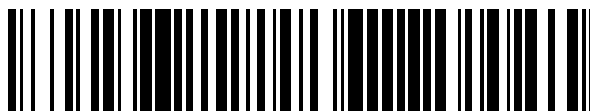


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 727**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2013 PCT/EP2013/071898**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14060601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2013 E 13783290 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2908837**

54 Título: **Composiciones para la administración de fármacos**

30 Prioridad:

19.10.2012 US 201213655954

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

12.07.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITE D'AIX MARSEILLE (33.3%)
Jardin du Pharo 58, Boulevard Charles Livon
13284 Marseille Cedex 07, FR;
VECT-HORUS (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**JACQUOT, GUILLAUME;
LECORCHE, PASCALINE;
MALCOR, JD;
PAYROT, NADINE;
DAVID, MARION;
MOLINO, YVES y
KHRESTCHATISKY, MICHEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 719 727 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

Composiciones para la administración de fármacos

La invención se refiere a composiciones y métodos adecuados para administrar moléculas a un mamífero. La invención se refiere, en particular, a derivados de péptidos (péptidos y pseudopéptidos), sus dímeros o multímeros, y a su uso como vectores para moléculas de interés. La invención también se refiere a conjugados que contienen un derivado de péptido de la invención, o uno de sus dímeros o multímeros, unidos a una molécula de interés. Los péptidos de la invención pueden usarse, en particular, para vectorizar a través de receptores específicos (transporte mediado por receptores, "receptor-mediated transport", RMT), en general en forma de conjugados de profármacos, moléculas de interés farmacéutico o de diagnóstico, tales como, por ejemplo, moléculas terapéuticas, agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o sondas moleculares, a través de las membranas celulares de diferentes tejidos u órganos (tales como el hígado, las glándulas adrenales y el intestino), sanos o patológicos (células de cáncer), y, en particular, para permitir su transporte a través de las barreras fisiológicas del sistema nervioso, tales como la barrera hematoencefálica ("blood brain barrier", BBB), la barrera hematomedular ("blood-spinal cord barrier", BSCB), o la barrera hematorretiniana ("blood-retinal barrier", BRB).

15 **Contexto de la invención**

Según IMS Health, el mercado global para fármacos para tratar las patologías del sistema nervioso central (SNC, cerebro y médula espinal) fue de aproximadamente 70.000 millones de dólares en 2007 y, de esta suma, casi 9.000 millones de dólares representan los productos que surgen de las tecnologías de administración de fármacos (Jain, 2008, Jain PharmaBiotech Report, Drug Delivery in CNS disorders). Así, en la actualidad, la neurología es una de las tres áreas terapéuticas más grandes, junto con la medicina cardiovascular y la oncología. Aunque el número de personas que padecen trastornos y patologías del SNC a lo largo del mundo es mayor que las personas con enfermedades cardiovasculares o cánceres, la neurología sigue siendo un mercado poco desarrollado. Esto se explica, en parte, por el hecho de que 98% de los fármacos potenciales para tratar las patologías del SNC no atraviesan la barrera hematoencefálica o BBB (Pardridge, 2003, Mol. Interv., 3, 90-105). Solo 5% de los fármacos actualmente en el mercado se refieren al sistema nervioso.

En efecto, el SNC es protegido frente a sustancias potencialmente tóxicas por la presencia de dos sistemas principales de barrera fisiológica: la BBB/BSCB, y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo ("blood-cerebrospinal fluid barrier", BCSFB). Se considera que la BBB es la vía principal para la captación de ligandos plasmáticos a nivel cerebral. Su superficie específica es aproximadamente 5000 veces mayor que la de la BCSFB.

30 La longitud global de los vasos sanguíneos constitutivos de la BBB es de aproximadamente 600 km. Cada cm³ de corteza cerebral contiene el equivalente de 1 km de vasos sanguíneos. Se calcula que la superficie específica total de la BBB es de 20 m² (De Boer *et al.*, 2007, Clin. Pharmacokinet., 46(7), 553-576). Se considera que la BBB y la BSCB son importantes obstáculos para el desarrollo de nuevas terapias para tratar patologías y lesiones del SNC (Neuwelt *et al.*, 2008, Lancet Neurol., 7, 84-96).

