiciones

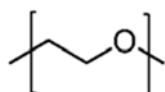
Enlace amida: El término "enlace amida", como se usa en la presente memoria, es un enlace químico formado por una reacción entre un ácido carboxílico y una amina (y la eliminación concomitante de agua). Cuando la reacción se produce entre dos residuos de aminoácidos, el enlace formado como resultado de la reacción se conoce como un enlace peptídico (enlace de péptidos).
35

Que comprende: El término "que comprende", como se usa en la presente memoria debe entenderse de manera inclusiva. Por lo tanto, a modo de ejemplo, una composición que comprende el compuesto X, puede comprender el compuesto X y opcionalmente compuestos adicionales.
40

Dímero: El término dímero, como se usa en la presente memoria, se refiere a dos restos químicos idénticos o no idénticos asociados por interacción química o física. A modo de ejemplo, el dímero puede ser un homodímero, tal como dos péptidos idénticos enlazados por un enlazador. El dímero también puede ser un heterodímero, tal como dos péptidos diferentes enlazados por un enlazador. Un ejemplo de un dímero es el inhibidor de PSD-95 de la presente divulgación, que es un compuesto que comprende dos péptidos o análogos de péptidos, que están enlazados covalentemente por medio de un enlazador, donde los péptidos o análogos de péptidos son capaces de unirse a, o interactuar con, PDZ1 y PDZ2 de PSD-95 simultáneamente.
45

Dipéptido: El término "dipéptido", como se usa en la presente memoria, se refiere a dos aminoácidos naturales o no naturales enlazados por un enlace peptídico.
50

Resto de etilenglicol: El término "resto de etilenglicol", como se usa en la presente memoria, se refiere a la unidad estructural que constituye un enlazador PEG o MPEG. Otro nombre de un "resto etilenglicol" es "oxietileno", y la fórmula química de la unidad monomérica es:



Ácido graso: El término ácido graso (abreviado FA), como se usa en la presente memoria se refiere normalmente a un ácido carboxílico con una cadena de carbono alifática larga, que puede ser saturado o insaturado. El ácido graso puede seleccionarse de entre ácidos grasos de cadena corta (SCFA), ácidos grasos de cadena media (MCFA), ácidos grasos de cadena larga (LCFA) y ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA). Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) son ácidos grasos con colas alifáticas de menos de seis carbonos (es decir, ácido butírico). Los ácidos grasos de cadena media (AGCM) son ácidos grasos con colas alifáticas de 6-12 carbonos, que pueden formar triglicéridos de cadena media. Los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) son ácidos grasos con colas alifáticas de 13 a 21 carbonos. Los ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) son ácidos grasos con colas alifáticas de más de 22 carbonos. El ácido graso de la presente divulgación puede ser cualquier ácido graso o derivado de ácido graso adecuado conocido por los expertos en la técnica.

Enlazador: El término "enlazador", como se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más átomos que forman una conexión de una entidad química a otra. A modo de ejemplo, el "primer enlazador" referido en la presente memoria, es un PEG o MPEG, que une los dos péptidos de unión al dominio PDZ formando un enlace a cada uno de sus extremos N-terminales.

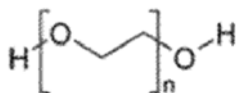
Aminoácidos no proteinogénicos: Los aminoácidos no proteinogénicos también conocidos como aminoácidos no codificados, no estándares o no naturales, son los aminoácidos que no están codificados por el código genético. Una lista no exhaustiva de aminoácidos no proteinogénicos incluye ácido α -amino-n-butírico, norvalina, norleucina, isoleucina, aloisoleucina, terc-leucina, ácido α -amino-n-heptanoico, ácido pipercolico, ácido α , β -diaminopropiónico, ácido α , γ -diaminobutírico, ornitina, alotreonina, homocisteína, homoserina, β -alanina, β -amino-n-Ácido butírico, ácido β -aminoisobutírico, ácido γ -aminobutírico, ácido α -aminoisobutírico, isovalina, sarcosina, N-etilglicina, N-propilglicina, N-isopropilglicina, N-metillanina, N-etillanina, N-etil-metil β -alanina, N-etil β -alanina, isoserina y ácido α -hidroxi- γ -aminobutírico.

MPEG: El término MPEG, como se usa en la presente memoria, es un derivado de enlazador de un enlazador PEG, pero cuando uno o más de los átomos de oxígeno de la cadena principal se reemplaza con un átomo de nitrógeno.

Enlazador diácido Ns-MPEG: El "enlazador diácido Ns-MPEG" es la estructura donde un enlazador MPEG está protegido en el nitrógeno con un grupo de protección orto-nitrobenzenosulfonilo (Ns) en el nitrógeno del enlazador, y donde los extremos del enlazador MPEG comprenden ácidos carboxílicos. Este reactivo químico o bloque de construcción se utiliza para dimerizar los dos restos peptídicos, P₁ y P₂.

PDZ: El término "PDZ", como se usa en la presente memoria, se refiere a la proteína 95 de densidad postsináptica (PSD-95), supresor de tumores de discos grandes de homólogo de *Drosophila* (DlgA), proteína 1 de *Zonula occludens* (zo-1).

PEG: El término "PEG", como se usa en la presente memoria, se refiere a un polímero del resto de etilenglicol discutido en la presente memoria anteriormente. PEG tiene la fórmula química C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}, y la estructura de repetición es:



donde, por ejemplo, 12 restos de PEG, o PEG12, corresponden a un polímero de 12 restos de etilenglicol.

Perfil farmacocinético: El término "perfil farmacocinético", como se usa en la presente memoria, se refiere a las características in vivo de la absorción en el torrente sanguíneo, la distribución en tejidos, la metabolización y la excreción de los compuestos descritos en la presente memoria. Un ejemplo de un parámetro que se incluye en el perfil farmacocinético es la semivida en plasma medio in vitro, que modela la metabolización de los compuestos por las proteasas plasmáticas.

Aminoácidos proteinogénicos: Los aminoácidos proteinogénicos, también conocidos como aminoácidos naturales, incluyen alanina, cisteína, selenocisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, pirrolisina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano y tirosina.

PSD-95: El término "PSD-95", como se usa en la presente memoria, se refiere a la proteína 95 de densidad postsináptica.

Inhibidor de PSD-95: El término "inhibidor de PSD-95", como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que se une a PDZ1, PDZ2, o tanto a PDZ1 como a PDZ2 de PSD-95 e inhibe las interacciones proteína-proteína facilitadas por estos dominios de PDZ en una célula. Un ejemplo de una interacción que es inhibida por un inhibidor de PSD-95 es la formación de un complejo ternario entre nNOS, PSD-95 y el receptor de NMDA.

II. Compuestos diméricos con una semivida plasmática mejorada

Los ligandos diméricos que se dirigen a la PSD-95 están bajo evaluación preclínica como tratamiento para el dolor crónico y accidente cerebrovascular isquémico (Andreasen y col., *Neuropharmacol*, 2013, 67, 193-200; Bach y col., *PNAS USA*, 2012, 109, 3317-3322). Sin embargo, los péptidos terapéuticos en general son susceptibles a la degradación por proteasas y la eliminación por filtración renal y/o metabolismo hepático (Tang y col., *J Pharm Sci*, 2004, 93, 2184-204). Debido al tamaño limitado de los ligandos diméricos, es probable que se depuren de la sangre por filtración renal, ya que los riñones generalmente filtran compuestos con un peso molecular inferior a 60 kDa (Dennis y col., *J Biol Chem* 2002, 277, 35035-43). Para hacer que los ligandos peptídicos diméricos sean más adecuados para la utilidad clínica en un entorno crónico, tal como dolor neuropático, el régimen de dosificación debe ser lo más simple posible, preferentemente una vez al día, para aumentar el cumplimiento (Claxton y col., *Clin Ther* 2001, 23, 1296-310). Además, la auto-administración por parte del paciente a través de vías apropiadas, tales como la administración subcutánea (s.c.), se prefiere a la inyección i.v. (intravenosa). La principal limitación de la administración s.c. es el requisito de un bajo volumen de inyección (Dychter y col., *J Infus Nurs* 2012, 35, 154-60) que requiere que el fármaco sea altamente potente, altamente concentrado, soluble y sea degradado y excretado lentamente de la circulación. Además, el fármaco debe ser estable en el depósito de inyección y ser absorbido lentamente en la circulación para prolongar la acción del fármaco (Havelund y col., *Pharm Res* 2004, 21, 1498-504). Por lo tanto, el perfil farmacocinético y la semivida *in vivo* de los ligandos peptídicos diméricos deben optimizarse aún más para tener en cuenta estos problemas.

Unión de albúmina

La albúmina de suero humano (HSA), que es la proteína más abundante en el suero humano con el 55 % de la proteína sérica total (Elsadek y col., *J Control Release* 2012, 157, 4-28), ofrece una oportunidad para resolver estos problemas. La concentración promedio en sangre de HSA es 520-830 μM , y el peso molecular es de aproximadamente 66,5 kDa (Kragh-Hansen y col., *Biol Pharm Bull* 2002, 25, 695-704). La HSA es abundante en sangre, tejido muscular y piel (Sleep y col., *Biochim Biophys Acta* 2013, 1830, 5526-34), pero no está presente dentro de las neuronas en condiciones normales. Sin embargo, puede entrar en las neuronas en estados de enfermedad donde la barrera hematoencefálica (BBB) está comprometida, tal como un accidente cerebrovascular (Løberg, *APMIS* 1993, 101, 777-83). HSA sirve como una proteína de transporte y depósito para numerosos ligandos endógenos, tales como ácidos grasos (FA), hemina, bilirrubina y triptófano (Simard y col., *PNAS USA*, 2005, 102, 17958-63; Kragh-Hansen y col., *Biol Pharm Bull* 2002, 25, 695-704) y fármacos, tales como la warfarina y el diazepam, así como los iones metálicos (Yamasaki y col., *Biochim Biophys Acta* 2013, 1830, 5435-43).

La estructura de la HSA se ha estudiado ampliamente, y más de 90 estructuras de rayos X diferentes de la HSA se depositan en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, fecha de acceso 26/09/2013) con 71 ligandos diferentes. HSA es una molécula en forma de corazón con dimensiones aproximadas de 80 x 80 x 30 Å; y consiste en tres dominios similares (I, II y III), que se dividen adicionalmente en dos subdominios (a y b) (Sugio y col., *Protein Eng* 1999, 12, 439-46). La mayoría de los fármacos se unen en el Sitio I de Sudlow (también llamado el sitio de warfarina) y II (también llamado el sitio de diazepam) (Elsadek y col., *J Control Release* 2012, 157, 4-28; Yamasaki y col., *Biochim Biophys Acta* 2013, 1830, 5435-43), llamado así por el trabajo pionero de Sudlow y colegas que en 1975 identificaron los sitios mediante espectroscopia de fluorescencia (Sudlow y col., *Mol Pharmacol* 1975, 11, 824-32). Desde entonces, los dos sitios de unión al fármaco se han mapeado y se encuentran dentro del subdominio IIa (con la contribución de los residuos en los subdominios IIIa y IIb) y IIIa, respectivamente (Yamasaki y col., *Biochim Biophys Acta* 2013, 1830, 5435-43). Una excepción importante a la unión general de los ligandos en el sitio I y II de Sudlow son los ácidos grasos (FAs).

El concepto de que la alta unión a HSA de un fármaco aumenta la semivida del fármaco se conoce desde la década de 1970. Sin embargo, el concepto específico de utilizar HSA para aumentar la semivida de los péptidos y proteínas terapéuticas ha evolucionado más lentamente, al duplicarse el número de publicaciones anuales desde 2002 (~250 publicaciones/año) a 2010 (~500 publicaciones/año) (Elsadek y col., *J Control Release* 2012, 157, 4-28). Se han descrito varios restos de unión a HSA a base de péptidos, incluidas las secuencias de unión a HSA identificadas por la expresión en fagos (Dennis y col., *J Biol Chem* 2002, 277, 35035-43), aislados de fuentes naturales (Jonsson y col., *Protein Eng Des Sel* 2008, 21, 515-27 y las llamadas adnectinas (Lipovsek y col., *Protein Eng Des Sel* 2011, 24, 3-9). Sin embargo, estos pueden ser susceptibles a la degradación de la proteasa, lo que puede ser particularmente un

problema en el caso actual de administración s.c., donde se supone que los compuestos desarrollados residen en el depósito s.c. durante varias horas.

Estructura general

5

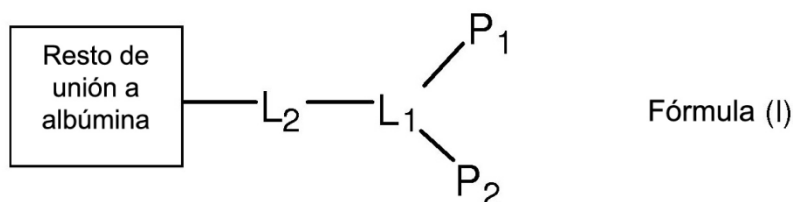
Con el fin de mejorar el perfil farmacocinético, los presentes inventores investigan la influencia de los ácidos grasos y los tipos de enlazadores en la afinidad de HSA, la afinidad por PSD-95 y la hidrofobicidad de los compuestos generados. Al hacerlo, se han identificado nuevos compuestos que proporcionan el perfil de unión a HSA deseado y una estabilidad mejorada en plasma humano.

10

Por ende, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un compuesto que comprende un primer péptido (P_1) y un segundo péptido (P_2), donde P_1 y P_2 comprenden individualmente al menos dos residuos de aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos, y donde P_1 y P_2 se conjugan a un primer enlazador L_1 a través de sus extremos N-terminales respectivos, y donde L_1 comprende polietilenglicol (PEG), donde al menos un átomo de oxígeno de dicho PEG está sustituido con un átomo de nitrógeno para dar NPEG, y donde un resto de unión a albúmina está enlazado al átomo de nitrógeno de NPEG mediante un enlace amida, o a través de un enlazador opcional L_2 .

15

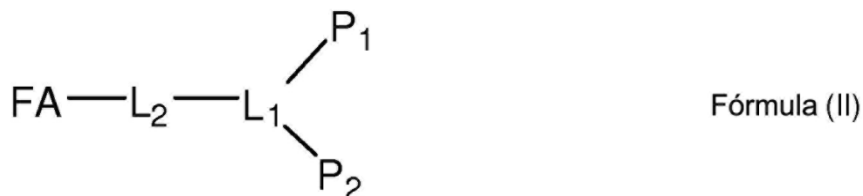
En ciertas realizaciones de la presente divulgación, dicho compuesto tiene la fórmula general (I):



20

Si bien el resto de unión a albúmina puede ser cualquier albúmina de unión a un grupo químico adecuado, se prefiere que el resto de unión a albúmina sea un ácido graso (FA). En una realización de la presente divulgación, el compuesto tiene así la fórmula general (II):

25

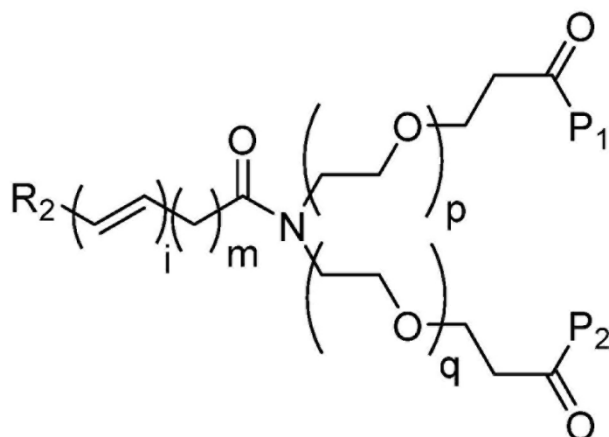


El ácido graso puede ser cualquier ácido graso adecuado, tal como un ácido graso saturado o insaturado. Como se ilustra en las fórmulas (I) y (II) anteriores, el resto de unión a albúmina, tal como el ácido graso, puede enlazarse opcionalmente al átomo de nitrógeno de un enlazador NPEG (L_1) a través de un segundo enlazador L_2 . En realizaciones de la presente divulgación donde se incluye el segundo enlazador L_2 , ese enlazador comprende un átomo de nitrógeno.

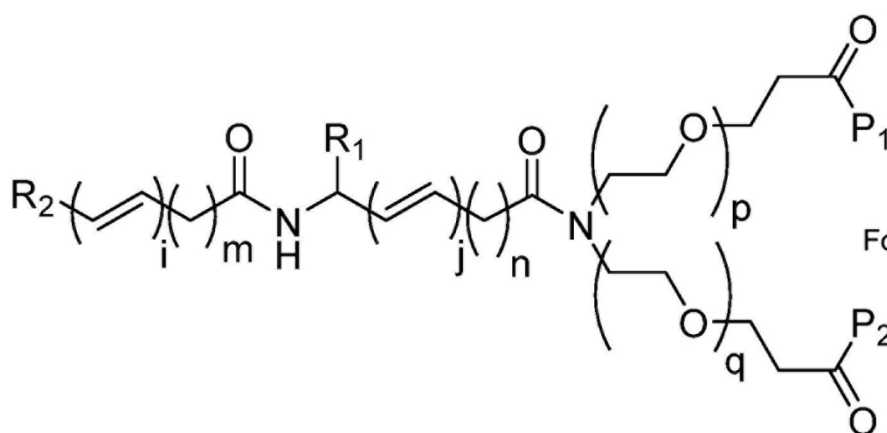
30

En una realización, el compuesto de acuerdo con la presente divulgación tiene la estructura genérica de fórmula (III) o (IV):

35



Fórmula (III)



Fórmula (IV)

donde

5 R_1 y R_2 se seleccionan individualmente de entre el grupo que consiste en H y COOH ,

n es un número entero de 0 a 48,

m es un número entero de 1 a 48,

p es un número entero de 0 a 28,

10 q es un número entero de 0 a 28,

i es un entero de 0 a 12,

j es un entero de 0 a 12

15 y donde P_1 y P_2 se seleccionan individualmente de entre péptidos que comprenden al menos dos residuos de aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos.

El primer enlazador (L_1)

20 Las propiedades exhibidas por el ácido graso en los péptidos activos P_1 y P_2 dependen de la manera en que estos restos están enlazados. La unión se logra a través del primer enlazador L_1 y el segundo enlazador L_2 . El primer enlazador L_1 , que hasta cierto punto se ha descrito en el documento WO 2012/156308, consiste en una cantidad de restos de etilenglicol que forman un polietilenglicol, donde uno de los átomos de oxígeno ha sido reemplazado con un átomo de nitrógeno para formar un enlazador de MPEG. El enlazador MPEG puede ilustrarse como un átomo de nitrógeno flanqueado en cada lado por un número (p , q) de restos de etilenglicol.

25

El número de restos de etilenglicol que flanquean el átomo de nitrógeno se puede variar en diferentes realizaciones de la presente divulgación. En una realización de la presente divulgación, el número de restos de etilenglicol (p) en un lado es igual al número de restos de etilenglicol en el lado opuesto, es decir, $p = q$. En otras realizaciones de la presente divulgación, $p > q$ o $p < q$.

En una realización de la presente divulgación, la suma de p y q es un número entero entre 0 y 28, tal como donde el número de restos de etilenglicol, p se selecciona de entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28.

5

En una realización de la presente divulgación, el número de restos de etilenglicol, p es de 1 a 4, ya que ese intervalo de p proporciona la mayor afinidad hacia PSD-95.

En una realización de la presente divulgación, el número de restos de etilenglicol, q se selecciona de entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 restos de etilenglicol.

En una realización de la presente divulgación, el número de restos de etilenglicol q es de 1 a 4, ya que ese intervalo de q proporciona la mayor afinidad hacia PSD-95.

En una realización de la presente divulgación, el número total de restos de etilenglicol p + q está entre 2 y 12, ya que la longitud del enlazador dentro de ese intervalo proporciona la mayor afinidad hacia PSD-95.

En una realización de la presente divulgación, el número de restos de etilenglicol, p + q es 4, ya que la longitud del enlazador de ese intervalo proporciona la mayor afinidad hacia PSD-95.

En otra realización de la presente divulgación, el número de restos de etilenglicol, p + q es 6, ya que la longitud del enlazador de ese intervalo proporciona una afinidad muy alta hacia PSD-95.

El segundo enlazador (L₂)

El segundo enlazador L₂ es opcional y puede incluirse o excluirse dependiendo de las propiedades físicas o químicas requeridas para un fin particular. Cuando está presente, el segundo enlazador L₂ comprende un átomo de nitrógeno. El segundo enlazador L₂ puede seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que consiste en γ-Glu, ácido γ-butiúrico (GABA), ácido 5-amino valérico (5-Ava), aminoácidos proteínogénicos, aminoácidos no proteínogénicos y cualquier compuesto que tenga la fórmula general H₂N-[Q]-COOH, donde Q es cualquier átomo o átomos o molécula adecuados.

30

Como se mencionó anteriormente en la presente memoria, el segundo enlazador puede comprender un resto de carbono repetitivo, formando así, por ejemplo, una cadena de alquilo o alquénilo. El número de unidades repetitivas (i) y/o (m) se puede variar según las propiedades deseadas. Así, i y/o m son números enteros que pueden seleccionarse individualmente de entre el grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 y 48.

En una realización de la presente divulgación, n es un número entero entre 1 y 3, tal como en una realización de la presente divulgación donde n = 1 o n = 2 o n = 3.

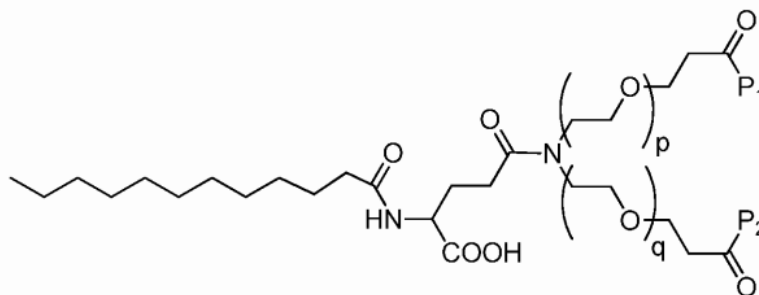
40

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, i y/o j es un número entero entre 0 y 12, por ejemplo, un número entero seleccionado de entre el grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, los enlazadores L₁ y L₂ se han elegido de modo que el compuesto de acuerdo con la divulgación se seleccione de entre el grupo que consiste en:

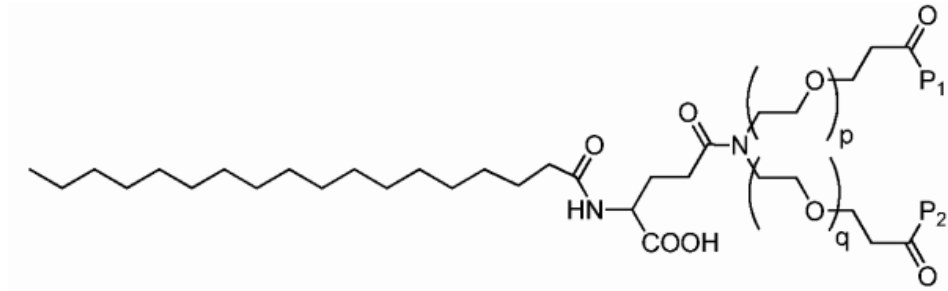
45

a) Derivado KBN41

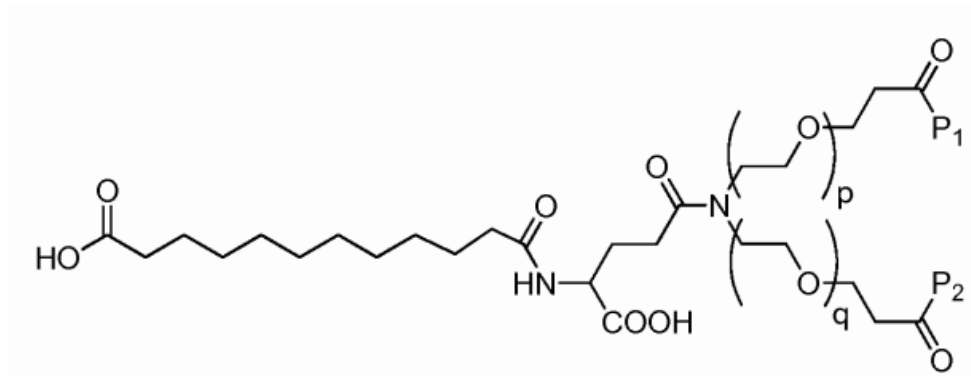


50

b) Derivado KBN42

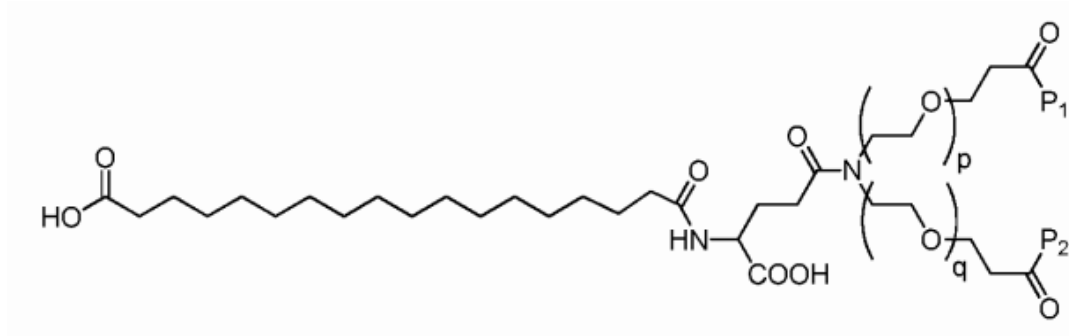


5 c) Derivado KBN43

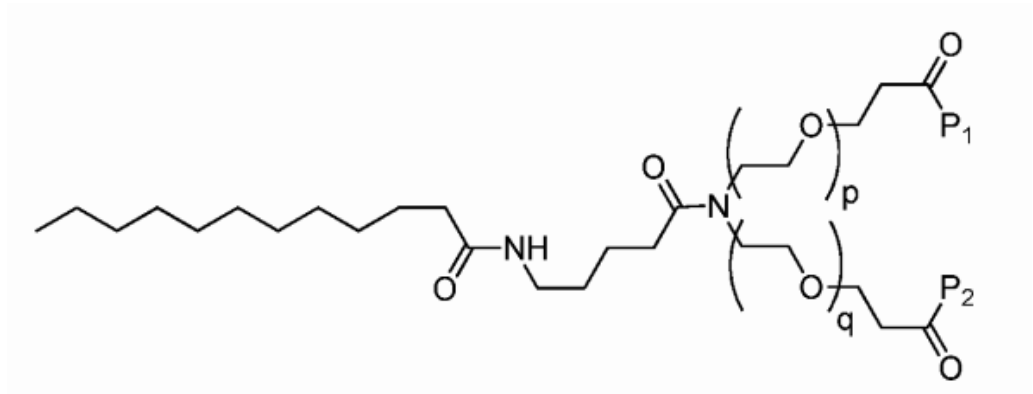


d) Derivado KBN44

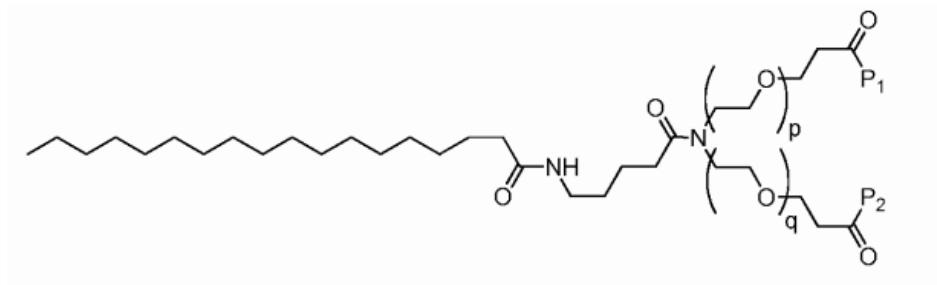
10



e) Derivado KBN45

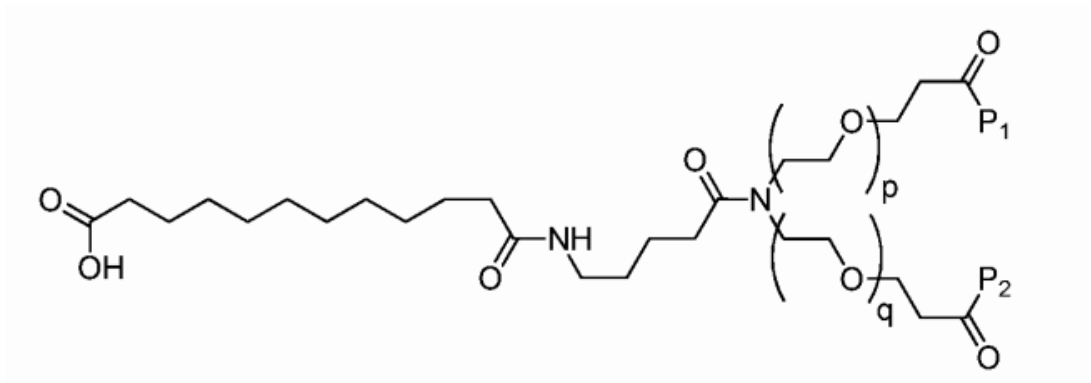


f) Derivado KBN46



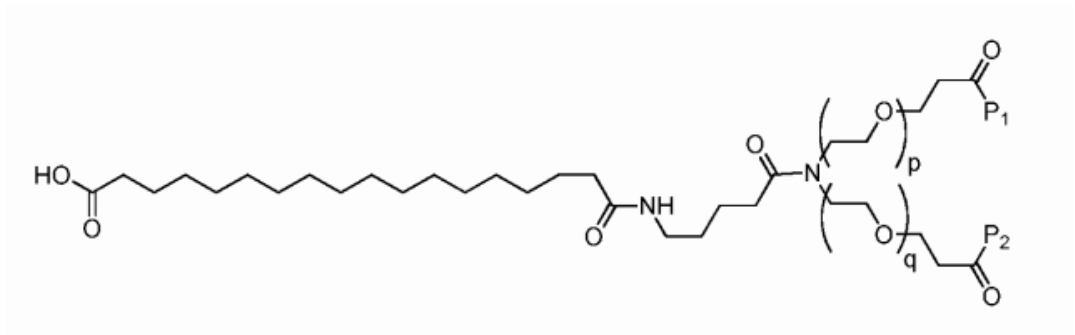
5

g) Derivado KBN47

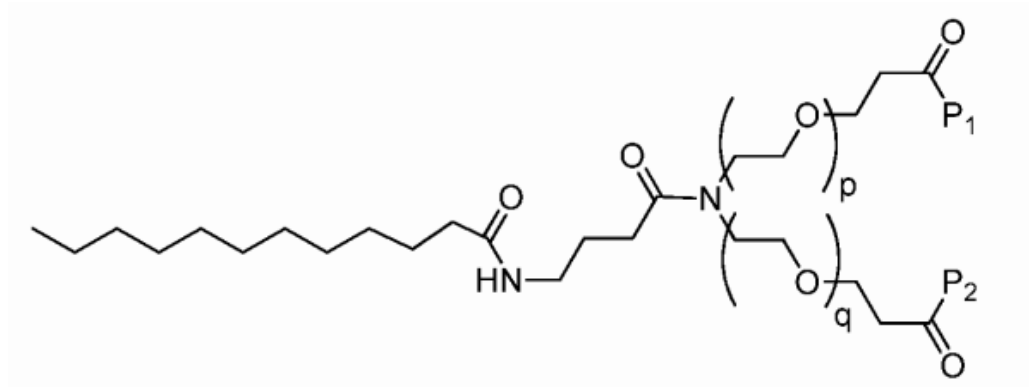


10

h) Derivado KBN48

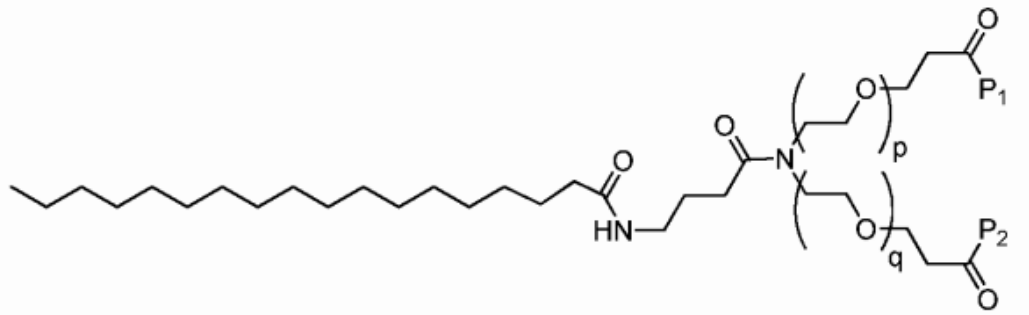


i) Derivado KBN52

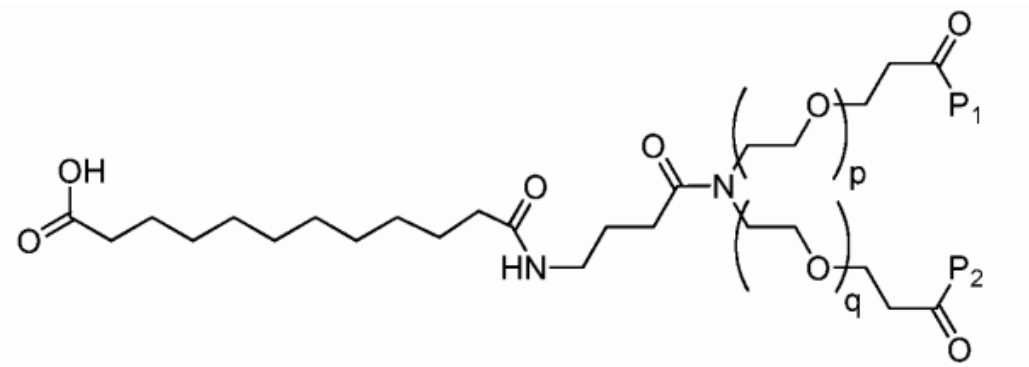


j) Derivado KBN53

5

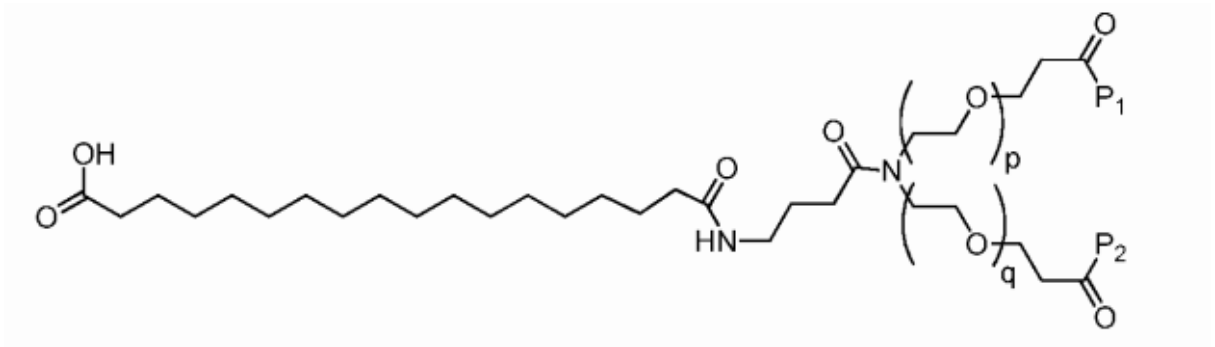


k) Derivado KBN54



10

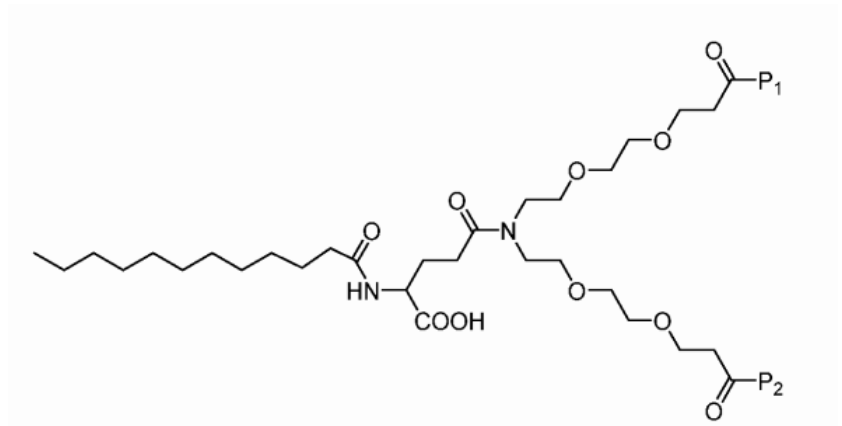
l) Derivado KBN55



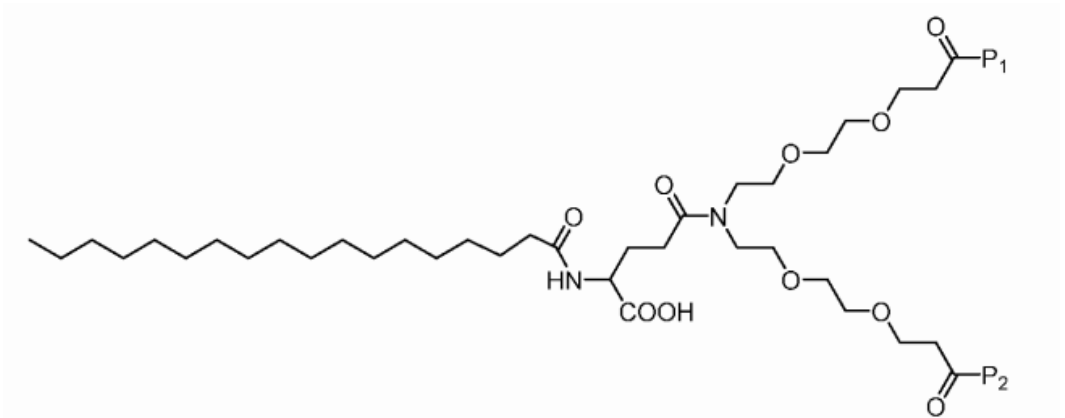
En una realización adicional de la presente divulgación, los enlazadores se han elegido de modo que el compuesto de la divulgación se seleccione de entre el grupo que consiste en:

5

a) Derivado KBN41

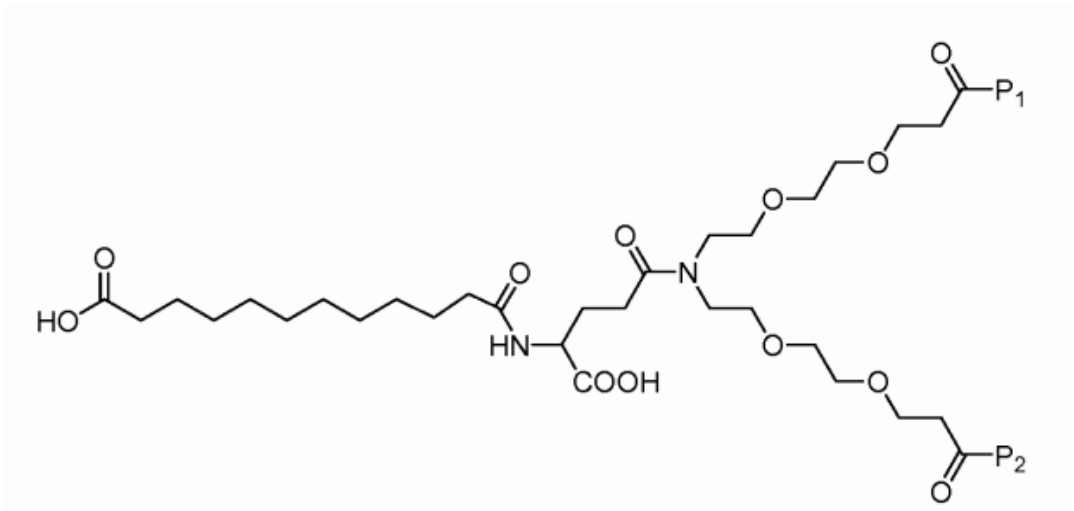


10 b) Derivado KBN42

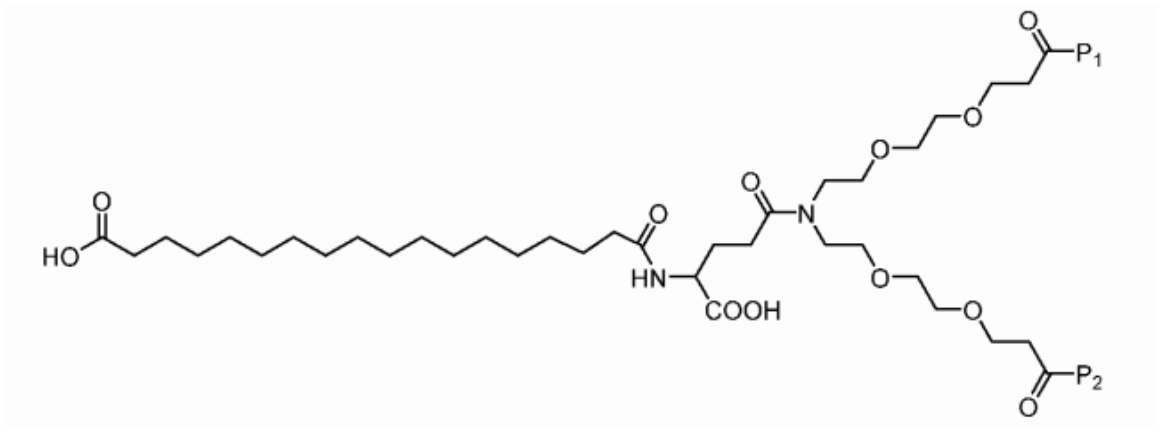


c) Derivado KBN43

15

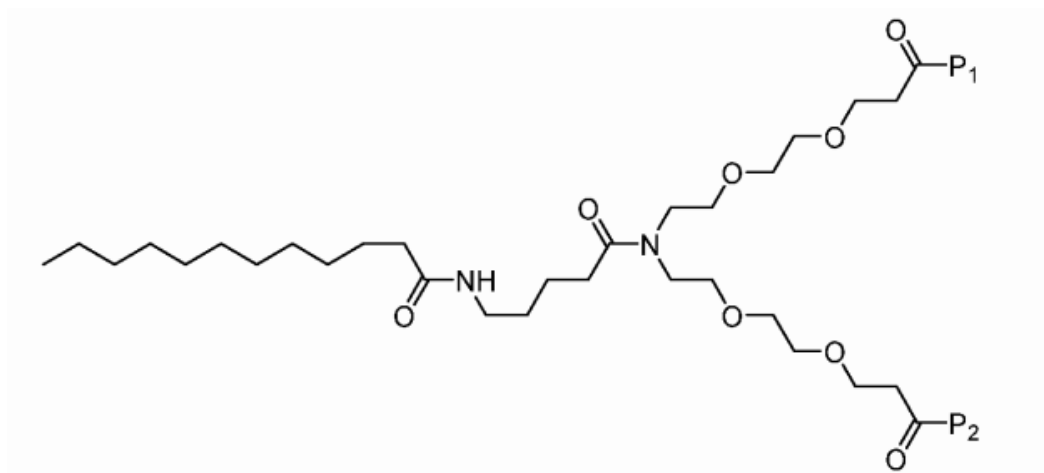


d) Derivado KBN44



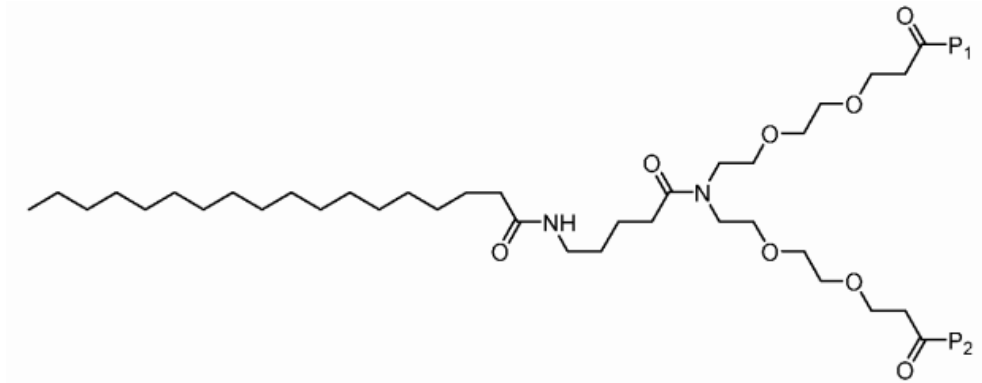
5

e) Derivado KBN45

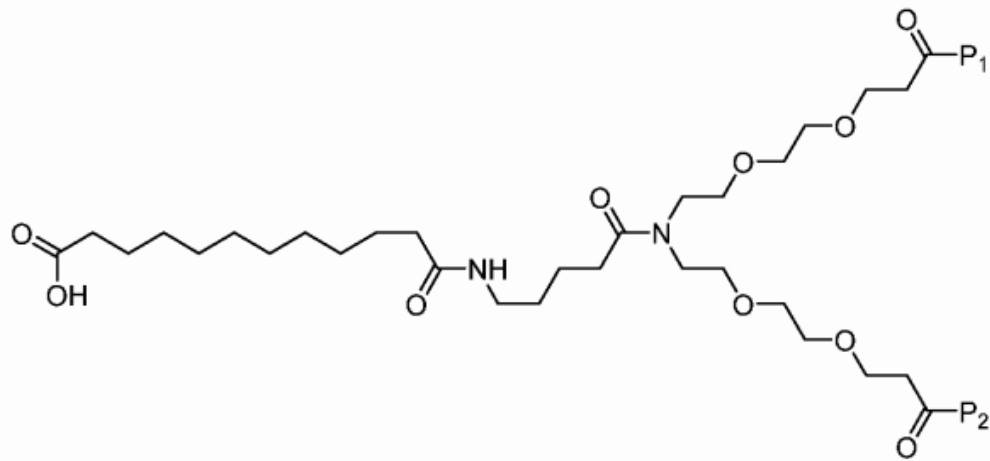


10

f) Derivado KBN46

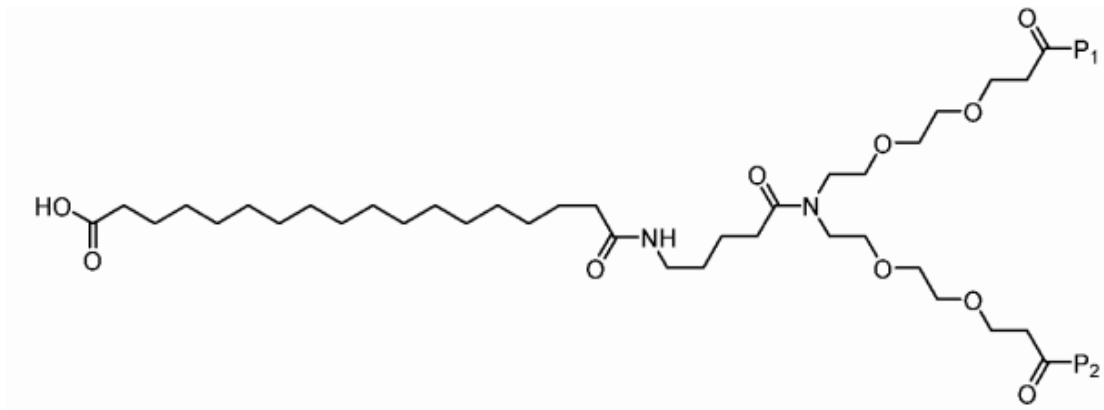


g) Derivado KBN47



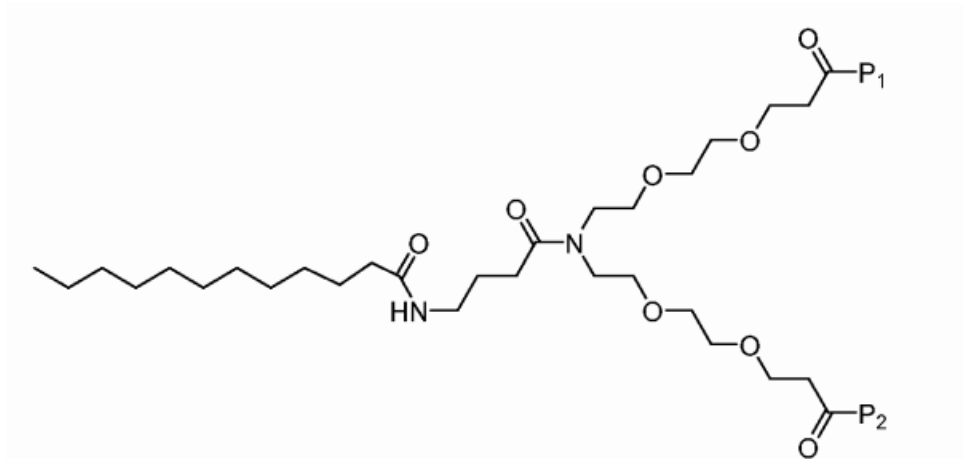
5

h) Derivado KBN48

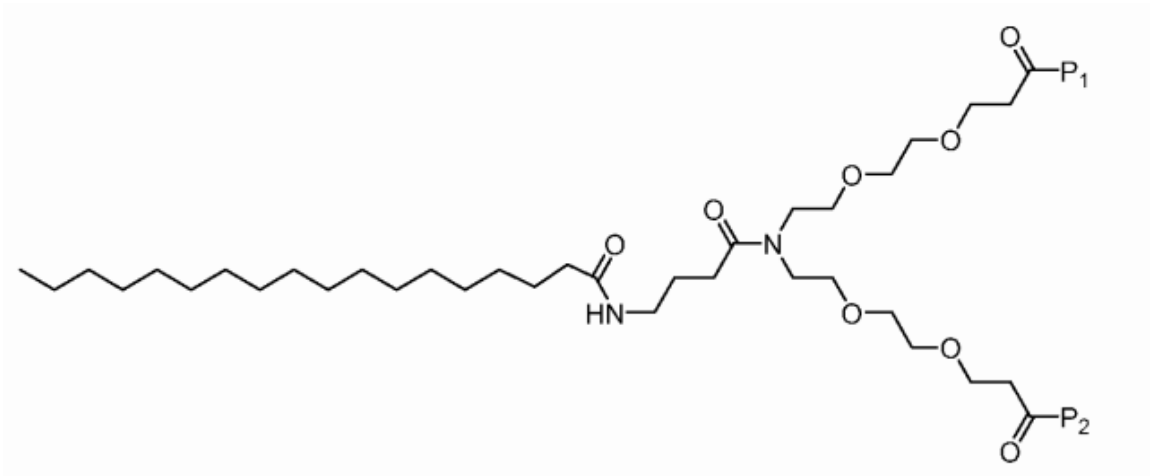


10

i) Derivado KBN52

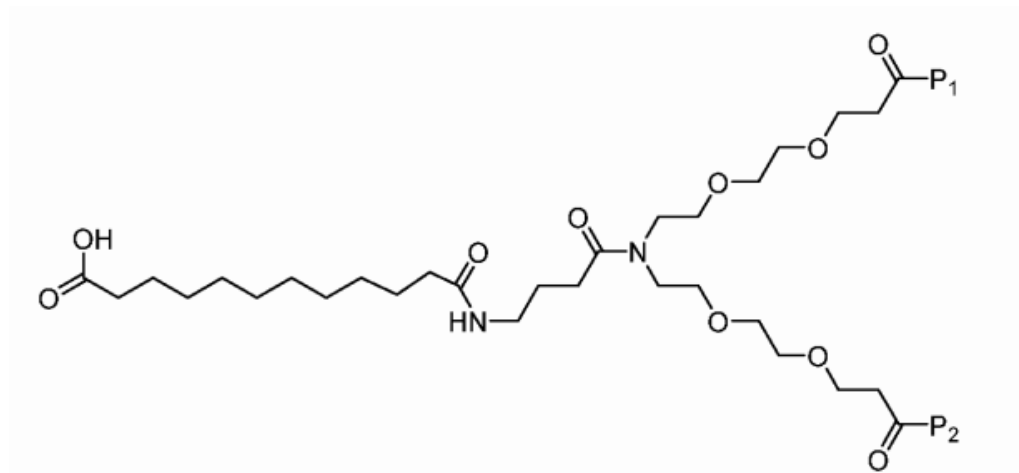


j) Derivado KBN53



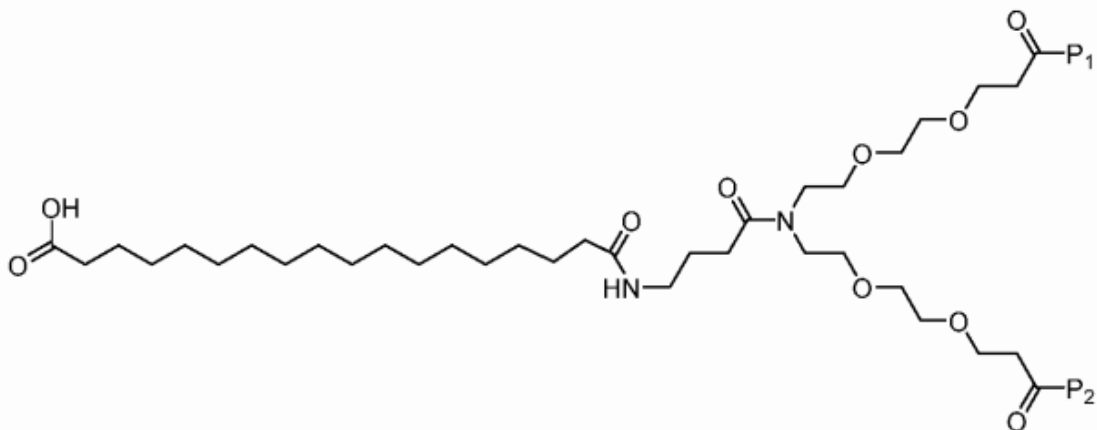
5

k) Derivado KBN54



10

l) Derivado KBN55



Ácidos grasos (FA)