35 De modo similar, en el ojo, la barrera hematorretiniana (BRB) es parte de la barrera hemato-ocular que consiste en células que también están fuertemente unidas y que evitan que ciertas sustancias entren en la retina. La BRB presenta dos componentes: el endotelio vascular retiniano y el epitelio pigmentario retiniano, también denominados componentes interno y externo (BRB interno ["inner BRB", iBRB] y BRB externo ["outer BRB", oBRB]). Los vasos sanguíneos retinianos que son similares a los vasos sanguíneos cerebrales mantienen la barrera hemato-ocular interna. Al igual que la BBB o la BSCB, esta barrera fisiológica comprende una única capa de células endoteliales no fenestradas, con zonas de unión estrecha ("tight junctions", TJ). Estas zonas de unión entre las células epiteliales retinianas evitan el paso de moléculas grandes desde los coriocapilares hacia la retina.

45 En 2007, el sector farmacéutico oftálmico total a nivel global se evaluó en aproximadamente 11.520 millones de dólares (Visiongain, Ophthalmics, 2007, Visiongain, Inc., San Francisco; Janoria K.G., *et al.*, Novel approaches to retinal drug delivery, Expert Opin Drug Deliv., 2007, 4(4):371-388). Las enfermedades retinianas incluyen retinitis pigmentosa, degeneración macular, distrofia de los conos-bastones ("cone-rod dystrophy", CORD), separación retiniana, desprendimiento de retina, retinopatía hipertensiva y retinopatía diabética, retinoblastoma, lipemia retinalis, etc.

50 Debido al envejecimiento de muchas poblaciones, los expertos financieros predicen una expansión promedio anual del sector mayor que 10% a corto plazo. No obstante, la administración sostenida de concentraciones terapéuticamente eficaces de fármacos para tratar enfermedades del ojo, en particular enfermedades del segmento posterior del ojo, sigue siendo un reto tecnológico significativo. El correspondiente problema de la observancia de las terapias existentes por parte del paciente también es un problema crucial. Así, existen sustanciales oportunidades de mercado para las empresas que buscan moléculas nuevas, así como sistemas innovadores de administración de fármacos.

55 Por tanto, la BBB, la BSCB y la BRB representan grandes obstáculos para el uso de fármacos potenciales contra muchos trastornos del SNC y del ojo, pero también constituyen una superficie extensa de intercambio potencial entre

la sangre y los tejidos nerviosos.