- 5 Un ácido graso es un ácido carboxílico con una cola alifática (cadena), que es saturado o insaturado. Los ácidos grasos de origen más natural tienen una cadena de un número par de átomos de carbono, de 4 a 28. Los ácidos grasos se derivan generalmente de triglicéridos o fosfolípidos. Cuando no están unidos a otras moléculas, se conocen como ácidos grasos libres.
- 10 Los ácidos grasos que tienen dobles enlaces carbono-carbono se conocen como ácidos grasos insaturados, mientras que los ácidos grasos sin dobles enlaces se conocen como saturados. Los ácidos grasos insaturados tienen uno o más dobles enlaces entre los átomos de carbono. En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el compuesto de la presente divulgación comprende un ácido graso insaturado. En tales realizaciones, el indicador (i) y/o (j) de fórmulas genéricas (III), (IV), (V) o (VI) es un número entero seleccionado individualmente de entre un número entero entre 0 y 12, tal como un número entero seleccionado de entre el grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Los ácidos grasos insaturados están disponibles en cualquier configuración *cis* o *trans*, o en una mezcla de ambas.

- 20 Una configuración *cis* significa que los átomos de hidrógeno adyacentes están en el mismo lado del doble enlace. La rigidez del doble enlace congela su conformación y, en el caso del isómero *cis*, hace que la cadena se doble y restrinja la libertad conformacional del ácido graso. Cuantos más dobles enlaces tenga la cadena en la configuración *cis*, menos flexibilidad tendrá. Cuando una cadena tiene muchos dobles enlaces con configuración *cis*, se vuelve bastante curva en sus conformaciones más accesibles. Por ejemplo, el ácido oleico, con un doble enlace, tiene una "torcedura" en el mismo, mientras que el ácido linoleico, con dos dobles enlaces, tiene una curva más pronunciada. El ácido α -linoléico, con tres dobles enlaces, favorece una forma de gancho. El efecto de esto es que, en ambientes restringidos, como cuando los ácidos grasos son parte de un fosfolípido en una bicapa lipídica, o triglicéridos en gotitas de lípidos, los dobles enlaces *cis* limitan la capacidad de los ácidos grasos a ser muy compactos, y por lo tanto podrían afectar la temperatura de fusión de la membrana o de la grasa.
- 30 Una configuración *trans*, por el contrario, significa que los dos átomos de hidrógeno siguientes están unidos a lados opuestos del doble enlace. Como resultado, no provocan que la cadena se doble mucho, y su forma es similar a los ácidos grasos saturados lineales.
- 35 Está dentro del alcance de la presente divulgación elegir cualquier ácido graso adecuado para el fin previsto, incluyendo ácidos grasos *cis*, *trans* o mixtos.

El compuesto de acuerdo con la presente divulgación puede comprender cualquier ácido graso o derivado de ácido graso adecuado. En una realización de la presente divulgación, el ácido graso es un ácido graso como se define en las fórmulas genéricas (III) o (IV) donde m es un número entero seleccionado de entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 y 48, tal como donde m es un número entero entre 10 y 16, por ejemplo, donde $m = 10$ o donde $m = 16$, que sin duda, determinan un alto grado de interacción HSA (Tabla 1).

45 El ácido graso de la divulgación puede ser un ácido graso C_4 - C_{22} o un ácido graso seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico,

ácido oleico, ácido eláidico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido linoeláidico, ácido α -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúcico y ácido docosahexaenoico.

Péptidos (P₁ y P₂)

5

El compuesto de la presente divulgación comprende dos péptidos P₁ y P₂.

P₁ y P₂ pueden ser individualmente cualquier péptido, comprendiendo cada uno de los cuales al menos dos residuos de aminoácidos y, por lo tanto, el compuesto dimérico de la presente divulgación puede adaptarse para el fin pretendido.

10

En una realización preferida de la presente divulgación, el compuesto de la presente divulgación es un inhibidor de PSD-95 donde dos péptidos se unen a PDZ1-2 de PSD-95. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el compuesto es un compuesto como se define en una cualquiera de las fórmulas genéricas (I), (II), (III) o (IV), donde:

P₁ comprende la secuencia de aminoácidos X₄X₃X₂X₁ (SEQ ID NO:1), y

15 P₂ comprende la secuencia de aminoácidos Z₄Z₃Z₂Z₁ (SEQ ID NO:2),

donde

20

a) X₁ y/o es un residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V,

b) X₂ y/o Z₂ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S y N-Me-V,

c) X₃ y/o Z₃ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T,

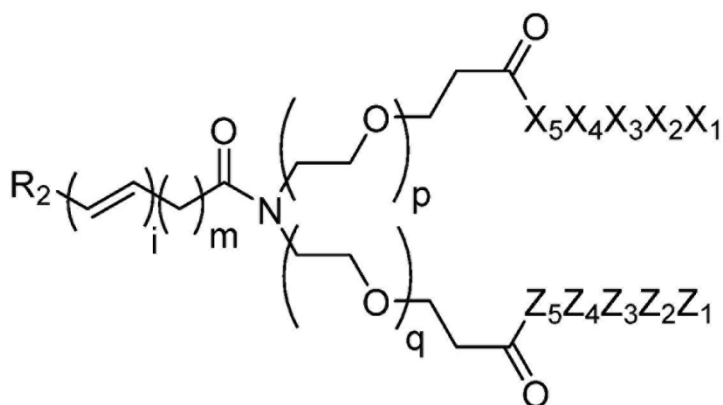
d) X₄ y/o Z₄ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S,

25

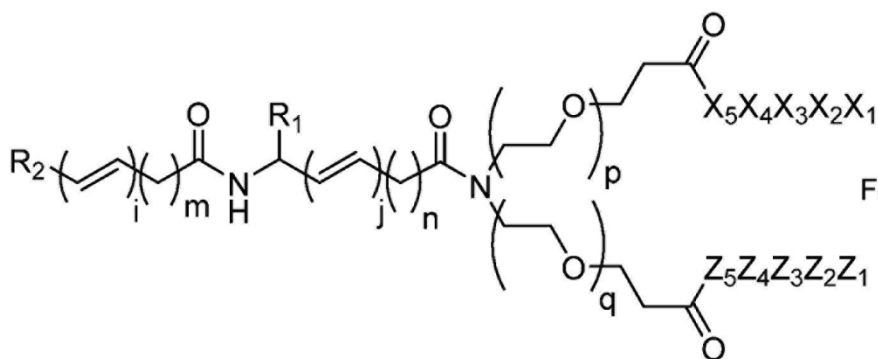
donde X₁ y Z₁ representan individualmente el último residuo de aminoácido C-terminal que comprende un ácido carboxílico libre.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el compuesto de acuerdo con la presente divulgación tiene la estructura genérica de fórmula (V) o (VI):

30



Fórmula (V)



Fórmula (VI)

donde

- 5 R_1 y R_2 se seleccionan individualmente de entre el grupo que consiste en H y COOH,
 n es un número entero de 0 a 48,
 m es un número entero de 1 a 48, y
 p es un número entero de 0 a 28,
 q es un número entero de 0 a 28,
 10 i es un número entero 0 a 12,
 j es un número entero 0 a 12 X_5 y/o Z_5 son/es un residuo de aminoácido opcional, un péptido o un polipéptido,
 X_4 y/o Z_4 es un residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S,
 X_3 y/o Z_3 es un residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T,
 X_2 y/o Z_2 es un residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-
 15 Q, N-Me-N, N-Me-S y N-Me-V
 X_1 y/o Z_1 es un residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V.

Si X_5 es un residuo de aminoácido único, se selecciona de entre residuos de aminoácidos proteínogénicos y no proteínogénicos.

- 20 En una realización de la presente divulgación, X_5 es un residuo de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en I, A, L y V.

- 25 X_5 también puede ser un péptido o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en 2 a 100 residuos de aminoácidos, donde el extremo C-terminal de dicho péptido o polipéptido es un residuo de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en I, A, L y V.

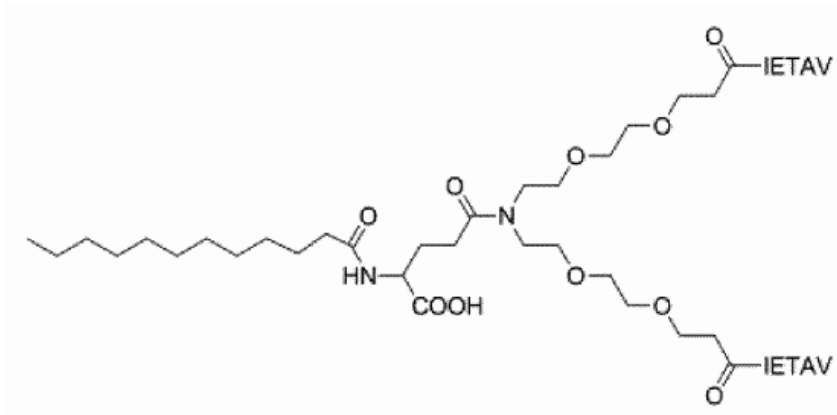
En ciertas realizaciones de la presente divulgación, X_5 es un péptido que comprende de 2 a 100 residuos, tal como 2 a 90 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 80 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 70 residuos de aminoácidos, tal

como 2 a 60 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 50 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 40 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 30 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 20 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 10 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 9 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 8 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 7 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 6 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 5 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 4 residuos de aminoácidos, tal como 2 a 3 residuos de aminoácidos, donde el extremo C-terminal es un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en I, A, L y V.

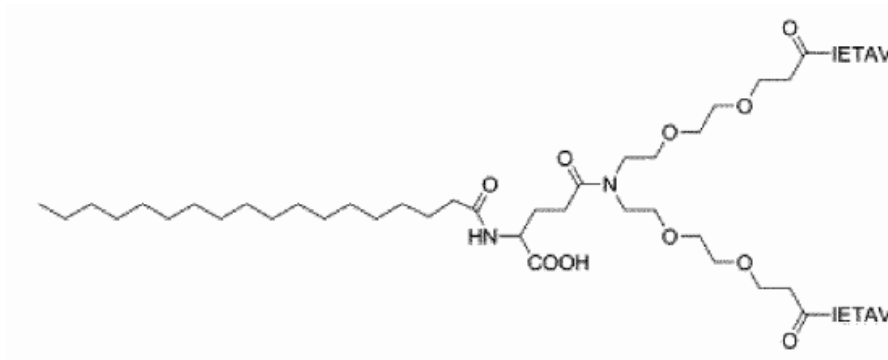
Si bien el concepto de la presente divulgación es generalmente aplicable como se ilustra en las fórmulas genéricas (I), (II), (III), (IV), (V) y (V), los presentes inventores han preparado una serie de compuestos dentro de la presente divulgación, que comprende un motivo peptídico de P₁ y P₂, siendo adecuados para unirse a PDZ1-2 de PSD-95.

De este modo, en una realización, el compuesto de acuerdo con la presente divulgación se selecciona de entre el grupo que consiste en:

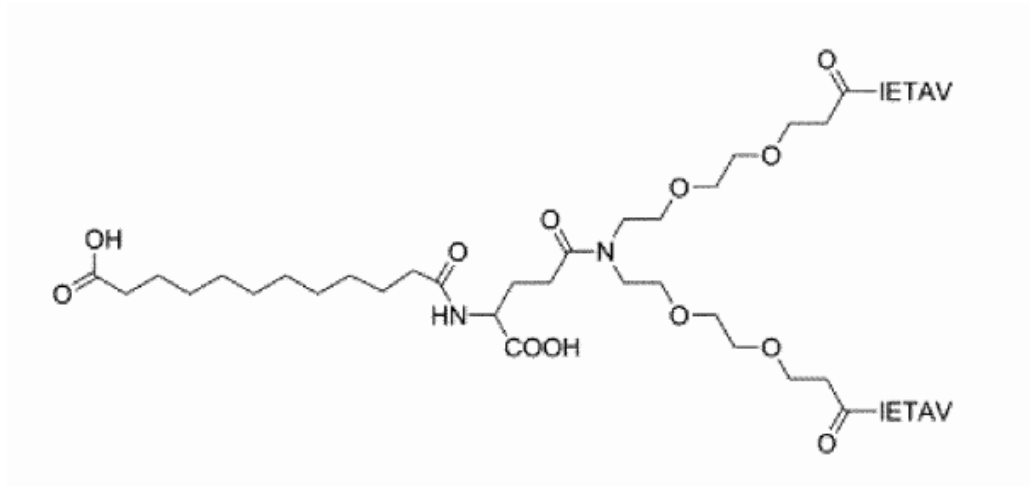
15 a) KBN41 (5)



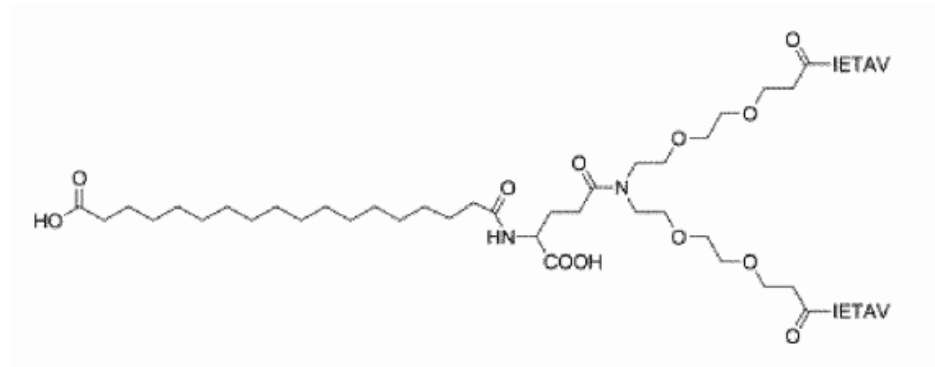
20 b) KBN42 (7)



c) KBN43 (6)

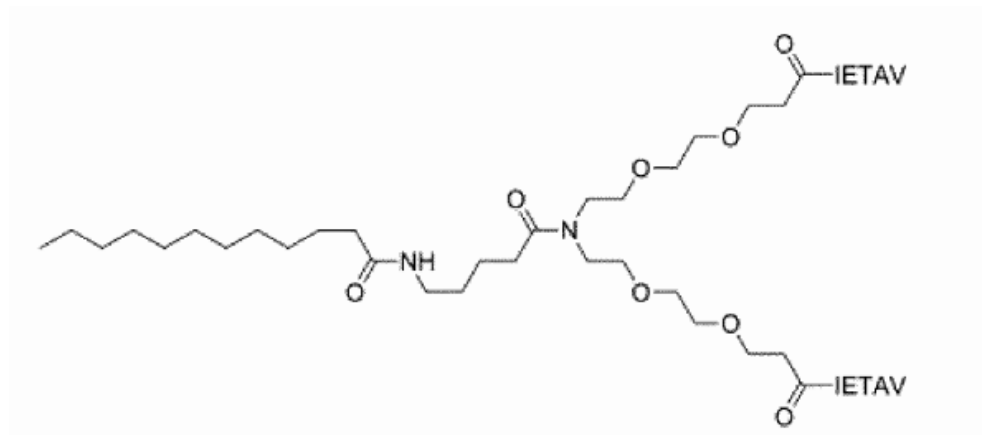


d) KBN44 (8)



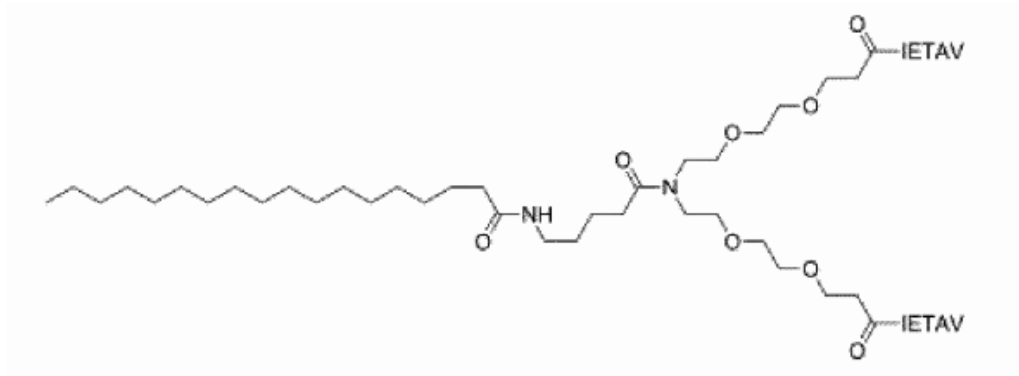
5

e) KBN45 (9)

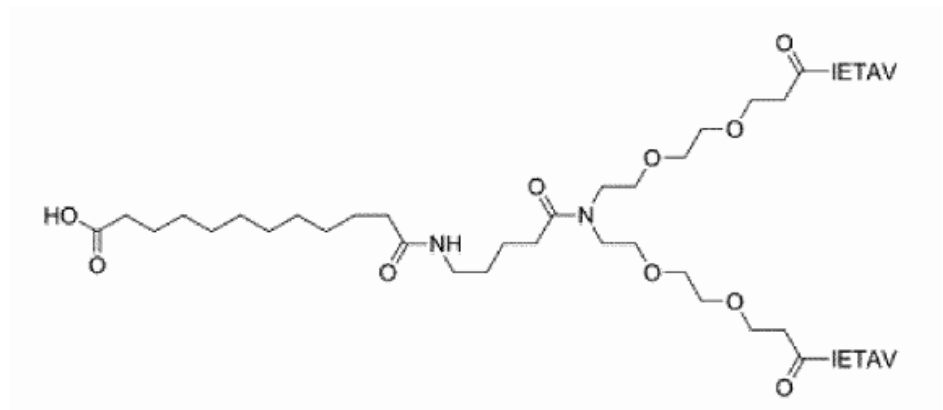


10

f) KBN46 (11)

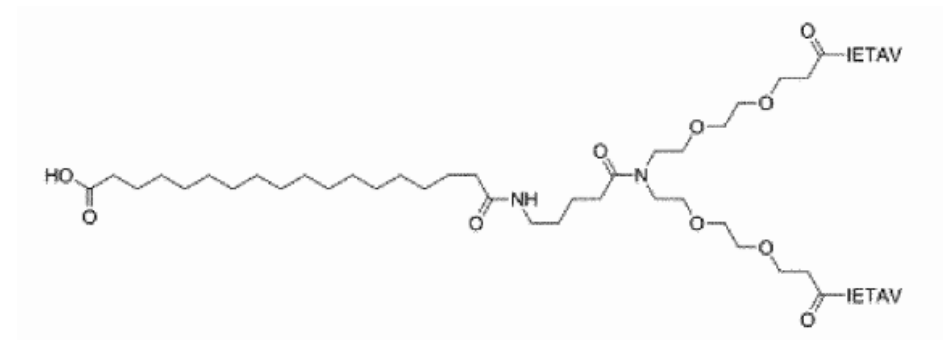


g) KBN47 (10)



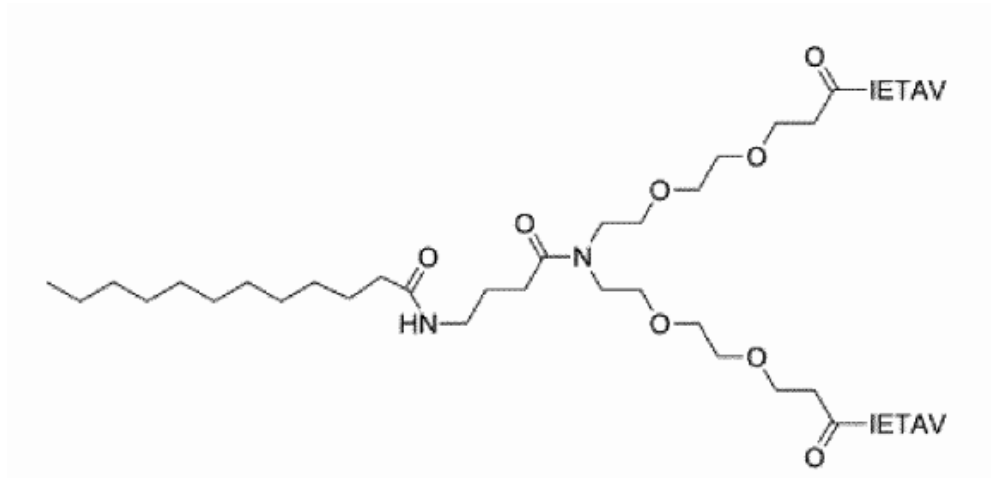
5

h) KBN48 (12)

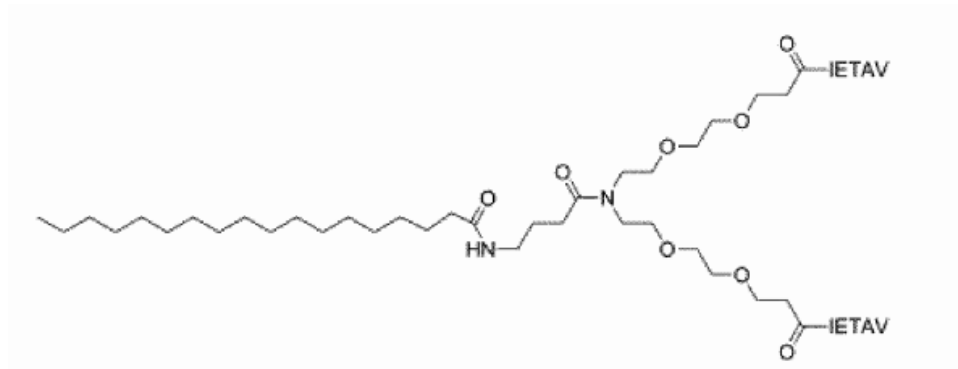


10

j) KBN52 (1)