Como regla general, solo unas pocas moléculas lipófilas pequeñas de aproximadamente 450 a 600 Daltons (solo 2% de los candidatos a fármaco) pueden atravesar las barreras fisiológicas mencionadas anteriormente, es decir, pueden pasar desde la sangre al tejido nervioso. El peso molecular y el tamaño de muchos candidatos a fármaco que muestran resultados prometedores en estudios *in vitro* y en estudios en animales para tratar trastornos del SNC son considerablemente mayores. Así, la mayoría de las moléculas, tales como péptidos y proteínas terapéuticos, incluyendo anticuerpos terapéuticos, en general se excluyen del paso/transporte desde la sangre al tejido nervioso en el SNC o el ojo (retina), debido a la baja permeabilidad transcelular de las células endoteliales capilares del tejido nervioso. Las células endoteliales de los capilares cerebrales ("brain capillary endothelial cells", BCEC), organizadas en vasos, están rodeadas por la lámina basal, las prolongaciones pediculares de astrocitos, los pericitos y las células de la microglía y neuronales. La estrecha asociación de las células endoteliales con las prolongaciones pediculares de los astrocitos es responsable del desarrollo y mantenimiento de las propiedades de la impermeabilidad de la BBB frente a la mayoría de las moléculas, asegurando así un control estricto y eficaz de los intercambios moleculares entre la sangre y el cerebro para mantener la homeostasis del cerebro. Las células endoteliales están estrechamente unidas por las TJ, comparadas con las células endoteliales de otros órganos, que están fenestradas. Así, estas TJ previenen el paso paracelular a través de la BBB. Las células endoteliales y las prolongaciones pediculares de los astrocitos que las rodean también constituyen una barrera fisiológica, puesto que estas células presentan sistemas de eflujo eficaces que restringen cualquier paso/transporte por la vía transcelular. En efecto, ciertas moléculas capaces de atravesar barreras fisiológicas son activamente expelidas de las células endoteliales hacia el sistema sanguíneo por proteínas de transporte resistentes a múltiples fármacos ("multidrug resistant", MDR). Estos sistemas de transporte de eflujo activo ("active efflux transport", AET) en general controlan el eflujo activo de moléculas pequeñas desde el tejido nervioso hacia el sistema sanguíneo. Como ejemplo, el sistema modelo de AET en la BBB es el transportador de módulo de unión a ATP ("ATP binding cassette", ABC), concretamente la P-glicoproteína (P-gp); sin embargo, están presentes otros sistemas de AET en la BBB, tales como la proteína 1 asociada a MDR (MRP1). La P-gp, que se localiza principalmente sobre la superficie luminal de BCEC, es un elemento fundamental en la función de la barrera fisiológica de la BBB, evitando la entrada al cerebro de la mayoría de xenobióticos, pero también de candidatos a fármaco y otras moléculas de interés terapéutico capaces de ser activas en el SNC. Por tanto, estas propiedades limitan muchísimo el paso de sustancias desde el plasma sanguíneo hacia el espacio extracelular de los tejidos nerviosos en el SNC y en el ojo.

Una de las razones que pueden explicar por qué no existen tratamientos realmente eficaces en la actualidad para las principales patologías y lesiones del SNC y oculares (cáncer de cerebro, enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, accidentes cerebrovasculares ("cerebrovascular accidents", CVA), etc.) es que los desarrolladores de candidatos a fármacos para tratar patologías cerebrales llevan a cabo programas de investigación internos (programas de descubrimiento de fármacos cerebrales), mientras que invierten pocos esfuerzos en los problemas de atravesar las barreras y en el transporte dirigido preferente a tejidos nerviosos y, de modo notable, al cerebro (programas de transporte dirigido de fármacos al cerebro) (Pardridge, 2003, *Mol. Interv.*, 3, 90-105). Un candidato a fármaco debe ajustarse a ciertas reglas estructurales, fisicoquímicas, farmacológicas y farmacológicas para que tenga la máxima probabilidad de convertirse en un fármaco para tratar una patología o un trastorno del SNC (Pajouhesh *et al.*, 2005, *NeuroRx*, 2(4), 541-553). Por tanto, en el desarrollo de un candidato a fármaco, la selectividad y la especificidad (perfil farmacológico) de una molécula por su diana son fundamentales para su actividad terapéutica (eficacia). La biodisponibilidad y la toxicidad potencial (perfil farmacéutico) de una molécula son cruciales para su futuro como fármaco. En otras palabras, cualquier molécula prevista para convertirse en un fármaco para tratar una patología o un trastorno ocular o del SNC debe moverse a través de la BBB/BSCB o la BRB, debe mantener su actividad biológica y debe mostrar propiedades adecuadas de farmacocinética ("pharmacokinetics", PK), absorción, distribución, metabolismo y excreción/eliminación ("absorption, distribution, metabolism and excretion/elimination", ADME) y farmacodinámica ("pharmacodynamics", PD), con baja toxicidad (Tox). De hecho, a los químicos médicos de este campo de productos terapéuticos del sistema nervioso les es particularmente difícil encontrar el equilibrio hidrófilo/lipófilo de la molécula en desarrollo.

Así, uno de los principales problemas para tratar trastornos y patologías del SNC y del ojo reside en el hecho de que las moléculas administradas no atraviesan la BBB/BSCB/BRB y, por tanto, no pueden alcanzar a su diana o dianas en el SNC o el ojo. Por tanto, una de las prioridades de investigación en el descubrimiento de moléculas para tratar, diagnosticar o formar imágenes de trastornos o patologías del SNC u oculares consiste en encontrar medios para aumentar la eficacia de paso de sustancias activas a través de la BBB/BSCB o BRB.

A este respecto, las estrategias para la vectorización de moléculas a través de estas barreras que se encuentran en estudio en la actualidad y que son usadas por los desarrolladores de candidatos a fármaco para permitir que una molécula de interés terapéutico alcance el SNC pueden dividirse en dos estrategias principales: estrategias farmacológicas y estrategias fisiológicas (Pardridge, 2007, *Pharm. Res.*, 24(9), 1733-1744; De Boer *et al.*, 2007, *Clin. Pharmacokinet.*, 46(7), 553-576; De Boer *et al.*, 2007, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 327-355; Jones *et al.*, 2007, *Pharm. Res.*, 24(9), 1759-1771; Vlieghe y Khrestchatsky, 2012, *Med. Res. Rev.*, 33(3), 457-516).

Estrategias invasivas

Las estrategias invasivas pueden ponerse en práctica mediante la inyección intraventricular directa en el cerebro, la inyección intracerebral o la infusión intratecal de la sustancia activa, o mediante la alteración de la BBB/BSCB (ruptura temporal de la integridad de estas barreras).

- 5 El principal problema de las estrategias neuroquirúrgicas mediante inyección intraventricular, aparte de los costes relacionados con el procedimiento neuroquirúrgico, consiste en que el fármaco no se administra directamente al parénquima cerebral, sino al fluido cefalorraquídeo. La infusión intraventricular implica colocar un catéter en los ventrículos (Aird, 1984, Exp. Neurol., 86, 342-358). Esta técnica muy invasiva no es eficaz para el transporte de sustancias activas al parénquima nervioso. En efecto, en el cerebro, por ejemplo, el volumen de flujo desde el fluido cefalorraquídeo hacia el parénquima cerebral durante la administración de un fármaco mediante infusión intraventricular se ve gobernado por una difusión anormalmente lenta de su convección (transporte), debido a que el cerebro no posee un flujo volumétrico intraparenquimático.

- 10 De modo similar para la inyección intracerebral, la difusión de una sustancia activa en el cerebro disminuye muy rápidamente a partir del sitio de inyección hacia el sitio de la lesión. En efecto, la concentración cerebral de una sustancia activa disminuye en 90% a una distancia de 500 μm desde su sitio de inyección.

- 15 La infusión intratecal implica colocar un catéter en el cerebro. Este catéter está conectado a una bomba que administra la sustancia activa a un caudal predefinido. Debido al hecho de que el cerebro es el único órgano que no posee un sistema linfático, que normalmente actúa para transportar fluidos extracelulares de nuevo hacia la circulación general, la distribución de una sustancia activa mediante infusión intratecal en el cerebro es muy lenta. Esto disminuye la concentración de la sustancia activa en el sitio de la lesión.

Además, existen riesgos significativos de infección durante estos procedimientos neuroquirúrgicos, de forma notable por la presencia del catéter. Bajo estas condiciones, la comodidad del paciente no es óptima.

- 20 La apertura temporal de la BBB está asociada con la apertura transitoria de las TJ de las BCEC. Este es el caso de las sustancias vasoactivas, tales como leucotrienos o bradiquininas (Baba *et al.*, 1991, J. Cereb. Blood Flow Metab., 11, 638-643). Esta estrategia es igualmente invasiva y requiere el acceso arterial a la carótida en sujetos/pacientes sedados. El principal problema que aparece por la ruptura temporal de la integridad de la BBB, además de los costes relacionados con el procedimiento radiológico para acceder a la carótida, es que la BBB solo permanece abierta durante un periodo corto de tiempo, y así se limita la posibilidad de administrar un fármaco a lo largo de un periodo extenso de tiempo. Además, la ruptura temporal de la BBB permite que las proteínas plasmáticas entren en el cerebro (estas proteínas pueden ser tóxicas para el cerebro) y también puede facilitar la entrada de agentes infecciosos. Por tanto, este tipo de ruptura de la BBB puede conducir a alteraciones neuropatológicas crónicas y está asociada con riesgos elevados de infección (Salahuddin *et al.*, 1988, Acta Neuropathol., 76, 1-10).