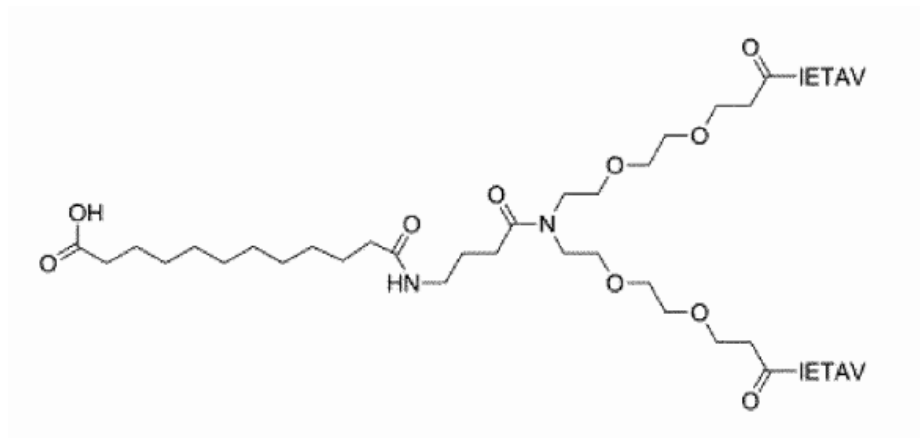


k) KBN53 (3)



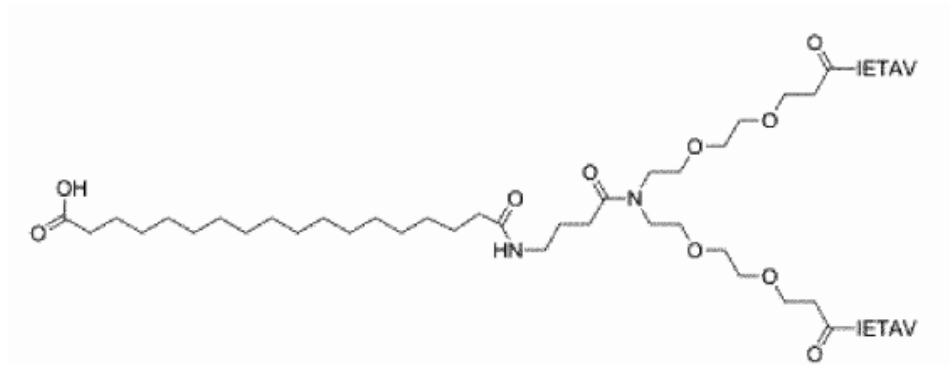
5

l) KBN54 (2)

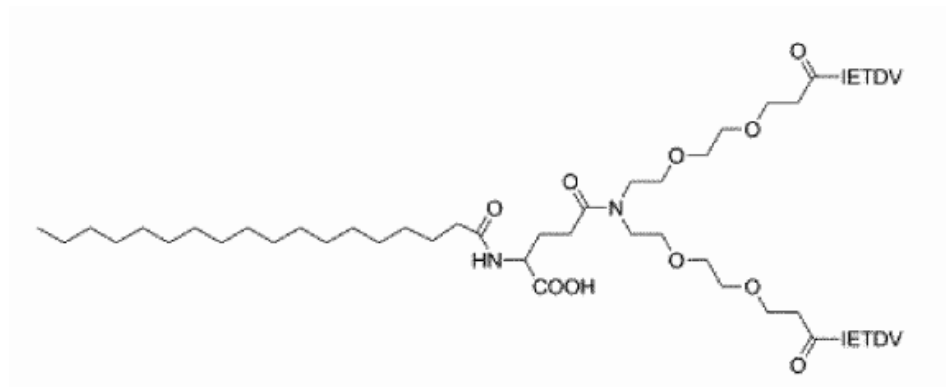


10

m) KBN55 (4)

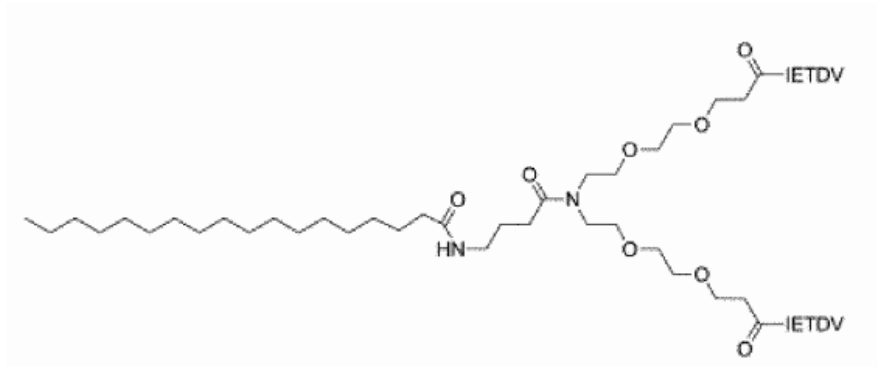


n) KBN63 (15)



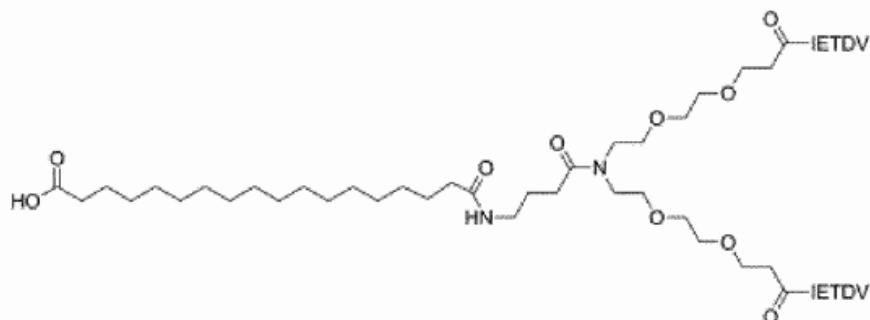
5

o) KBN64 (13)



10

p) KBN65 (14)



Formas de sal

5 El compuesto, como se define en la presente memoria puede estar en forma de una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto. En una realización de la presente divulgación, el compuesto como se define en una cualquiera de las fórmulas generales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI) puede formularse como una sal de adición farmacéuticamente aceptable o hidrato de dicho compuesto, tal como pero no limitado a K^+ , Na^+ , así como no sal, por ejemplo, H^+ .

10

III. Uso médico

En un aspecto, el compuesto de la presente divulgación, como se define en la presente memoria, es para uso como medicamento.

15

En una realización de la presente divulgación, el compuesto, como se define en la presente memoria, es para su uso en el tratamiento o profilaxis del dolor.

En otra realización de la presente divulgación, el compuesto, como se define en la presente memoria, es para su uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad relacionada excitotóxica.

20

En una realización adicional de la presente divulgación, la enfermedad tratable por el compuesto de la presente divulgación es una lesión isquémica o traumática del SNC.

25 IV. Síntesis

Los inhibidores de PSD-95 derivados de ácidos grasos de la presente divulgación, como se define en la presente memoria, pueden fabricarse mediante un procedimiento que comprende las etapas generales que consisten en:

30

- a) preparar un enlazador diácido de Ns-NPEG,
- b) preparar un péptido utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida a base de Fmoc,
- c) dimerizar el péptido Fmoc desprotegido con el enlazador diácido de Ns-NPEG,
- d) acoplar un ácido graso al conjugado de enlazador-dímero, opcionalmente a través de un enlazador intermedio, tal como un enlazador de aminoácidos (L_2).

35

Los compuestos de la presente divulgación se pueden sintetizar en una realización como se define a continuación.

Enlazador diácido Ns-NPEG: El enlazador NPEG (Ns) protegido con orto-nitrobenzenosulfonilo se produce en fase sólida o en solución.

40

El procedimiento en fase sólida comienza normalmente cargando un soporte sólido útil para la síntesis de péptidos en fase sólida, tal como la resina de cloruro de 2-clorotritilo, con Fmoc-NH-PEG-CH₂CH₂COOH, usando un disolvente orgánico apropiado para la resina específica (por ejemplo, DCM, DMF, ACN, THF) y una base (por ejemplo, DIPEA, DBU, colidina, NMM).

45

El grupo Fmoc puede eliminarse mediante una base (por ejemplo, piperidina, dimetilamina, morfolina, piperazina, dicitclohexilamina, DMAP) en un disolvente apropiado (por ejemplo, DMF, DCM, ACN, THF). El cloruro de orto-nitrobenzenosulfonilo se puede acoplar a la amina libre usando una base (por ejemplo, DIPEA, DBU,

colidina, NMM) y un disolvente apropiado (por ejemplo, THF, DCM) para obtener Ns-NH-PEG-CH₂CH₂COO-resina.

La segunda parte del producto enlazador puede conectarse a la parte enlazador unida a la resina mediante el uso de química de Mitsunobu. La resina se trata con trifetilfosfina, HO-PEG-CH₂CH₂COOtBu, disolvente y reactivos de éster o amida del ácido azodicarboxílico (por ejemplo, azodicarboxilato de diisopropilo, DIAD; azodicarboxilato de dietilo, DEAD; 1,1'-(azodicarbonil)-dipiperina, ADDP).

El enlazador diácido Ns-MPEG final se obtiene tratando la resina con un ácido, tal como ácido trifluoroacético (TFA).

10 El procedimiento en fase de solución se puede realizar mediante la protección del grupo amina de NH₂-PEG-CH₂CH₂COOtBu con Ns, seguido de la química de Mitsunobu en solución usando trifetilfosfina y DIAD, DEAD o ADDP, o reactivos similares, HO-PEG-CH₂CH₂COOtBu, y disolvente apropiado (THF, DCM). El enlazador de MPEG Ns protegido final se obtiene luego por tratamiento con ácidos, tales como TFA.

15 Síntesis de péptidos: La secuencia peptídica se sintetiza mediante la síntesis de péptidos en fase sólida a base de Fmoc usando un soporte sólido, tal como la resina de cloruro de 2-clorotritilo o la resina de Wang, aminoácidos Fmoc protegidos, base, reactivos de acoplamiento (por ejemplo, HBTU [hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio], hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio [HATU], PyBOB, DIC/HOBt) y disolventes. Como alternativa al acoplamiento de reactivos, se puede usar un éster activado de aminoácidos protegidos con Fmoc (por ejemplo, pentafluorofenilo, succinimida).

20 Dimerización: El péptido unido a resina Fmoc desprotegido se dimeriza con el enlazador diácido Ns-MPEG mediante un procedimiento de dimerización en resina mediante tratamientos repetitivos de la resina con el enlazador diácido Ns-MPEG en cantidades subestequiométricas (por ejemplo, 1/6), base, reactivo de acoplamiento y disolventes apropiados (por ejemplo, DMF, DCM, THF). Como alternativa al acoplamiento de reactivos, se puede usar el éster activado del enlazador Ns-MPEG.

30 El procedimiento de dimerización también puede formarse en solución utilizando el éster activado (por ejemplo, pentafluorofenilo, succinimida) del enlazador Ns-MPEG junto con 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) o hidroxibenzotriazol (HOBt) y péptido protegido de cadena lateral apropiada (por ejemplo, terc-butilo) en el disolvente (por ejemplo, ACN, DMF, DCM, THF). Además, la dimerización en solución se puede realizar utilizando el enlazador diácido Ns-MPEG, los reactivos de acoplamiento (por ejemplo, HBTU, HATU, etc.), la base y los disolventes.

35 El grupo Ns se elimina por mercaptoetanol y 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU) o por tiofenolato de sodio.

40 Enlazador y conjugación de ácidos grasos: El enlazador de aminoácidos se puede acoplar al nitrógeno libre del péptido unido a resina y MPEG dimerizado mediante acoplamientos consecutivos del enlazador Fmoc protegido (por ejemplo, Fmoc-Glu-OtBu, Fmoc-GABA, Fmoc-5-Ava-OH) utilizando el reactivo de acoplamiento y la base para la activación. Como alternativa al acoplamiento de reactivos, se puede usar éster activado de enlazadores de aminoácidos Fmoc protegidos. Los grupos Fmoc se eliminan posteriormente por procedimientos de desprotección.

45 El ácido graso se acopla al conjugado enlazador-dímero utilizando un reactivo de acoplamiento y una base para la activación. Alternativamente, se acopla como ésteres activados. Si el ácido graso contiene grupos carboxílicos, además del grupo carboxílico que reacciona con la amina del conjugado enlazador-dímero, estos pueden protegerse como ésteres, por ejemplo, como éster metílico.

Los ligandos diméricos enlazados a ácidos grasos pueden escindir de la resina con desprotección de cadena lateral concomitante usando ácidos, tales como TFA o HCl.

50 Los grupos de protección del éster se pueden eliminar agitando los productos escindidos en una base acuosa (por ejemplo, NaOH, LiOH) y acetonitrilo seguido de acidificación con TFA o HCl.

55 El compuesto final de la presente divulgación se obtiene mediante liofilización y purificación por HPLC o procedimientos cromatográficos similares.

En una realización adicional de la presente divulgación, la síntesis de los compuestos de la presente divulgación se realiza como se define en el ejemplo 1.

EJEMPLOS

60 Ejemplo 1: Síntesis

El ligando dimérico MPEG4 IETAV unido a la resina (SEQ ID NO:3) (11) se sintetizó como se describió anteriormente (Bach y col., PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322). A partir de esto, los enlazadores adecuadamente protegidos (Fmoc-GABA-OH, Fmoc-(L)-Glu-OtBu y Fmoc-5-Ava, respectivamente) se unieron al nitrógeno en el enlazador MPEG4 mediante dos acoplamientos subsiguientes utilizando HATU como el reactivo de acoplamiento seguido de desprotección con piperidina/DMF para obtener los productos intermedios 12-4 (Figura 6). Los ácidos grasos (FA1-4, Figura 6) se unieron fácilmente al nitrógeno liberado en los enlazadores utilizando condiciones de síntesis de péptidos en fase sólida y se escindieron de la resina con desprotección concomitante de los grupos protectores de la cadena lateral. El grupo protector de metilo terminal de los bloques de construcción de FA mono-protegidos (éster metílico del ácido dodecanodioico y éster metílico del ácido octadecanodioico, FA2 y FA4) se eliminaron mediante saponificación del producto escindido seguido de acidificación (Figura 6). Después de la liofilización, los productos brutos se disolvieron en DMSO al 100 % y se purificaron mediante C18 RP-HPLC a gran escala. Las fracciones semipuras (50-90 % de pureza) se liofilizaron, se volvieron a disolver en DMSO/ACN/H₂O y se purificaron mediante C4 RP-HPLC preparativa (> 95 % de pureza).

La Figura 6 ilustra la síntesis de ligandos diméricos enlazados a FA (1-12). Las condiciones de reacción del esquema 1 fueron las siguientes: (a) Fmoc-GABA-OH/Fmoc-(L)-Glu-OtBu/Fmoc-5-Ava, HATU, colidina, DMF (1 h x 2), después piperidina al 20 % en DMF; (b) FA1/FA2/FA3/FA4, HBTU, DIPEA, DMF/DCM, 45 min, después TFA/TIPS/H₂O (90/5/5); (c) LiOH 0,5 M, H₂O/ACN (75/25), 30 min, después TFA a pH < 2. El triángulo indica que E y T son cadenas laterales protegidas (terc-butilo).

El éster monometílico de octadecanodioato (FA4) no estaba disponible comercialmente y se sintetizó mediante monosaponificación del éster dimetílico correspondiente con un eq. de NaOH como se describió anteriormente (Jonassen y col., Pharm Res, 2012, 29, 2104-2114) (Figura 7).

En conclusión, el ejemplo 1 demuestra que los compuestos de la presente divulgación se pueden sintetizar y obtener en forma pura.

Ejemplo 2: Método para determinar la afinidad a HSA

Los ligandos diméricos enlazados a FA sintetizados (1-12) se evaluaron para determinar su afinidad a HSA utilizando un kit de ensayo de unión a HSA Transil^{XL} (Sovicell GMBH, Leipzig, Alemania). Los ligandos diméricos, UCCB01-125 (Bach y col., Angew.Chem, Int. Ed. 2009, 48, 9685-9689) y UCCB01-144 (Bach y col., PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322) también se probaron para comparación (Tabla 1, Figura 1).

El kit de ensayo consistía en pocillos prellenados con concentraciones crecientes de HSA inmovilizado, así como dos pocillos de control sin HSA. La HSA se había inmovilizado de forma aleatoria para garantizar que todos los sitios de unión en la HSA estuvieran disponibles. Para llevar a cabo el ensayo, los pocillos se incubaron con una concentración conocida de los compuestos analizados, y la cantidad no unida del compuesto se cuantificó utilizando RP-HPLC analítica (columna C8). La fracción de fármaco no unido (f_u) para cada punto de datos se calculó a partir de los datos de RP-HPLC en comparación con una muestra de control sin HSA. La relación de HSA-fármaco unidos ($f_b = 1 - f_u$) al fármaco no unido para cada punto de datos se representó luego contra la concentración total de HSA (C_{HSA}) en el pocillo y se ajustó a un modelo lineal dado por la ecuación 1, para obtener $1/K_D$ como la pendiente de la curva ajustada.

$$\text{Ecuación 1: } \frac{f_b}{f_u} = \frac{1}{K_D} C_{HSA}$$

En la ec.1, se asume que la concentración de HSA unida a fármaco ($[HSA-D]$) es mucho menor que la concentración total de HSA en el pocillo ($[HSA-D] \ll C_{HSA}$). El kit de ensayo ha sido diseñado de tal manera que el supuesto es válido para compuestos donde $f_u > 1$ %. Los valores de K_D calculados se utilizaron para calcular f_b a la concentración fisiológica de HSA (588 μ M) utilizando la ecuación 2.

$$f_b = 1 - \frac{1}{1 + \frac{C_{HSA}}{K_D}}$$

Ecuación 2:

55

En conclusión, el ejemplo 3 demuestra que, y cómo, se puede determinar la unión de los compuestos de la presente divulgación a la albúmina sérica humana (HSA).

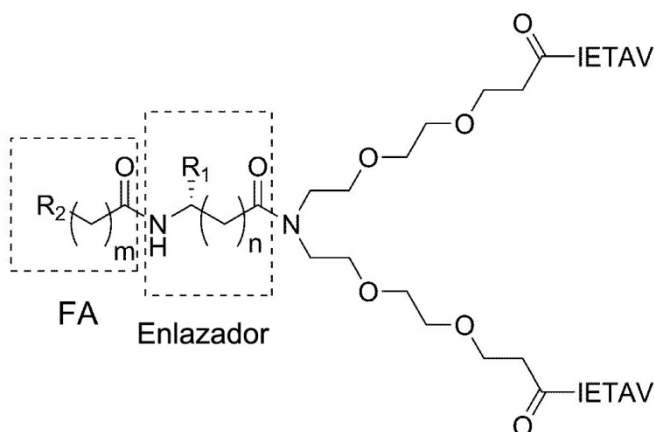
Ejemplo 3: Afinidad a HSA

5 Los ligandos diméricos UCCB01-125 y UCCB01-144, que no contienen FAs, mostraron afinidades a HSA de 154,3 μ M y 317,5 μ M; respectivamente, correspondientes a fracciones unidas a HSA (f_b) de 75 % y 65 % respectivamente (Tabla 1). Sin embargo, todos los ligandos diméricos enlazados a FA (**1-12**) mostraron una afinidad mucho mayor hacia HSA en comparación con los ligandos sin FA y, por consiguiente, valores de f_b más altos (Tabla 1). Por lo tanto, esto
10 demuestra claramente que la unión a HSA se mejora considerablemente como resultado de la conjugación de FA con los ligandos diméricos.

Los compuestos que contienen el enlazador 5-Ava más largo generalmente tienen una afinidad ligeramente menor para HSA que los compuestos con los enlazadores más cortos (GABA, γ Glu) (Tabla 1, Figura 2). El resto ácido
15 adicional en el enlazador γ Glu (R1) no parece tener ninguna influencia sobre la afinidad por HSA de los ligandos diméricos enlazados a FA sintetizados aquí (Tabla 1, Figura 2). Esto contrasta con lo que se ha observado en otros sistemas de proteína-ligando (Hackett y col, Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65, 1331-1339) e indica que el carboxilato libre del enlazador γ Glu no es una característica esencial para la unión a HSA para los presentes compuestos.

20 Los ligandos diméricos enlazados a FAs largos ($m = 16$) muestran una afinidad de HSA superior en comparación con los ligandos diméricos enlazados a FAs más cortos ($m = 10$) (Tabla 1); y un grupo carboxilo terminal (R2) tiene una influencia negativa en la afinidad de HSA (Tabla 1 y Figura 2).

Tabla 1: Unión a HSA y fracción calculada del compuesto unido a ligandos diméricos enlazados a FA (**1-12**) y ligandos
25 diméricos UCCB01-125 y UCCB01-144^a



| Compuesto | Enlazador | FA | m | R ₂ | K _D (HSA) (μ M) | f _b (%) |
|------------|---------------------------|------------|----|-----------------|---------------------------------|--------------------|
| 1 | | C12:0 | 10 | CH ₃ | 26,6 \pm 1,1 | 95,7 \pm 0,2 |
| 2 | GABA | C11:0-COOH | 10 | COOH | 49,3 \pm 4,7 | 92,3 \pm 0,7 |
| 3 | n=2, R ₁ =H | C18:0 | 16 | CH ₃ | 4,8 \pm 1,1 | 99,2 \pm 0,2 |
| 4 | | C17:0-COOH | 16 | COOH | 19,4 \pm 3,6 | 96,5 \pm 0,6 |
| 5 | | C12:0 | 10 | CH ₃ | 25,8 \pm 3,2 | 95,8 \pm 0,5 |
| 6 | γ Glu | C11:0-COOH | 10 | COOH | 64,6 \pm 9,3 | 90,1 \pm 1,3 |
| 7 | n=2, R ₁ =COOH | C18:0 | 16 | CH ₃ | 6,8 \pm 1,2 | 98,9 \pm 0,2 |
| 8 | | C17:0-COOH | 16 | COOH | 34,3 \pm 0,3 | 94,5 \pm 0,1 |
| 9 | | C12:0 | 10 | CH ₃ | 55,7 \pm 5,2 | 91,4 \pm 0,7 |
| 10 | 5-Ava, | C11:0-COOH | 10 | COOH | 240,0 \pm 11 | 71,0 \pm 1,0 |
| 11 | n=3, R ₁ =H | C18:0 | 16 | CH ₃ | 12,7 \pm 0,9 | 97,9 \pm 0,2 |
| 12 | | C17:0-COOH | 16 | COOH | 23,5 \pm 3,9 | 96,2 \pm 0,6 |
| UCCB01-125 | - | - | - | - | 154,3 \pm 15,8 | 77,6 \pm 1,8 |
| UCCB01-144 | - | - | - | - | 317,5 \pm 38,6 | 65,3 \pm 2,9 |

^aLos datos se muestran como la media \pm SEM, n = 3

En conclusión, el ejemplo 3 demuestra que los compuestos de la presente divulgación tienen una afinidad
30 incrementada por HSA en comparación con los péptidos de referencia diméricos no derivados de FA.

Ejemplo 4: Método para determinar la afinidad a PDZ1-2 de PSD-95:

La afinidad a PSD-95 se midió usando un ensayo de polarización de fluorescencia (FP) in vitro según lo descrito por Bach y col., (PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322). Primero, se obtuvo una curva de unión de saturación para determinar los valores de K_D para la interacción entre una sonda fluorescente dimérica y PSD-95 PDZ1-2. Se agregaron concentraciones crecientes de PDZ1-2 a una concentración constante (0,5 nM) de la sonda. La polarización de la fluorescencia de las muestras se midió a longitudes de onda de excitación/emisión de 635/670 nm y los valores de FP se ajustaron a un modelo de unión de un sitio utilizando el programa GraphPad Prism. Luego, la afinidad entre los ligandos diméricos no fluorescentes y PDZ1-2 se determinó en un ensayo de unión de competición heteróloga, donde se agregó una concentración creciente de ligando a una concentración fija de sonda dimérica (0,5 nM) y PDZ1-2 (4 nM). Los valores de FP se ajustaron a un modelo de competencia de un sitio (pendiente variable) en GraphPad Prism. La IC_{50} resultante se convirtió a constantes de inhibición de competición, valores de K_i , como se describe (Nikolovska-Coleska y col., Anal Biochem, 2004, 332, 261-273). El ensayo de FP modificado se realizó como se describió anteriormente con HSA al 1 % en el ensayo.

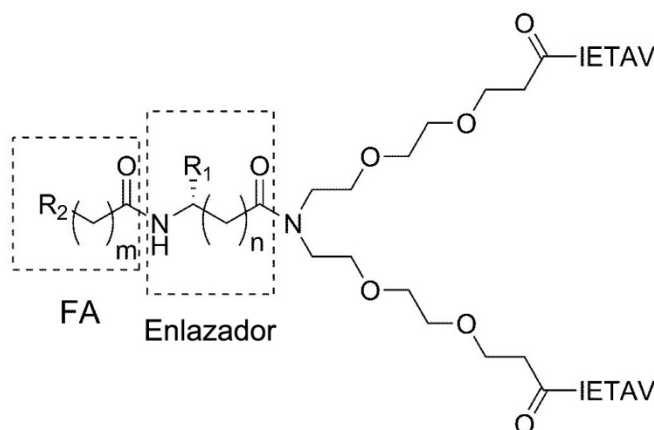
En conclusión, el ejemplo 4 demuestra cómo probar la unión de los compuestos de la presente divulgación, a PDZ1-2 de PSD-95.

20 Ejemplo 5: Afinidad a PDZ1-2 de PSD-95:

Los ligandos diméricos enlazados a FA sintetizados se evaluaron para determinar su afinidad a PDZ1-2 de PSD-95 en el ensayo de FP. UCCB01-125 y UCCB01-144 se usaron como compuestos de referencia (Bach y col., PNAS USA, 2012, 109, 3317-3322) (Tabla 2, Figura 3). Primero se midieron las afinidades utilizando un simple tampón de solución salina tamponada con tris (TBS) (Tabla 2, Figura 3A); pero, además, se investigó si HSA influyó en la capacidad de los dímeros enlazados a FA para unirse a PDZ1-2 de PSD95 mediante la realización del ensayo de FP con HSA presente en el tampón de ensayo (Tabla 2, Figura 3B). Debido a la unión de la sonda a HSA en concentraciones más altas, la concentración de HSA se estableció aquí en 1 % (~150 μ M), aproximadamente 4 veces más baja que la concentración en sangre fisiológica estimada (520-830 μ M) (Kragh-Hansen y col., Biol Pharm Bull 2002, 25, 695-704).

Para un fármaco tradicional de molécula pequeña, se acepta comúnmente que la fracción no unida del fármaco es libre de difundirse a través de las membranas y ejerce el efecto fisiológico al interactuar con su diana (Berezhkovskiy y col., J Pharm Sci 2007, 96, 249-257). Es decir, si el fármaco está unido a otra molécula, entonces no puede interactuar con la diana al mismo tiempo. Para tener en cuenta esto, la fracción del fármaco no unido (f_u) se calculó a partir de la ecuación 2 ($f_u = 1 - f_b$) a una concentración de HSA de 150 μ M, y los datos del ensayo de FP (TBS + HSA) se corrigieron para el f_u calculado (Tabla 2, Figura 3C).

Tabla 2: Afinidad por PDZ1-2 de PSD-95 de ligandos diméricos enlazados a FA (1-12) y ligandos diméricos (UCCB01-125 y UCCB01-144) según lo determinado por FP^a, fracción calculada de fármaco no unido (f_u)^b, datos^a de FP de f_u corregida y tiempo de retención (R_t) de los compuestos determinados por RP-HPLC (columna C8)^c.



| Compuesto | Enlazador | FA | m | R ₂ | K _i (PSD95) (nM) | K _i (PSD95) + HSA (μ m) | f _u (%) | K _i (PSD95), ligando libre (nM) | R _t (min) |
|-----------|-----------|----|---|----------------|-----------------------------|---|--------------------|--|----------------------|
|-----------|-----------|----|---|----------------|-----------------------------|---|--------------------|--|----------------------|

| | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------------------|------------|----|-----------------|------------|------------|------|------------|----|
| 1 | | C12:0 | 10 | CH ₃ | 13,6 ± 0,6 | 27,2 ± 2,9 | 15,1 | 3,2 ± 1,0 | 46 |
| 2 | GABA | C11:0-COOH | 10 | COOH | 15,4 ± 1,2 | 27,9 ± 2,7 | 24,7 | 5,5 ± 0,7 | 38 |
| 3 | n=2, R ₁ =H | C18:0 | 16 | CH ₃ | 11,1 ± 0,6 | 1889 ± 155 | 3,1 | 57,2 ± 4,9 | 61 |
| 4 | | C17:0-COOH | 16 | COOH | 11,4 ± 0,6 | 5717 ± 298 | 11,5 | 654 ± 34 | 48 |
| 5 | γGlu | C12:0 | 10 | CH ₃ | 30,2 ± 4,2 | 24,0 ± 0,6 | 14,7 | 2,4 ± 0,1 | 46 |
| 6 | | C11:0-COOH | 10 | COOH | 33,7 ± 1,6 | 26,4 ± 2,6 | 30,1 | 7,0 ± 0,9 | 37 |
| 7 | n=2, R ₁ =COOH | C18:0 | 16 | CH ₃ | 17,0 ± 0,6 | 1391 ± 184 | 4,3 | 59,1 ± 7,8 | 59 |
| 8 | | C17:0-COOH | 16 | COOH | 9,2 ± 1,6 | 3594 ± 132 | 18,6 | 669 ± 25 | 47 |
| 9 | 5-Ava, | C12:0 | 10 | CH ₃ | 20,5 ± 1,1 | 13,4 ± 1,4 | 27,1 | 2,6 ± 0,5 | 48 |
| 10 | | C11:0-COOH | 10 | COOH | 13,9 ± 2,1 | 18,5 ± 0,6 | 61,5 | 10,9 ± 0,4 | 38 |
| 11 | n=2, R ₁ =H | C18:0 | 16 | CH ₃ | 26,5 ± 0,2 | 1889 ± 100 | 7,8 | 16,8 ± 3,3 | 61 |
| 12 | | C17:0-COOH | 16 | COOH | 11,5 ± 1,2 | 2926 ± 335 | 8,3 | 250 ± 37 | 49 |
| UCCB01-125 | - | - | - | - | 14,3 ± 1,1 | 9,7 ± 1,0 | 50,7 | 4,1 ± 0,5 | 28 |
| UCCB01-144 | - | - | - | - | 4,3 ± 0,1 | 10,5 ± 0,9 | 67,9 | 6,7 ± 0,6 | 24 |

^aDatos de FP registrados en TBS y en TBS con 1 % HSA. Los datos se muestran como media ± SEM, n ≥ 3.

^bF_u calculada de acuerdo con la ecuación 2, f_b = 1-f_u, ^cn = 1.

La afinidad por PSD-95 PDZ1-2 en TBS fue comparable para todos los ligandos diméricos enlazados a FA a las afinidades de UCCB01-125 (Tabla 2, Figura 3A), mostrando que la afinidad para PSD-95 PDZ1-2 no fue influenciada por la derivatización de FA.

5

La afinidad por PSD-95 PDZ1-2 en TBS con HSA al 1 % varió significativa y sistemáticamente entre los compuestos (Tabla 2, Figura 3B). Los ligandos diméricos que se enlazaron a los FA más largas (C18:0 o C17:0-COOH) generalmente tenían una afinidad aparente > 50 veces menor para PSD-95 PDZ1-2 que los ligandos diméricos enlazados a los FA más cortos (C12:0 o C11:0-COOH).

10

Cuando los datos de FP se corrigieron para f_u (Tabla 2, Figura 3C), se reveló una clasificación sistemática de las afinidades para PSD-95 PDZ1-2 dentro de cada serie de enlazadores. Los ligandos diméricos unidos a C12:0 (**1**, **5**, **9**) tuvieron la afinidad más alta, seguido de C11:0-COOH (**2**, **6**, **10**), C18:0 (**3**, **7**, **11**) y C17:0-COOH (**4**, **8**, **12**).

15 Los datos de FP de F_u corregida también revelaron que la pérdida de afinidad observada en 50 veces de los ligandos diméricos **3**, **7** y **11** enlazados a C18:0 cuando la medición de FP se realizó en TBS + HSA fue causada principalmente por una unión alta de los compuestos a HSA, aunque se observó una disminución de 4 a 5 veces en la afinidad por PSD-95 para **3** y **7**, en comparación con los datos de FP registrados en TBS (**3**:K_i = 57,2 nM vs 11,1 nM; **7**:K_i = 59,1 nM vs 17,0 nM, Tabla 2) en el caso actual, la reducción en la afinidad fue dependiente de HSA, ya que no se observó una disminución en la afinidad en TBS.

Los dos ligandos diméricos **11** y **12** enlazados a 5-Ava estaban menos afectados por HSA que los ligandos diméricos correspondientes a GABA y γGlu (**3**, **4**, **7** y **8**).

En conclusión, el ejemplo 5 demuestra que los compuestos de la presente divulgación se unen a PDZ1-2 de PSD-95.

25

Ejemplo 6: Hidrofobicidad de ligandos diméricos enlazados a FA

Los compuestos con la mayor afinidad para HSA (**3**, **7**, **11**) también fueron los más hidrófobos de los compuestos sintetizados, según lo determinado por el tiempo de retención (R_t) determinado por RP-HPLC analítica (Tabla 2). En un intento por aumentar la hidrofiliidad y, por lo tanto, la solubilidad de estos compuestos, se crearon los análogos de **3** y **7**, donde la secuencia peptídica se reemplazó con IETDV (SEQ ID NO:4) en lugar de IETAV (SEQ ID NO:3) (**13**, **15**; Tabla 3), ya que la carga adicional introducida por el resto Asp (D) podría aumentar la hidrofiliidad de los dímeros. También se sintetizó y analizó un análogo de IETDV del compuesto de afinidad de HSA más alta que contiene un resto ácido terminal (**4**) para su comparación (**14**). Estos dímeros enlazados a FA se sintetizaron de manera análoga a **1-12** (Figura 6) utilizando la secuencia peptídica apropiada (IETDV) como punto de partida.

35

El análisis por HPLC reveló una disminución menor o nula en los valores de R_t , y por lo tanto la hidrofobicidad, para compuestos basados en IETDV (**13-15**) en relación con compuestos basados en IETAV (**3, 4, 7**); pero se observó una reducción sistemática en las afinidades de HSA (Tabla 3). Por ejemplo, **13** se eluyó 3 minutos antes en la RP-HPLC analítica que en el análogo de IETAV (**13**: 58 min, **3**: 61 min, Tabla 3), pero la afinidad HSA se redujo (**13**: $K_D = 83,0$ μM , **3**: $K_D = 4,8$ μM , tabla 3).

Tabla 3: Comparación de análogos diméricos enlazados a FA con diferentes secuencias peptídicas. Secuencia peptídica 3, 4 y 7 IETAV (SEQ ID NO:3); secuencia peptídica 13, 14 y 15 IETDV (SEQ ID NO:4).

| Compuesto | Enlazador | FA | $K_D(\text{HSA})$ (μM) | $K_i(\text{PSD95})$ (nM) | $K_i(\text{PSD95}) +$ HSA (μM) | f_u (%) | $K_i(\text{PSD95}),$ ligando libre (nM) | R_t (min) |
|-----------|--------------------|----------------|--|-----------------------------|--|--------------|---|----------------|
| 3 | GABA | C18:0 | $4,8 \pm 1,1$ | $11,1 \pm 0,6$ | 1889 ± 155 | 3,1 | $57,2 \pm 4,9$ | 61 |
| 4 | GABA | C17:0- COOH | $19,4 \pm 3,6$ | $11,4 \pm 0,6$ | 5717 ± 298 | 11,5 | 654 ± 34 | 48 |
| 7 | γGlu | C18:0 | $6,8 \pm 1,2$ | $17,0 \pm 0,6$ | 1391 ± 184 | 4,3 | $59,1 \pm 7,8$ | 59 |
| 13 | GABA | C18:0 | $83,0 \pm$ $11,0$ | $8,0 \pm 0,8$ | 2514 ± 149 | 35,6 | 896 ± 53 | 58 |
| 14 | GABA | C17:0- COOH | $116,0 \pm$ $7,6$ | $29,3 \pm 0,7$ | 770 ± 27 | 43,6 | 1097 ± 65 | 47 |
| 15 | γGlu | C18:0 | $55,0 \pm 3,4$ | $6,7 \pm 0,6$ | 3806 ± 287 | 26,8 | 1022 ± 77 | 59 |

10

En conclusión, el ejemplo 6 demuestra que la afinidad por HSA depende no solo del ácido graso de elección, sino también de la secuencia peptídica elegida.

Ejemplo 7: Estabilidad plasmática del compuesto 1, 4, 7 y 13)

15

La estabilidad en plasma de **1, 4, 7 y 13** se evaluó en una versión modificada de un ensayo de estabilidad en plasma *in vitro* (Bach y col., Angew.Chem, Int. Ed, 2009, 48, 9685-9689). En el procedimiento original, el compuesto investigado se incubó en plasma humano. Las muestras se extrajeron en puntos de tiempo apropiados y las proteínas séricas se eliminaron por precipitación con ácido tricloroacético (TCA), seguido de un análisis de los sobrenadantes por RP-HPLC. Las áreas de los picos obtenidos se normalizaron a la cantidad en T_0 y se ajustaron a un modelo de decaimiento de primer orden para calcular la semivida. Cuando este procedimiento se aplicó a los ligandos diméricos enlazados a FA, las recuperaciones de la muestra fueron bajas (< 5 %). Esto se debió a la eliminación de los ligandos diméricos enlazados a FA como complejos unidos a HSA durante la precipitación de TCA. Por lo tanto, la disolución de la muestra en clorhidrato de guanidina sólido (GnHCl) a una concentración final de 6 M se realizó antes de la precipitación del TCA. El fin de esto fue desplegar la HSA en la muestra, liberando el ligando dimérico enlazado a FA.

Todos los ligandos diméricos enlazados a FA fueron más estables en el ensayo de estabilidad en plasma *in vitro* que UCCB01-125 (Figura 4). Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se espera que esto se deba a la mayor unión de HSA a los compuestos, lo que reduce la concentración libre de compuestos disponibles para la digestión enzimática. El compuesto que contiene el C12:0 FA más corto (**1**) se degradó más rápido que los compuestos que contienen el FA C18:0 más largo o C17:0-COOH (**4, 7, 13**), que eran altamente estables. La estabilidad prolongada se explica por el aumento de la afinidad a HSA, que evita que las proteasas escindan los compuestos a base de péptidos diméricos, y el impedimento estérico mediado por FA.

En conclusión, el ejemplo 7 demuestra un procedimiento de evaluación de la estabilidad del plasma sanguíneo *in vitro*, y que los compuestos diméricos enlazados a FA de la presente divulgación tienen una mayor estabilidad y semivida en plasma en comparación con los compuestos de referencia no enlazados a FA.

Ejemplo 8: Estudios farmacocinéticos *in vivo*

40

Para determinar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos enlazados a FA, se midió la concentración de compuestos seleccionados en sangre mediante LC-MS/MS después de una inyección de un bolo subcutánea (s.c.) en ratas Wistar macho (Figura 5). A partir de esto, fue evidente que todos los ligandos diméricos enlazados a FA tienen $T_{1/2}$ y mayor T_{max} que el ligando dimérico sin FA (UCCB01-125) (Tabla 4 y Figura 5). El efecto fue más pequeño para **1**, pero muy notable para **4, 7 y 13**, que mostró $T_{1/2}$ más de 8 horas, lo que corresponde a un aumento de > 16 veces en relación con UCCB01-125. El aumento de T_{max} se explica por una absorción prolongada del sitio de inyección. En general, estas propiedades permiten la administración mediante inyecciones de depósito s.c. y, por lo tanto, la liberación lenta y constante de compuesto en la sangre, por lo que se necesitan menos administraciones para mantener las concentraciones de sangre relevantes farmacéuticas.

Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos de ligandos diméricos enlazados a FA después de la inyección s.c. en ratas

| Compuesto | Enlazador | FA | Secuencia peptídica | Dosis (mg/kg) | T _½ (h) ^a | T _{max} (h) ^a |
|------------|-----------|------------|---------------------|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| UCCB01-125 | - | - | IETAV | 3 | 0,561 ± 0,101 | 0,5 ± 0 |
| | | | | 30 | 0,450 ± 0,068 | 0,5 ± 0 |
| 1 | GABA | C12 | IETAV | 15 | 0,768 ± 0,045 | 0,833 ± 0,167 |
| 4 | GABA | C17:0-COOH | IETAV | 15 | 8,13 ± 0,50 | 4,67 ± 0,66 |
| 7 13 | γGlu | C18:0 | IETAV | 10 | 10,7 ± 0,58 | 6,00 ± 1,15 |
| | GABA | C18:0 | IETDV | 10 | 16,3 ± 2,81 | 8,00 ± 0 |

^aLos datos se dan como media ± SEM, n = 3.

5 Ejemplo 9: Secuencias

SEQ ID NO:1

X₄X₃X₂X₁

10

donde

X₄ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S,

X₃ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T,

15 X₂ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S y N-Me-V

X₁ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V

SEQ ID NO:2

20

Z₄Z₃Z₂Z₁

donde

25 Z₄ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S,

Z₃ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T,

Z₂ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S y N-Me-V

Z₁ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V

30

SEQ ID NO:3

IETAV

SEQ ID NO:4

35

IETDV

SEQ ID NO:5

40

X₅X₄X₃X₂X₁

donde

X₅ es cualquier residuo de aminoácido,

45 X₄ es un aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S,

X₃ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T,

X₂ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S y N-Me-V

X₁ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V

SEQ ID NO:6

5 Z₅Z₄Z₃Z₂Z₁

donde

Z₅ es cualquier residuo de aminoácido,

10 Z₄ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S,

Z₃ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T,

Z₂ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S y N-Me-V

Z₁ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Copenhague

20 <120> Derivados de ácidos grasos de inhibidores diméricos de PSD-95

<130> P3416PC00

<160> 6

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

30 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> X es independientemente cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

<222> (1)..(4)

40 <223> Péptido 1

<220>

<221> SITIO

<222> (1)..(1)

45 <223> X₄ en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S

<220>

<221> SITIO

<222> (2)..(2)

50 <223> X₃ en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T

<220>

<221> SITIO

<222> (3)..(3)

55 <223> X₂ en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N-Me-S y N-Me-V

<220>

<221> SITIO

60 <222> (4)..(4)

<223> X₁ en la descripción residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa
1

5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> X es independientemente cualquier aminoácido

15 <220>

<221> SITIO

<222> (1)..(4)

<223> Péptido 2

20 <220>

<221> SITIO

<222> (1)..(1)

<223> Z4 en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S

25 <220>

<221> SITIO

<222> (2)..(2)

<223> Z3 en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T

30 <220>

<221> SITIO

<222> (3)..(3)

<223> Z2 en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N -Me-S y N-Me-V

35

<220>

<221> SITIO

<222> (4)..(4)

<223> Z1 en la descripción residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V

40

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa
1

45 <210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> péptido específico

<220>

<221> PÉPTIDO

55 <222> (1)..(5)

<223> Péptido específico

<400>3

60

Ile Glu Thr Ala Val
1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido específico

10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(5)
 <223> péptido específico

15 <400>4

Ile Glu Thr Asp Val
1 5

20 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> X es independientemente cualquier aminoácido

<220>
 <221> SITIO

30 <222> (1)..(1)
 <223> X5 en la descripción cualquier residuo de aminoácido

<220>
 <221> SITIO

35 <222> (2)..(2)
 <223> X4 en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S

<220>
 <221> SITIO

40 <222> (3)..(3)
 <223> X3 en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T

<220>
 <221> SITIO

45 <222> (4)..(4)
 <223> X2 en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N -Me-S y N-Me-V

50 <220>
 <221> SITIO
 <222> (5)..(5)
 <223> X1 en la descripción residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V

55 <400> 5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

60 <210> 6
 <211> 5

ES 2 716 890 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> X es independientemente cualquier aminoácido

5
<220>
<221> SITIO
<222> (1)..(1)
<223> Z5 en la descripción cualquier residuo de aminoácido

10
<220>
<221> SITIO
<222> (2)..(2)
<223> Z4 en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S

15
<220>
<221> SITIO
<222> (3)..(3)
<223> Z3 en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T

20
<220>
<221> SITIO
<222> (4)..(4)
<223> Z2 en la descripción; residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-
25 Me-E, N-Me-Q, N-Me-N, N -Me-S y N-Me-V

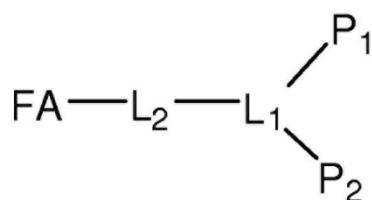
<220>
<221> SITIO
<222> (5)..(5)
30 <223> Z1 en la descripción residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V

<400> 6

35
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un ligando dimérico de PSD-95 que comprende un primer péptido (P_1) y un segundo péptido (P_2), donde P_1 y P_2 comprenden individualmente al menos dos residuos de aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos, tanto P_1 como P_2 están conjugados a un primer enlazador L_1 a través de sus extremos N-terminales, L_1 comprende polietilenglicol (PEG) donde al menos un átomo de oxígeno de dicho PEG está sustituido con un átomo de nitrógeno para dar MPEG, un resto de unión a albúmina está enlazado al átomo de nitrógeno del MPEG mediante un enlace amida, o mediante un enlazador opcional L_2 , donde L_2 comprende un átomo de nitrógeno,
 5 el resto aglutinante de albúmina es un ácido graso (FA),
 10 y donde dicho ligando dimérico tiene la estructura genérica de fórmula (II), donde L_2 es opcional:

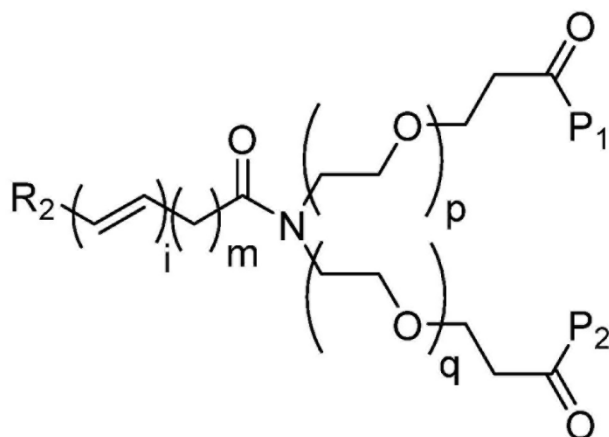


Fórmula (II)

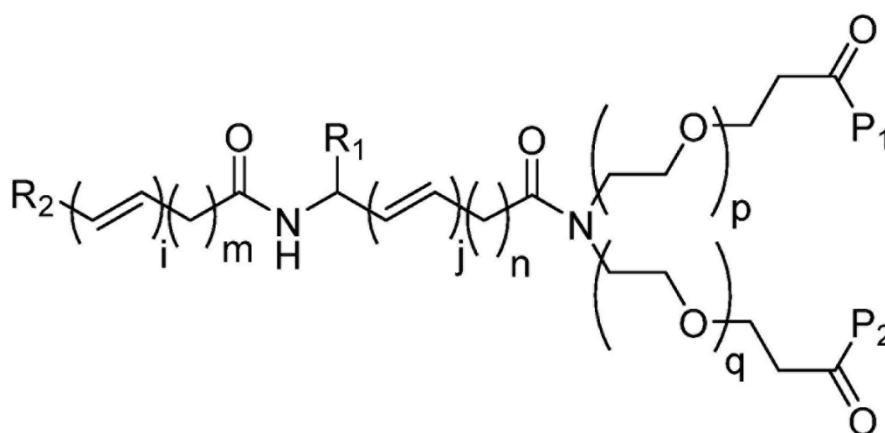
- 15 o un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptables de estos.

2. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el segundo enlazador L_2 comprende uno o más restos seleccionados de entre el grupo que consiste en γ -Glu, ácido γ -butírico (GABA), ácido 5-amino valérico (5-Ava), aminoácidos proteinogénicos, aminoácidos no proteinogénicos y cualquier ligando dimérico que tenga la fórmula general $\text{H}_2\text{N}[\text{Q}]\text{COOH}$, donde Q es cualquier átomo o átomos adecuados.
 20

3. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho ligando dimérico tiene la estructura genérica de fórmula (III) o (IV):
 25



Fórmula (III)



Fórmula (IV)

donde

- 5 R_1 y R_2 se seleccionan individualmente de entre el grupo que consiste en H y COOH,
 n es un entero de 0 a 48,
 m es un entero de 1 a 48,
 p es un entero de 0 a 28,
 q es un entero de 0 a 28,
 10 i es un entero de 0 a 12,
 j es un número entero de 0 a 12

P_1 y P_2 se seleccionan individualmente de entre péptidos que comprenden al menos dos residuos de aminoácidos
 15 proteinogénicos o no proteinogénicos.

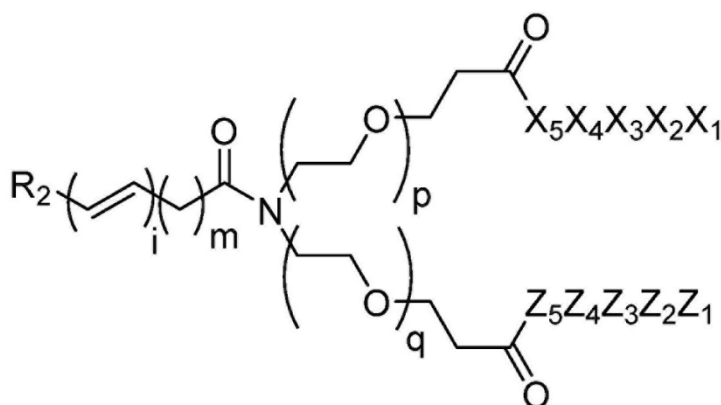
4. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ácido
 graso es un ácido graso C_4 - C_{22} .
 5. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ácido
 20 graso se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico,
 ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico, ácido miristoleico,
 ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido elaidico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido linoelaídico,
 ácido α -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúxico y ácido docosaheptaenoico.
 25 6. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde

P_1 comprende la secuencia de aminoácidos $X_4X_3X_2X_1$ (SEQ ID NO:1), y
 P_2 comprende la secuencia de aminoácidos $Z_4Z_3Z_2Z_1$ (SEQ ID NO:2),
 donde

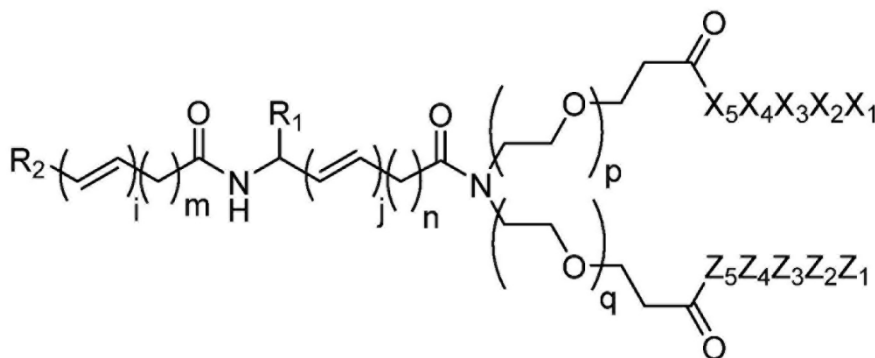
- X₁ y/o Z₁ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V,
 X₂ y/o Z₂ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q,
 N-Me-N, N-Me-S y N-Me-V,
 X₃ y/o Z₃ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T,
 5 X₄ y/o Z₄ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S,

donde X₁ y Z₁ representan individualmente el último residuo de aminoácido C-terminal que comprende un ácido carboxílico libre.