Estrategias farmacológicas para la vectorización

- 35 Las estrategias farmacológicas para transportar moléculas incluyen la difusión transcelular de moléculas que se han hecho más hidrófobas mediante la adición de lípidos o grupos lipófilos a la sustancia activa (difusión lipófila transcelular, "transcellular lipophilic diffusion", TLD) o mediante el uso de liposomas (Zhou *et al.*, 1992, J. Control. Release, 19, 459-486), y el transporte mediante adsorción iónica por medio de moléculas de vector con carga positiva o mediante la cationización de la molécula activa (transporte mediado por adsorción, "adsorptive-mediated transport", o AMT).

- 40 La adición de un lípido o grupo lipófilo permite la conversión química de moléculas hidrófilas en moléculas más hidrófobas, de modo notable a través de estrategias de profármacos. Sin embargo, la síntesis de dichos compuestos conduce a moléculas que sobrepasan el umbral de transporte óptimo para atravesar la BBB/BSCB/BRB, de modo notable con respecto al peso molecular (PM), que aumenta por encima del límite óptimo de 450 Daltons (Pajouhesh *et al.*, 2005, NeuroRx, 2(4), 541-553). Por la misma razón, los liposomas o incluso las vesículas pequeñas (micelas, etc.) o las nanopartículas (nanoesferas, nanocápsulas) son, en general, demasiado grandes y no son lo suficientemente específicas para la BBB/BSCB/BRB y, por consiguiente, son relativamente menos eficaces para transportar moléculas de interés terapéutico (o agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o cualquier otra molécula, tal como una sonda molecular) a través de estas barreras (Levin, 1980, J. Med. Chem., 23, 682-684; Schackert *et al.*, 1989, Selective Cancer Ther., 5, 73-79). Además, este tipo de sistema de vesículas en general tiene efectos tóxicos no despreciables en el cerebro. Por tanto, los problemas principales que aparecen en las tecnologías de lipidización son su baja especificidad para dirigirse específicamente y atravesar la BBB/BSCB/BRB comparada con otras membranas celulares, la disminución de los valores plasmáticos del área bajo la curva ("area under the curve", AUC) del fármaco, y su uso en general limitado para la vectorización de moléculas pequeñas.

- 55 En el AMT (la adición de un grupo catiónico a través de un enlace covalente o cationización directa del fármaco), el principal problema que aparece es la baja especificidad para localizar y atravesar específicamente la BBB/BSCB/BRB comparada con otras membranas celulares. En efecto, el AMT se basa en moléculas catiónicas que se adsorben sobre células cuya membrana tiene carga negativa, lo cual es el caso de la mayoría de las células.

La disminución en los valores plasmáticos de la AUC del fármaco, su uso en general limitado para la vectorización de moléculas pequeñas, y su citotoxicidad son factores adicionales que penalizan la estrategia de vectorización de AMT.

Estrategias fisiológicas para la vectorización

5 Las estrategias basadas en estrategias fisiológicas para la vectorización consisten en aprovechar los diversos mecanismos de transporte naturales de las barreras. Estos mecanismos de transporte activo de moléculas a través de la BBB actúan acoplándose con un sustrato de receptor específico o mediante imitación molecular de un sustrato de receptor específico (transporte mediado por vehículo, "carrier-mediated transport" o CMT), o mediante el acoplamiento o la fusión con un ligando que se dirige específicamente a un receptor (RMT, "receptor-mediated transport", o "receptor-mediated transcytosis", transporte mediado por receptor o transporte mediado por transcitosis).

10 Como ejemplo, ciertas moléculas, tales como L-DOPA (enfermedad de Parkinson), melfalano (cáncer cerebral), α -metil-DOPA (hipertensión arterial) y gabapentina (epilepsia) pasan al cerebro mediante CMT a través de los transportadores 1 y 2 de aminoácidos neutros grandes (LAT1 y LAT2) (Pardridge, 2003, *Mol. Interv.*, 3, 90-105). Estas moléculas tienen estructuras químicas similares a la fenilalanina, uno de los sustratos naturales de LAT1. Sin embargo, los problemas principales que aparecen en las estrategias de CMT son su amplia selectividad/especificidad por conjugados que imitan/son muy parecidos al sustrato del receptor/transportador endógeno y, en consecuencia, su uso permanece limitado a la vectorización de moléculas pequeñas.