- 10 7. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho ligando dimérico tiene la estructura genérica de fórmula (V) o (VI):



Fórmula (V)



Fórmula (VI)

- 15 donde

R₁ y R₂ se seleccionan individualmente de entre el grupo que consiste en H y COOH,

n es un entero de 0 a 48,

m es un entero de 1 a 48,

- 20 p es un entero de 0 a 28,

q es un entero de 0 a 28,

i es un entero de 0 a 12,

j es un número entero de 0 a 12

X₅ y/o Z₅ son/es un residuo de aminoácido proteínogénico o no proteínogénico opcional, un péptido o un polipéptido,

- 25 X₄ y/o Z₄ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre E, Q, A, N y S,

X₃ y/o Z₃ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre S y T,

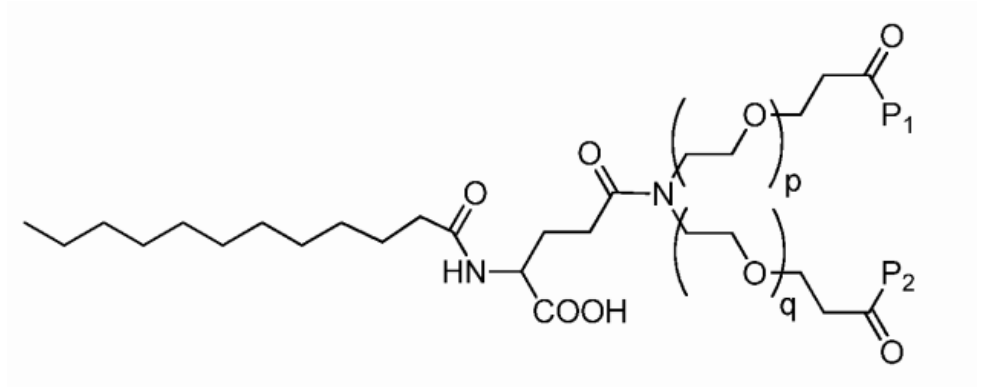
X₂ y/o Z₂ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre A, D, E, Q, N, S, V, N-Me-A, N-Me-D, N-Me-E, N-Me-Q,
 N-Me-N, N-Me-S y N-Me-V

X₁ y/o Z₁ es un residuo de aminoácido seleccionado de entre I, L y V.

8. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde X_5 es un residuo de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en I, A, L y V.

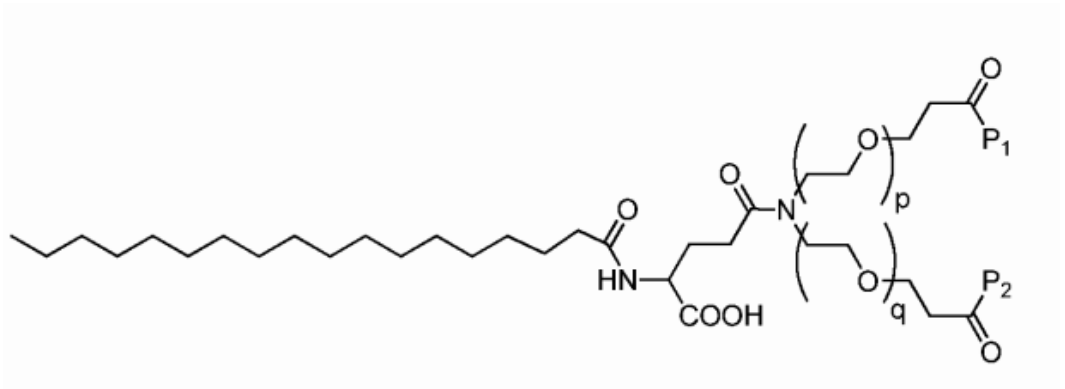
5 9. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ligando dimérico se selecciona de entre el grupo que consiste en:

a) Derivado KBN41 (5)



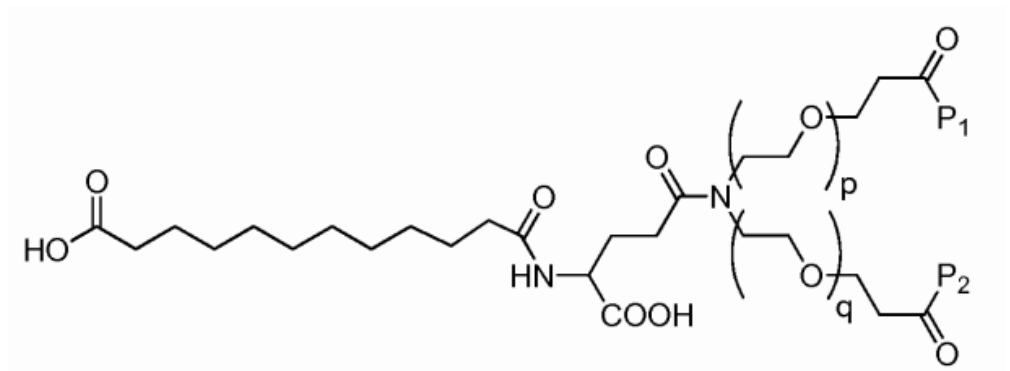
10

b) Derivado KBN42 (7)

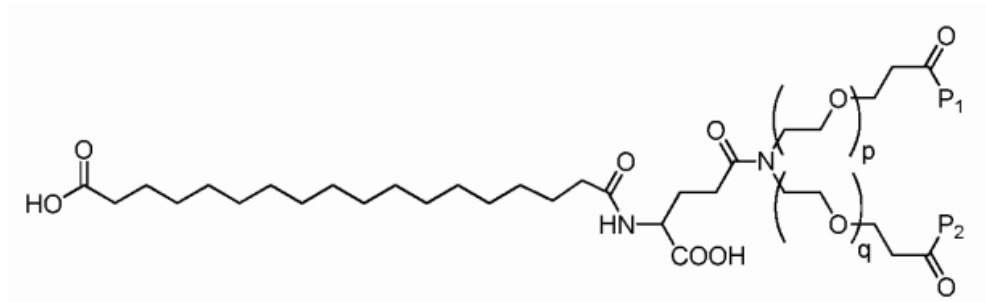


15

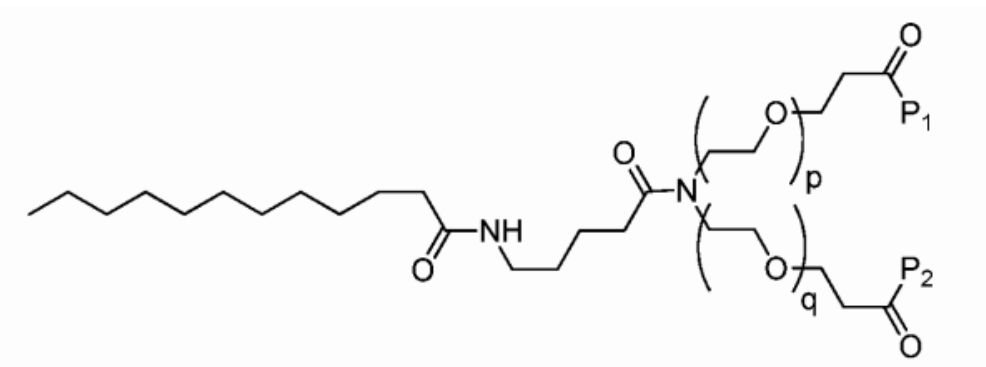
c) Derivado KBN43 (6)



20 d) Derivado KBN44 (8)

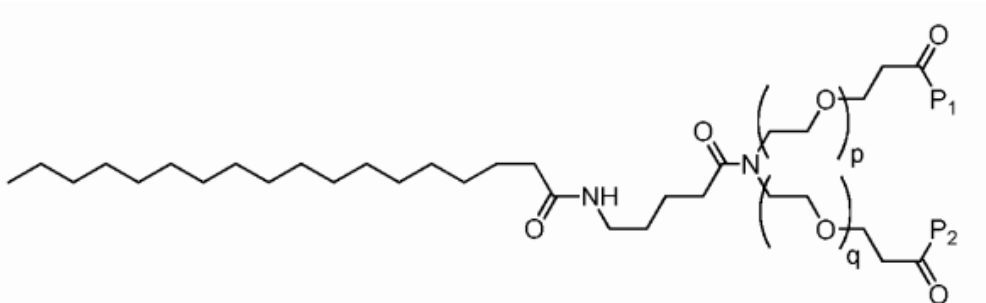


e) Derivado KBN45 (9)



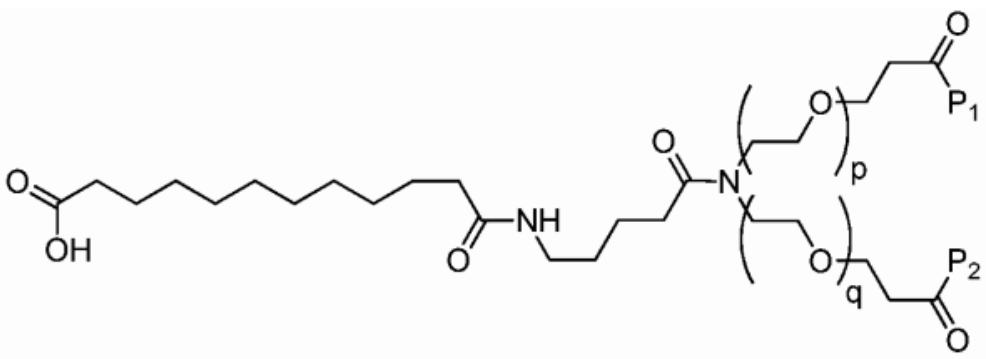
5

f) Derivado KBN46 (11)

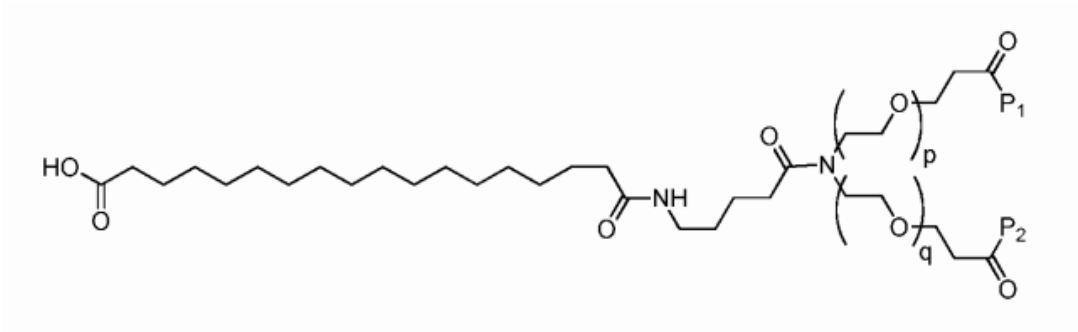


10

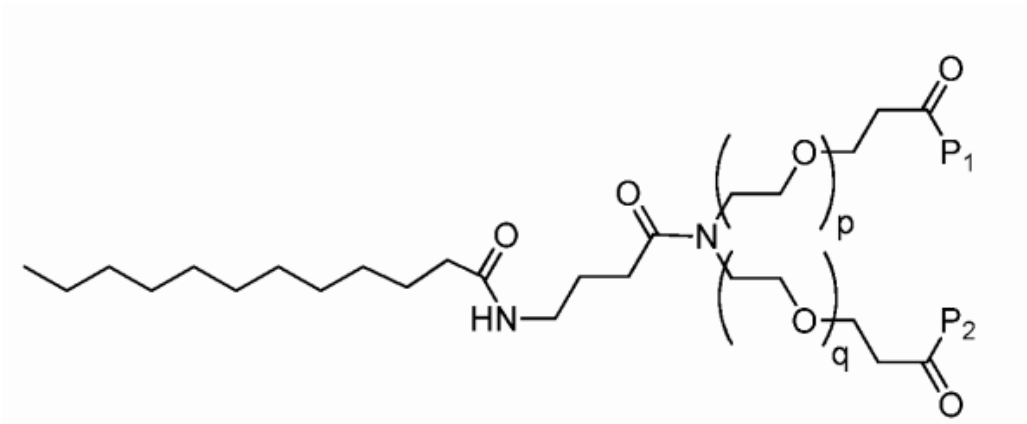
g) Derivado KBN47 (10)



15 h) Derivado KBN48 (12)

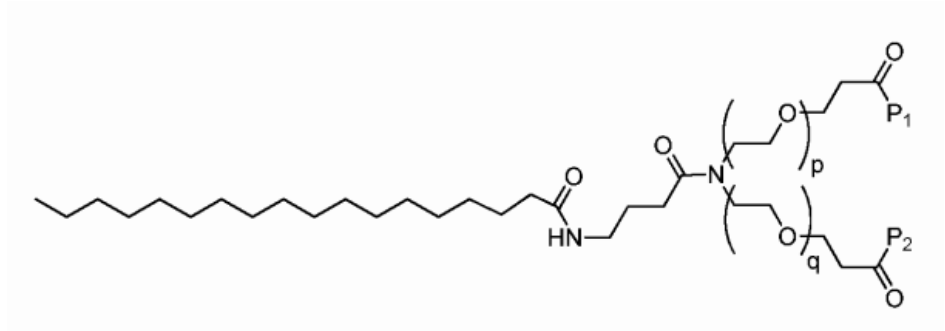


i) Derivado KBN52 (1)



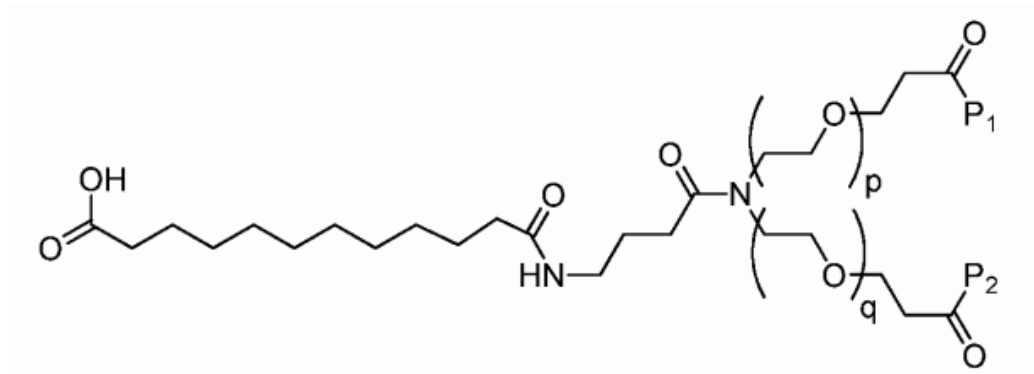
5

j) Derivado KBN53 (3)

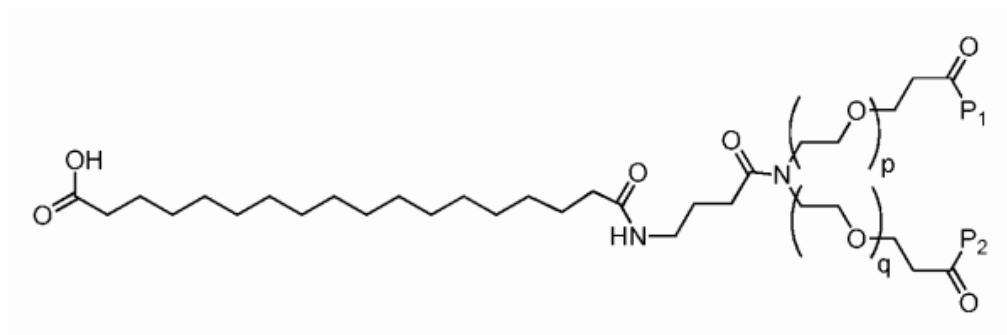


10

k) Derivado KBN54 (2)



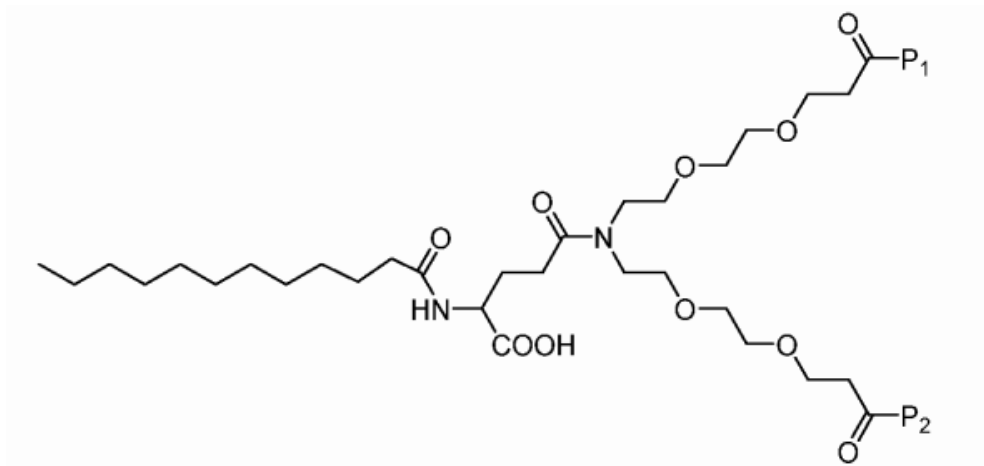
l) Derivado KBN55 (4)



5

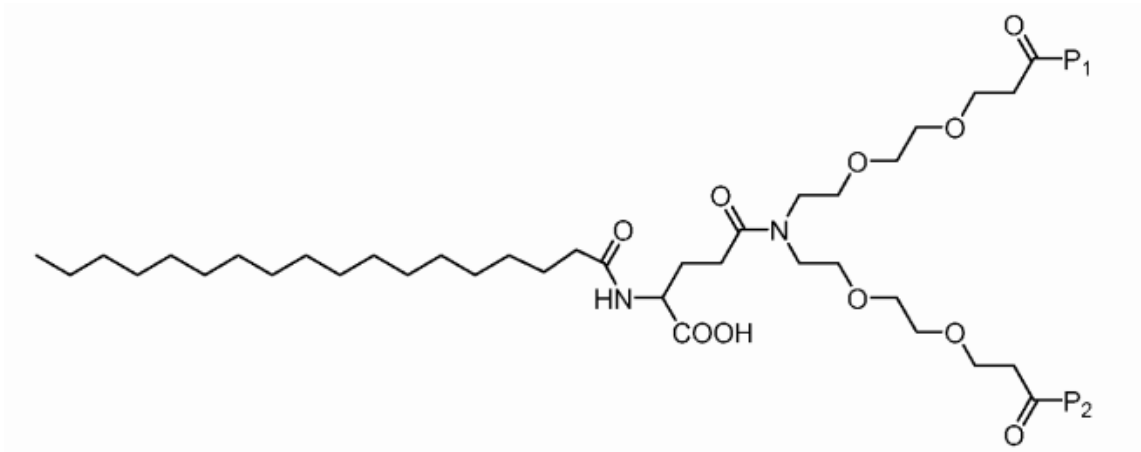
10. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ligando dimérico se selecciona de entre el grupo que consiste en:

10 a) Derivado KBN41 (5)

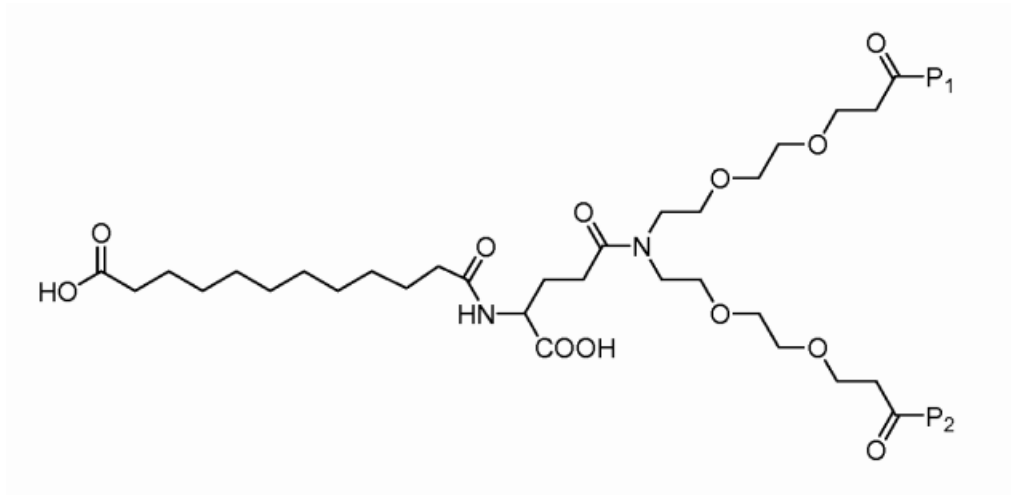


b) Derivado KBN42 (7)

15

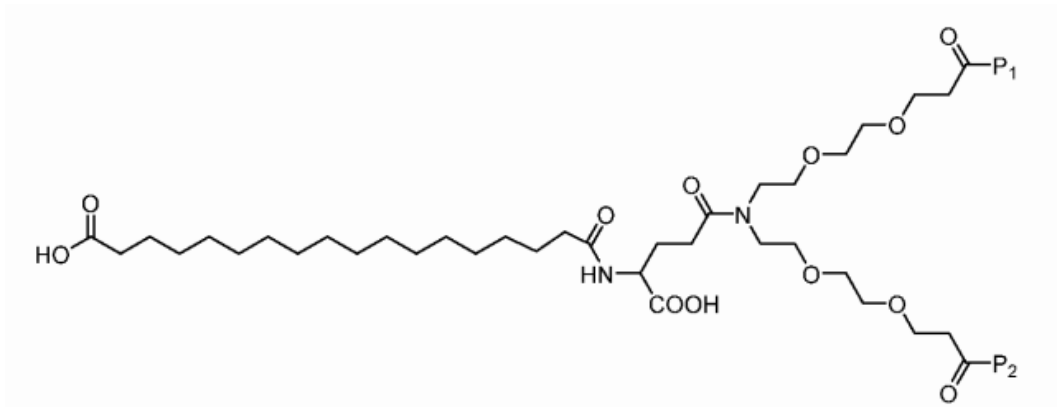


c) Derivado KBN43 (6)



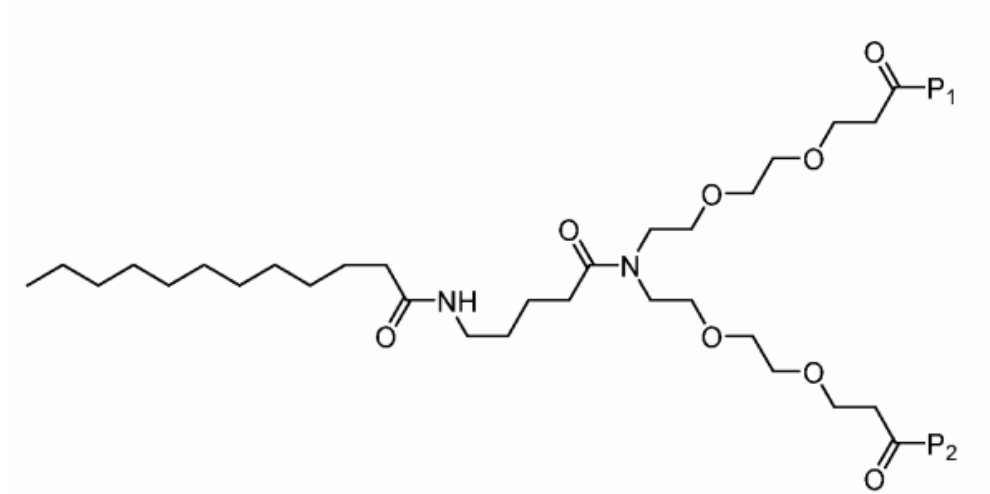
5

d) Derivado KBN44 (8)

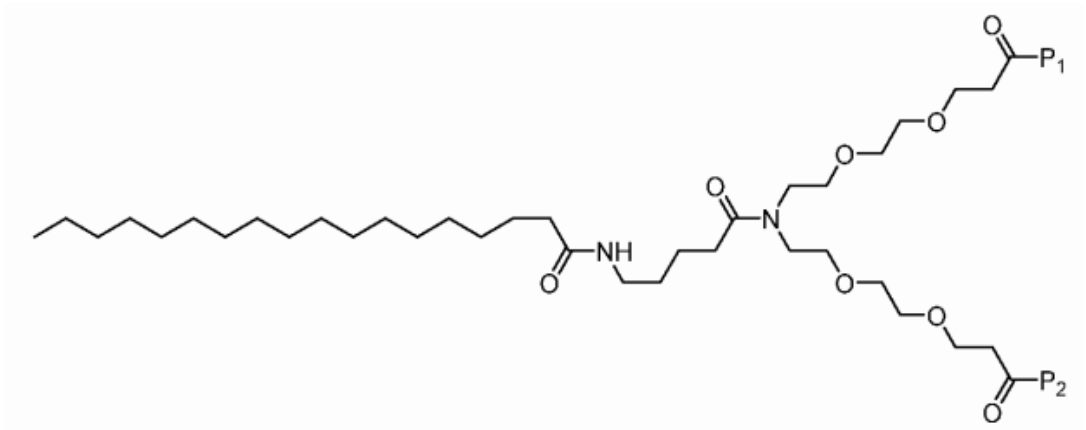


10

e) Derivado KBN45 (9)

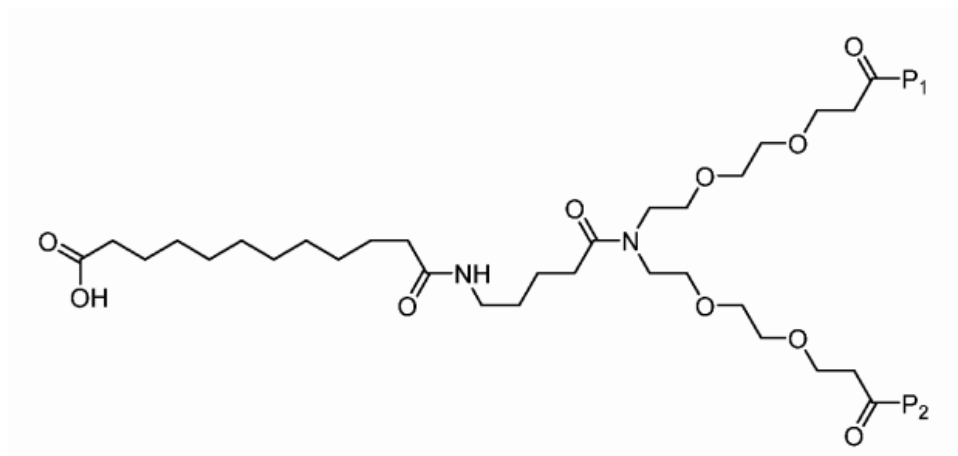


f) Derivado KBN46 (11)



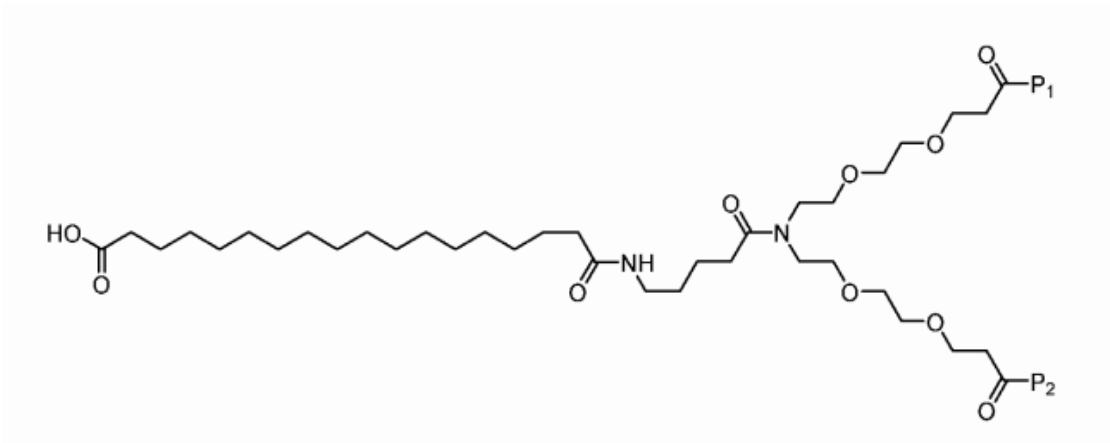
5

g) Derivado KBN47 (10)

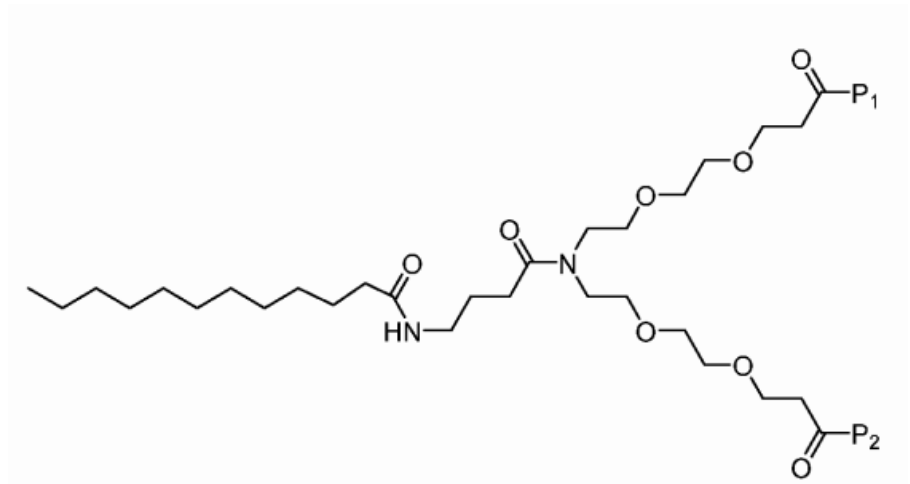


10

h) Derivado KBN48 (12)

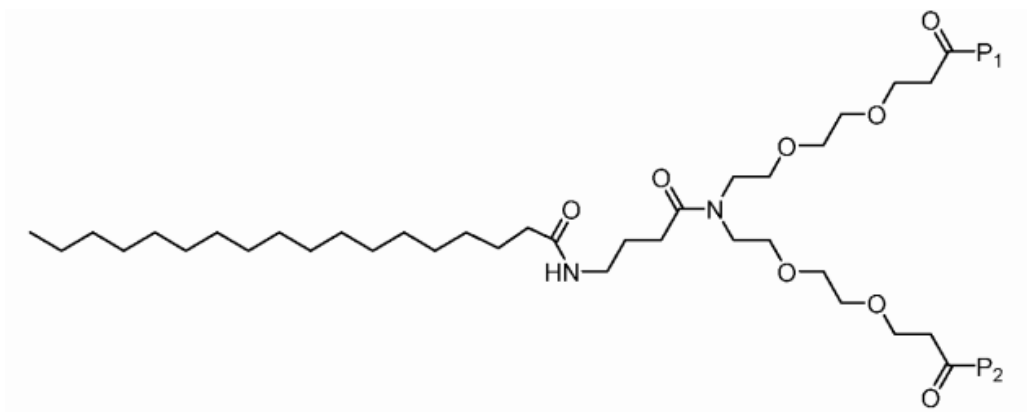


i) Derivado KBN52 (1)



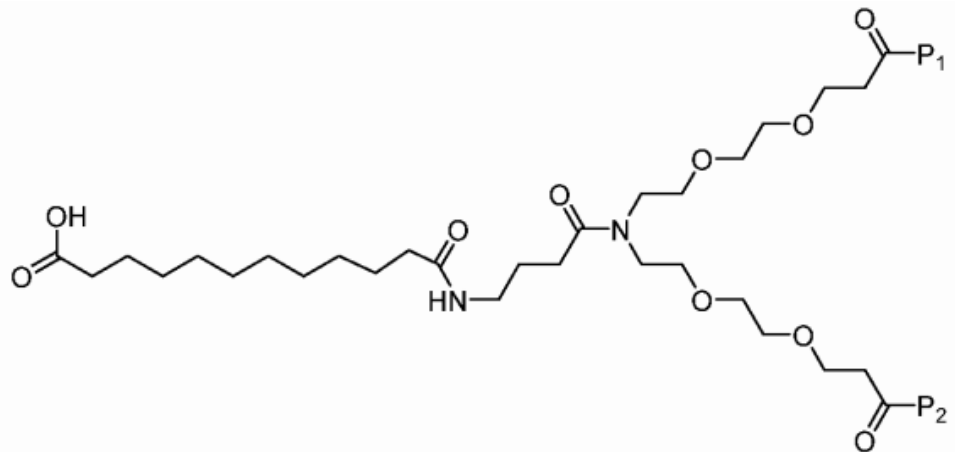
5

j) Derivado KBN53 (3)

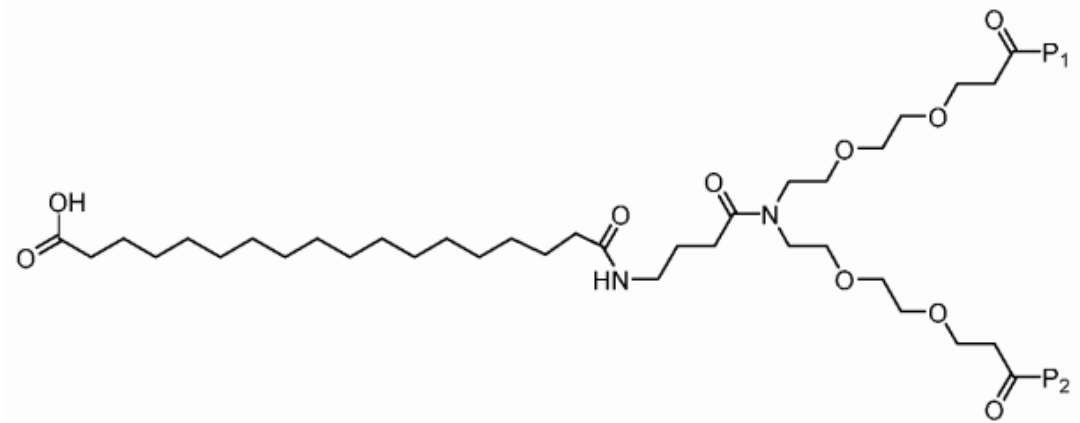


10

k) Derivado KBN54 (2)



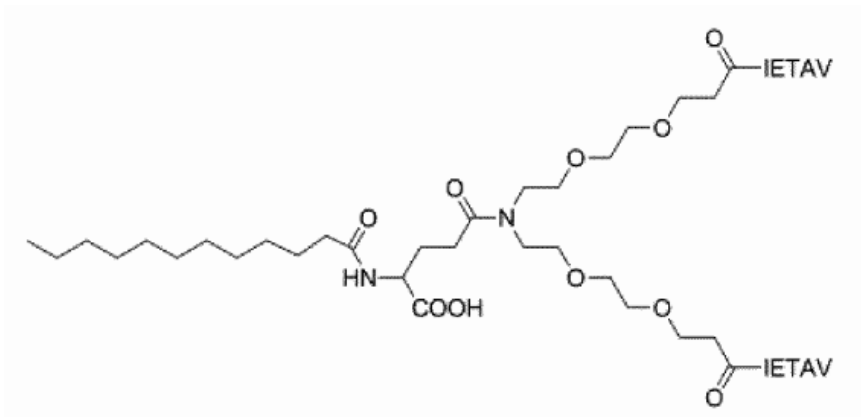
l) Derivado KBN55 (4)



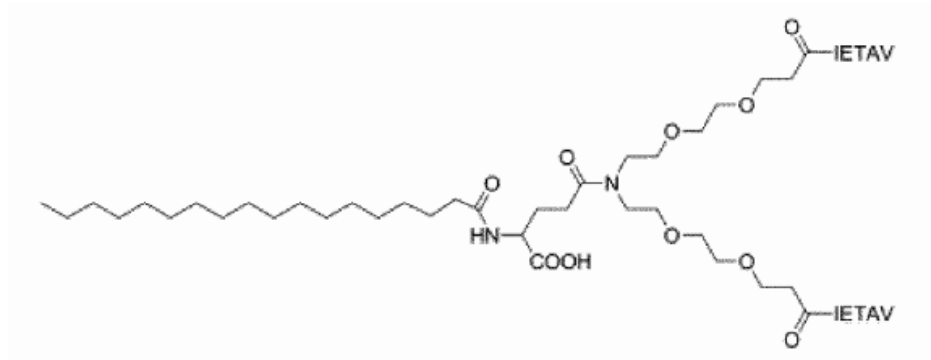
5

11. El ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ligando dimérico se selecciona de entre el grupo que consiste en:

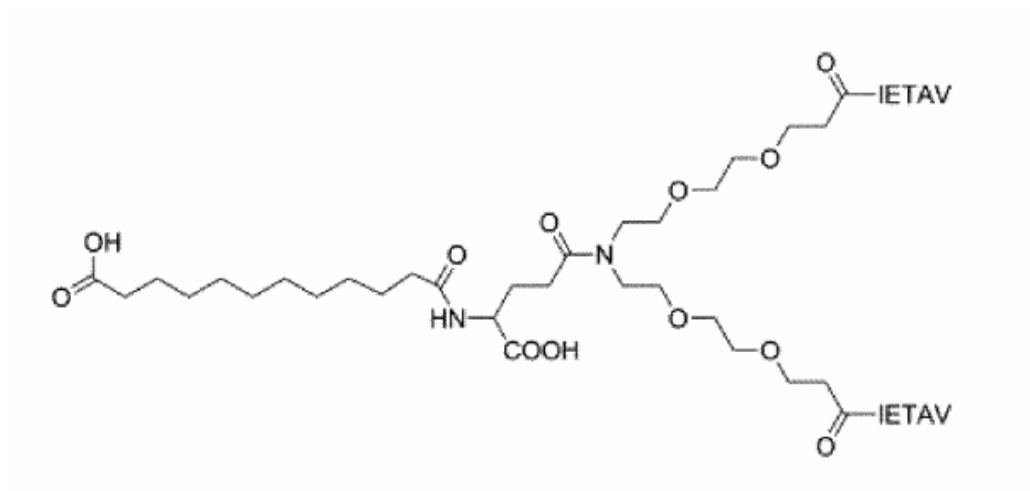
10 a) KBN41 (5)



b) KBN42 (7)

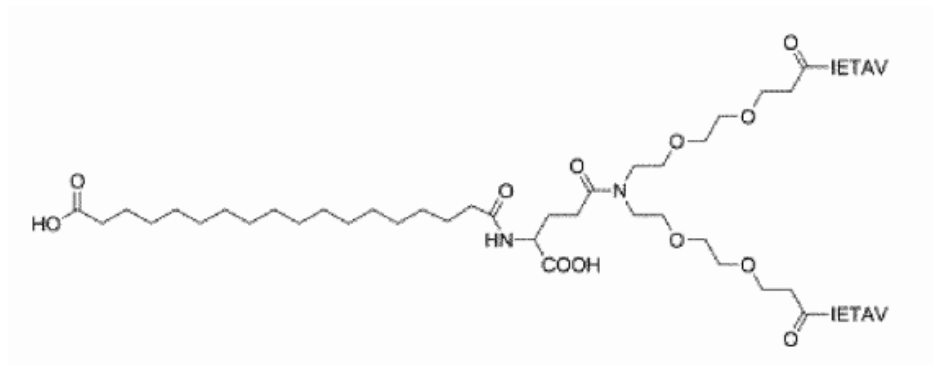


c) KBN43 (6)



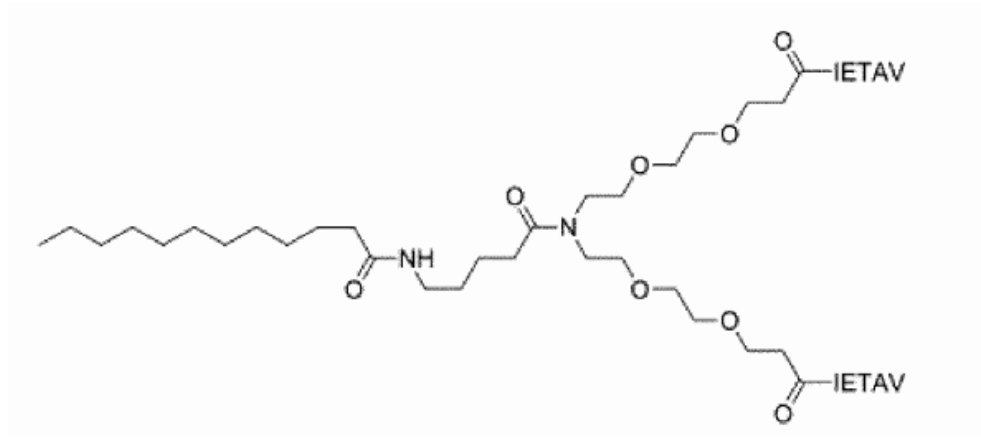
5

d) KBN44 (8)

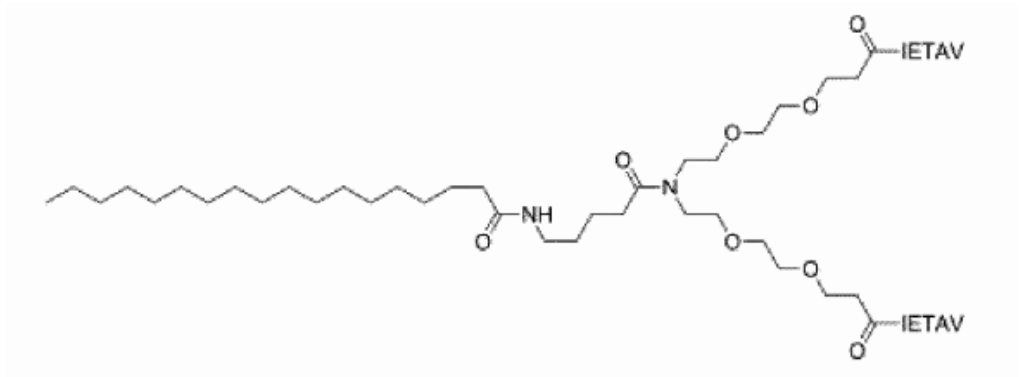


10

e) KBN45 (9)

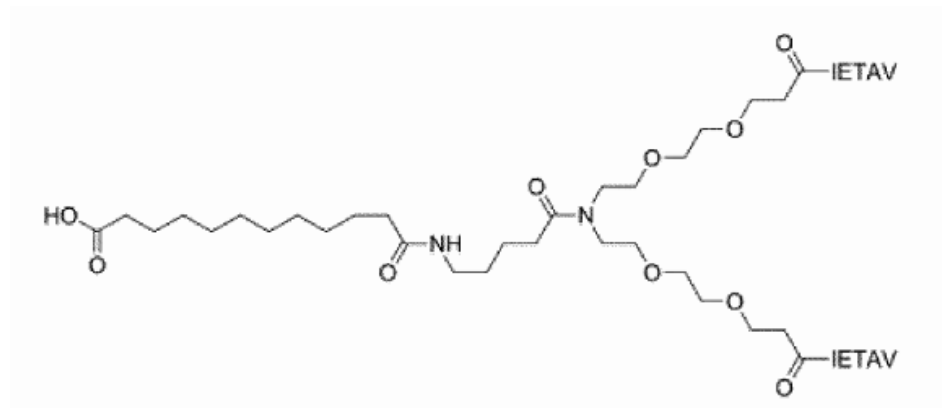


f) KBN46 (11)



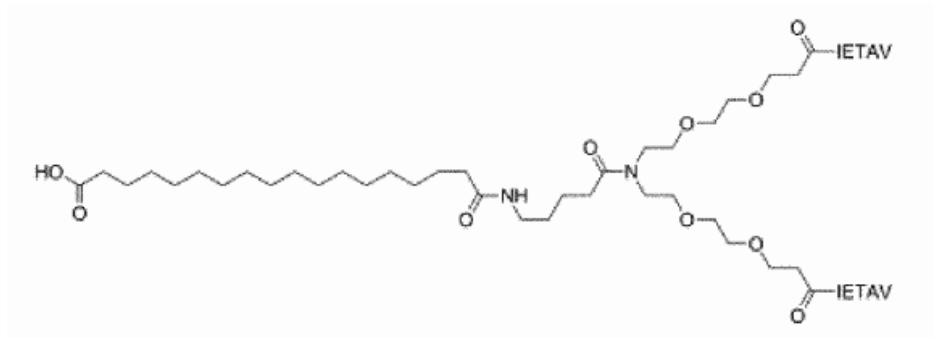
5

g) KBN47 (10)

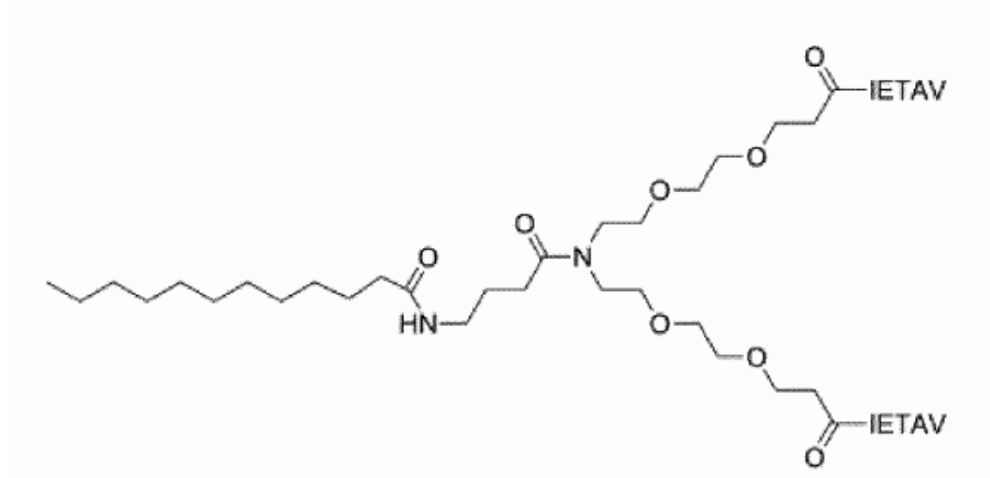


10

h) KBN48 (12)

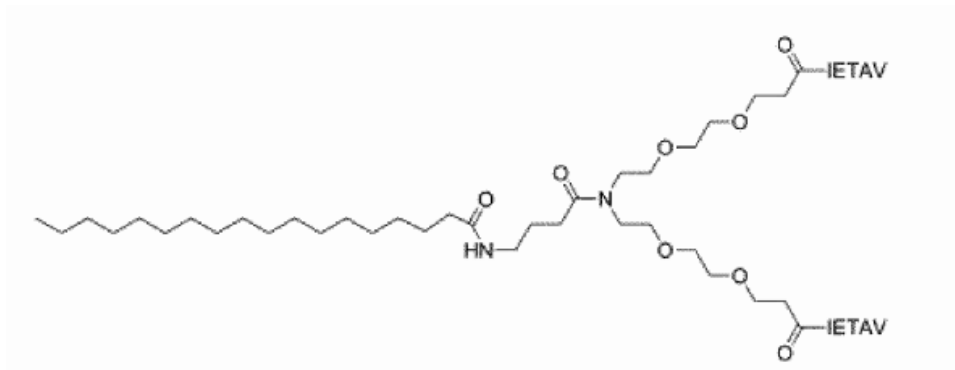


j) KBN52 (1)



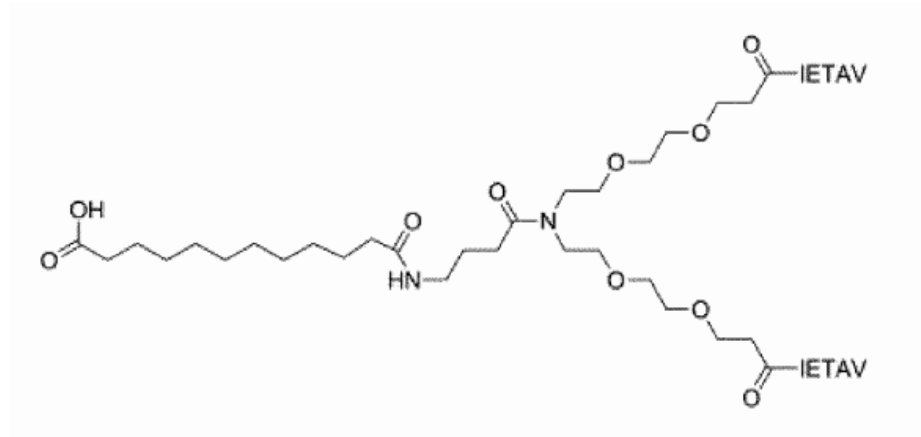
5

k) KBN53 (3)

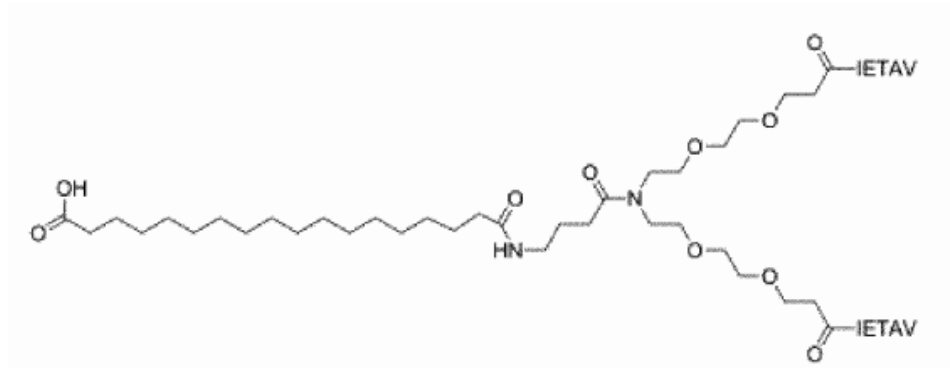


10

l) KBN54 (2)

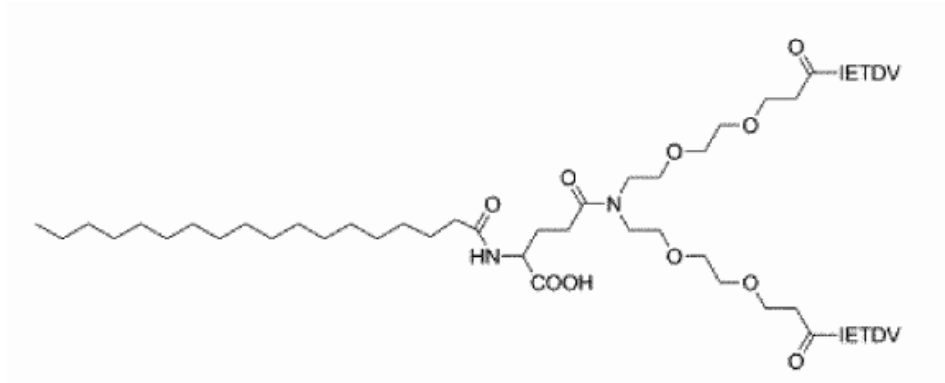


m) KBN55 (4)



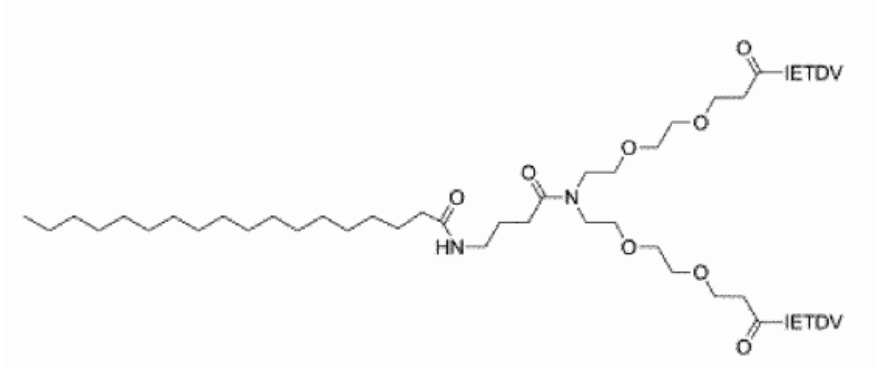
5

n) KBN63 (15)

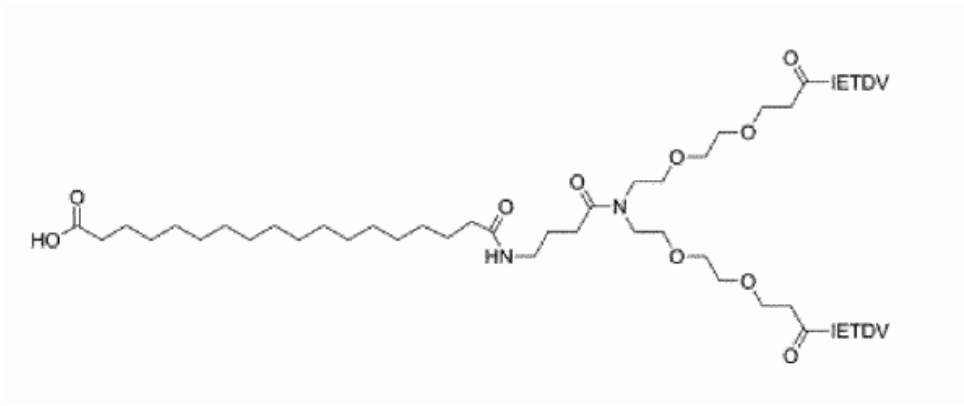


10

o) KBN64 (13)



p) KBN65 (14)



5

12. Un ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso como medicamento.

10 13. Un ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento o profilaxis del dolor y/o una enfermedad relacionada excitotóxica.

14. El ligando dimérico de acuerdo con la reivindicación 13, donde la enfermedad es una lesión isquémica o traumática al/en/del SNC.

15

15. Un procedimiento de fabricación del ligando dimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- 20
- a) preparar un enlazador diácido de Ns-MPEG,
 - b) preparar un péptido utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida a base de Fmoc,
 - c) dimerizar dicho péptido con dicho enlazador diácido de Ns-MPEG, y
 - d) acoplar un ácido graso al enlazador.

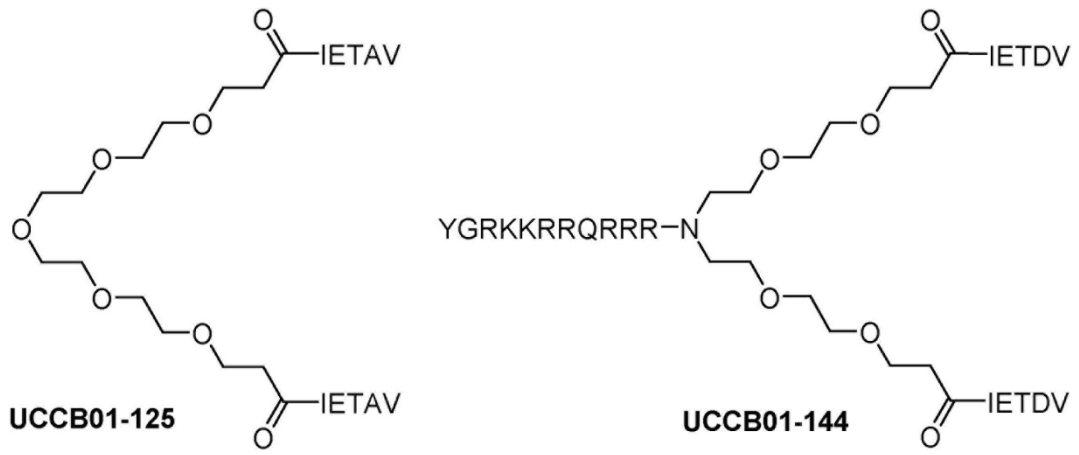


Fig. 1

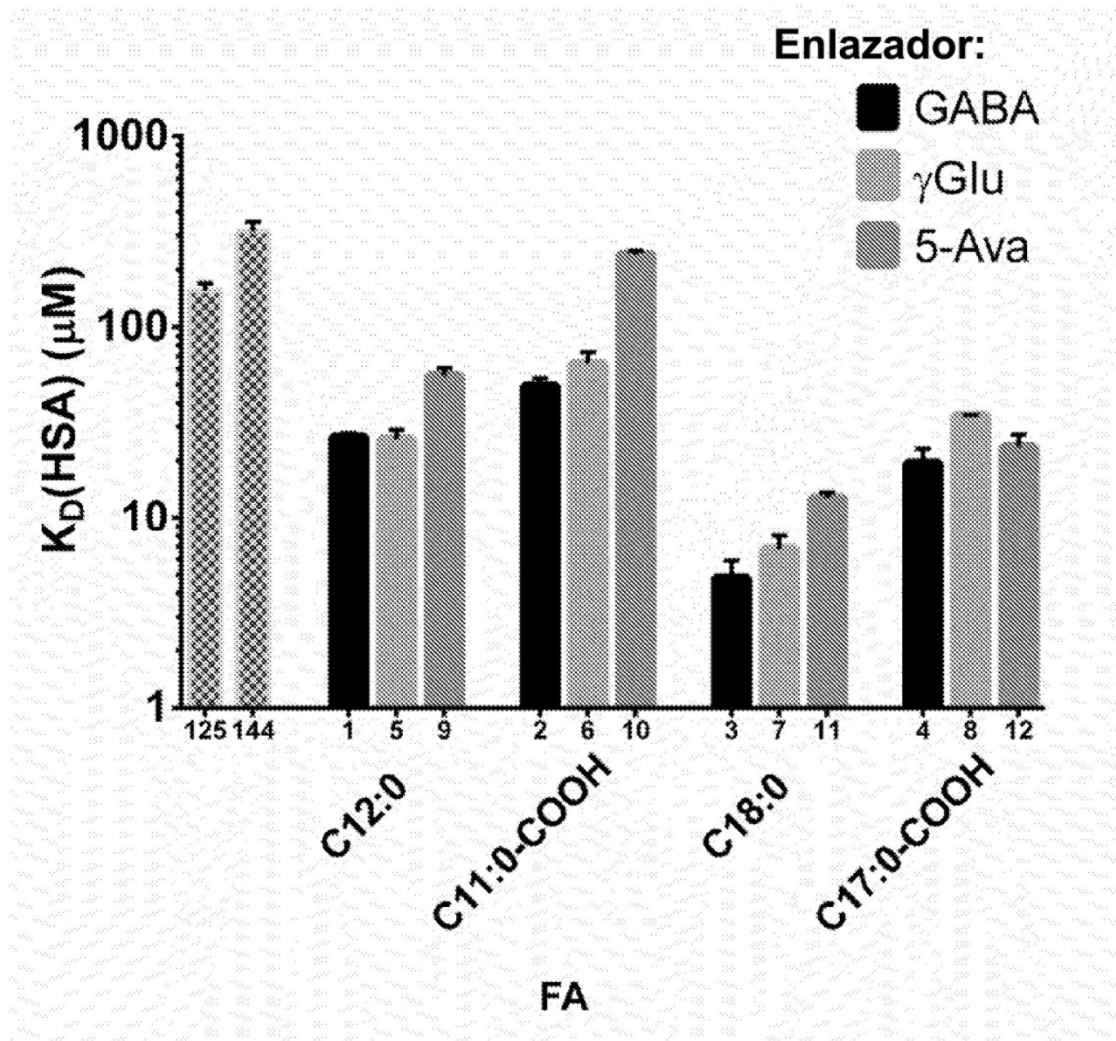


Fig. 2

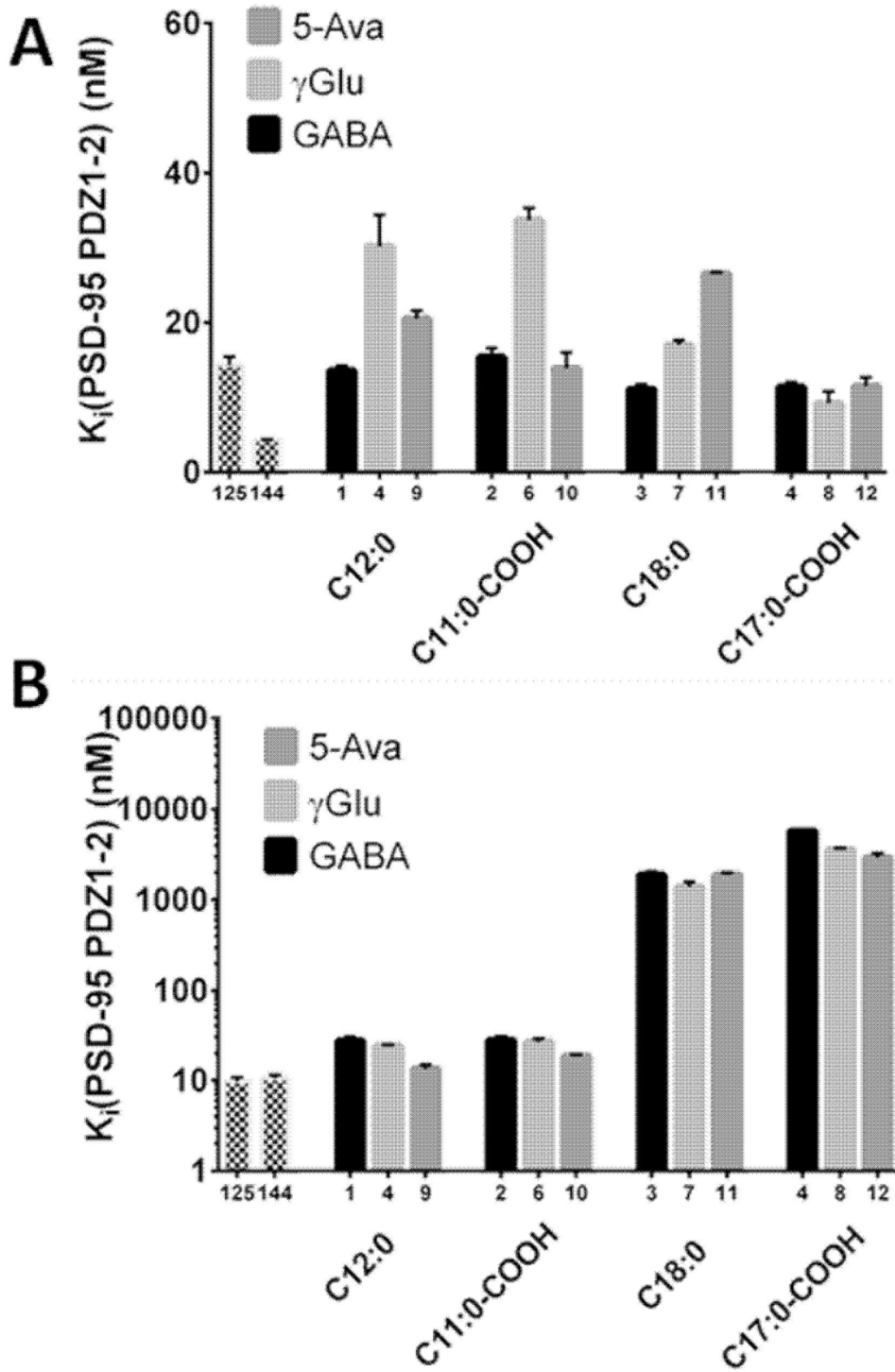


Fig. 3

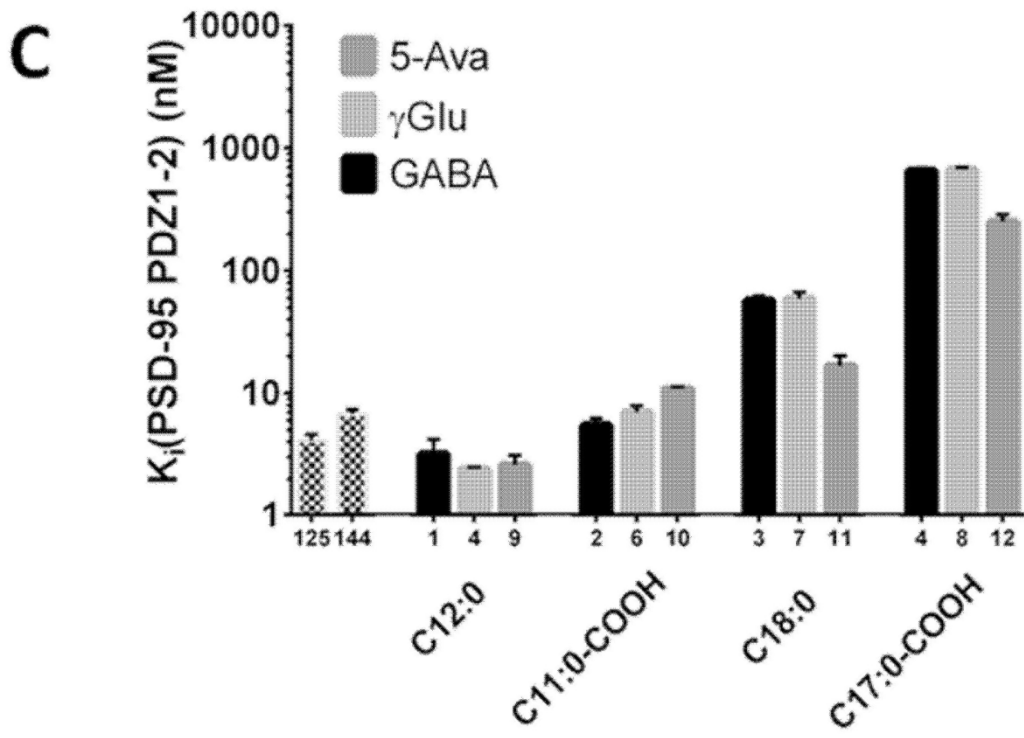


Fig. 3, cont.

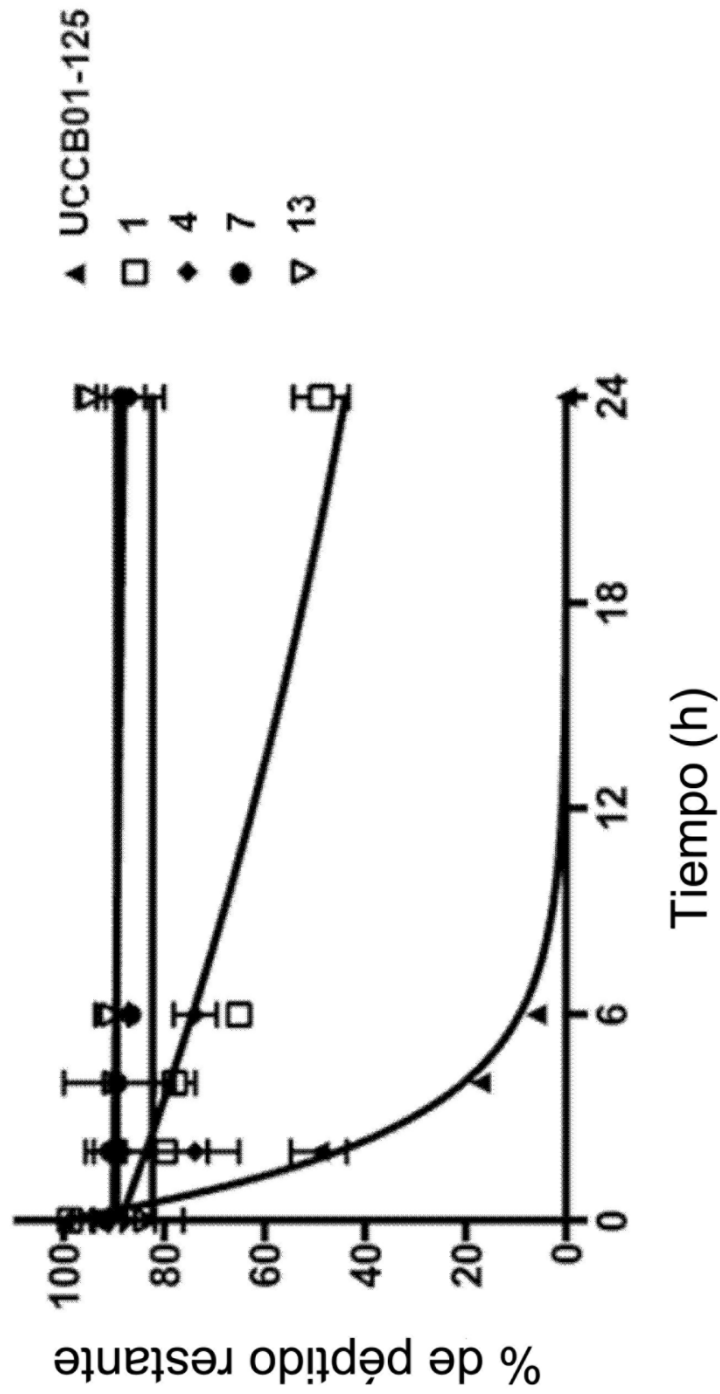


Fig. 4

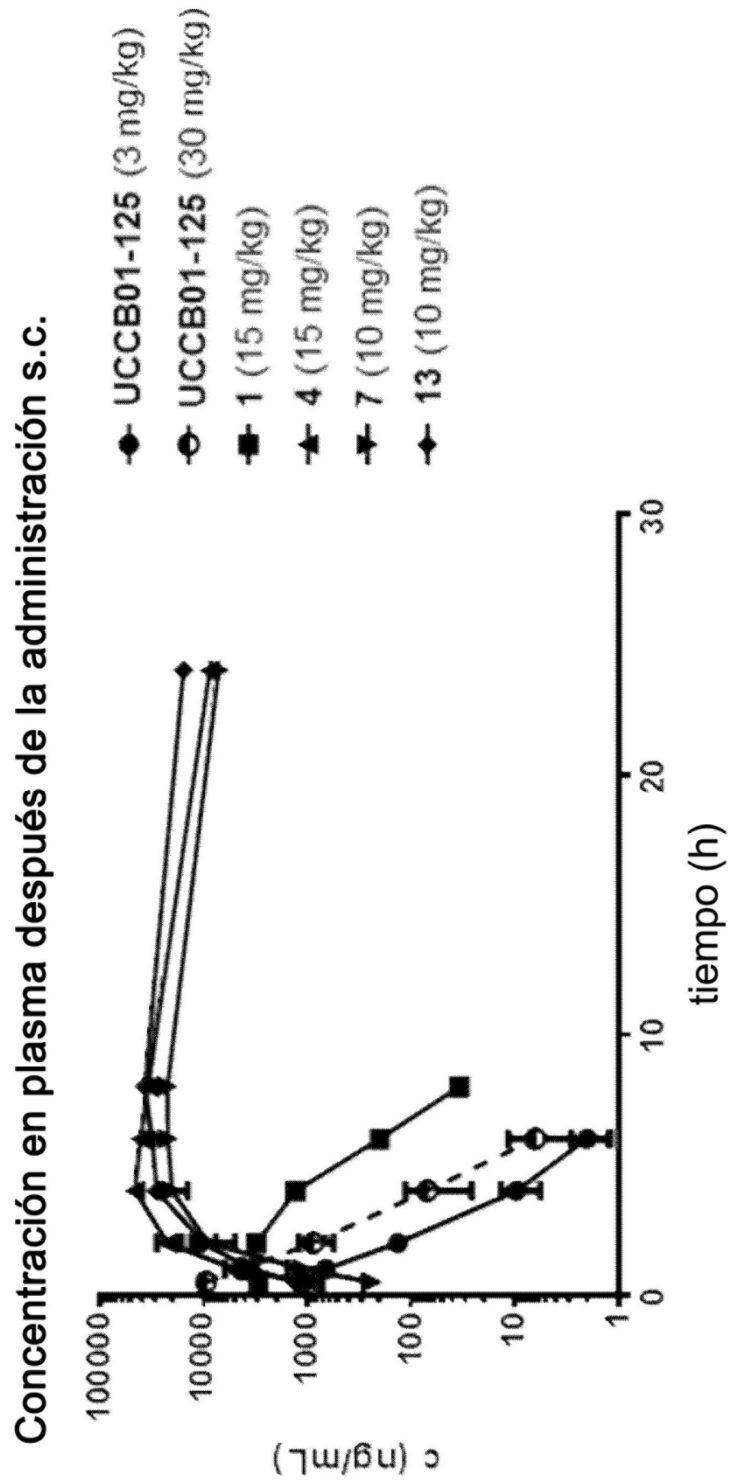


Fig. 5

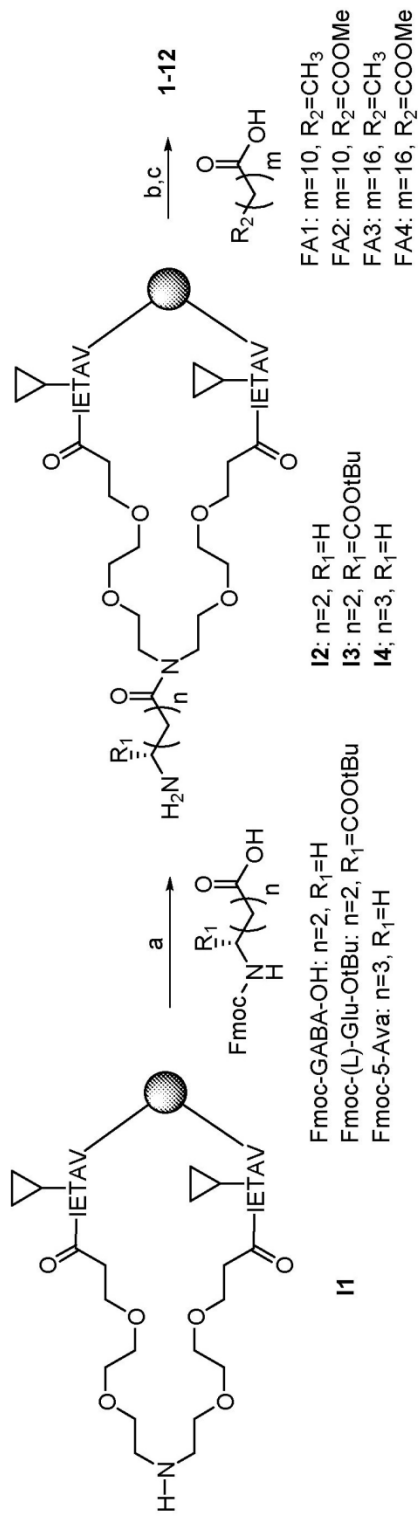


Fig. 6

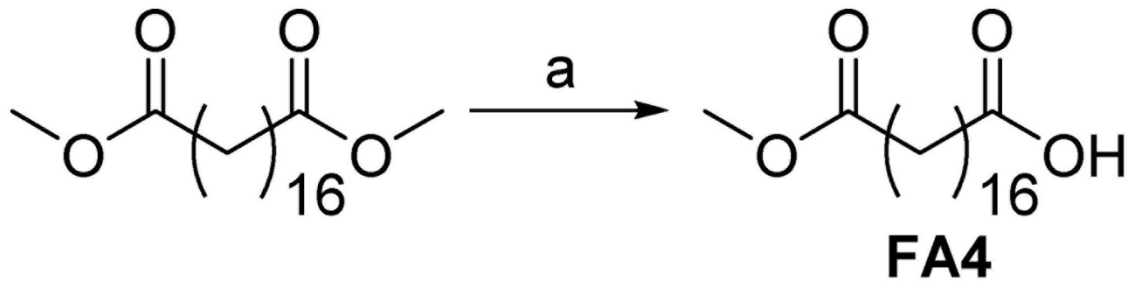


Fig. 7