20 El RMT apela a un sistema de transporte dependiente de receptores. La vectorización se realiza mediante mecanismos de endocitosis mediante la localización a receptores endógenos presentes en el tejido diana, que incluye los capilares del cerebro. Los ejemplos notables de los diversos receptores de BBB humanos que estarían implicados en el RMT incluyen: el receptor de transferrina (TfR) que transporta la transferrina (Tf) unida a hierro, el receptor de insulina (IR) o el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), receptores que permiten el transporte del colesterol contenido en lipoproteínas de baja densidad, de alta densidad y de densidad muy baja (LDL, HDL y VLDL, respectivamente), que incluyen el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y miembros de la familia de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP), el receptor de la toxina de difteria (DTR) o factor de crecimiento similar al factor de la crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), así como receptores captadores ("scavenger receptor", SCAV-R), que incluyen el receptor captador de tipo I de clase B (SR-BI). En el RMT, los receptores sobre la membrana de células específicas en órganos, que incluyen células endoteliales de BBB, se unen a su ligando, lo cual conduce a la endocitosis del complejo compuesto por el receptor y su ligando en una vesícula que se forma sobre la superficie de la célula y después penetra en la célula diana. Este proceso de RMT no parece depender del tamaño de la molécula atrapada por endocitosis. En el caso de la BBB/BSCB/BRB, el complejo de ligando/receptor o el ligando disociado puede atravesar la célula endotelial (transcitosis) y, por tanto, puede atravesar estas barreras fisiológicas para actuar en el tejido nervioso. Por tanto, el RMT es un mecanismo que permite el transporte hacia el interior de órganos o tipos de células específicos y, de manera notable, desde la sangre hasta el SNC o el ojo, de muchas moléculas o complejos moleculares. Los receptores para estas moléculas o complejos moleculares pueden usarse para transportar los ligandos naturales de estos receptores modificados para que porten fármacos y/o nanopartículas. Por ejemplo, el revestimiento de nanopartículas con polisorbato, en especial polisorbato 80, conduce a la adsorción de la apolipoproteína E desde el plasma sanguíneo hasta la superficie de nanopartículas, que entonces imitan a las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y pueden interactuar con el LDLR, lo cual conduce a su captación por las células endoteliales (Kreuter, 2012, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, pii: S0169-409X(12)00275-X). La doxorubicina encapsulada en liposomas dirigidos a receptores de LDL aumenta el transporte de fármacos *in vitro* a través de células de la BBB (Pinzón-Daza *et al.*, 2012, *Br. J. Pharmacol.*, doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02103.x). La Tf es el ligando natural de los TfR presentes sobre la BBB. Se han acoplado/conjugado sustancias activas a la Tf para el transporte activo a través de la BBB por los TfR (Jefferies *et al.*, 1984, *Nature*, 312, 162-163; Friden *et al.*, 1983, *Science*, 259, 373-377; Friden, 1994, *Neurosurgery*, 35, 294-298). Aunque esta estrategia de vectorización que emplea una macromolécula de tipo proteico permite aumentar el paso de las moléculas de interés conjugadas a través de las barreras, presentando varias desventajas. En primer lugar, la molécula en general se acopla/conjuga al vector por medio de métodos de expresión de genes (fusión), limitando con ello el número de moléculas que van a ser transportadas a solo polipéptidos o proteínas. En segundo lugar, el sistema para acoplar/conjugar la molécula con el vector es bastante complejo; el acoplamiento químico o bioquímico tradicional no produce sistemas macromoleculares bien definidos desde el punto de vista estructural y molecular. Además, la potencial competición entre los conjugados y los ligandos endógenos por el receptor diana puede conducir a una inhibición del proceso fisiológico del RMT o a una disminución en la concentración de los ligandos endógenos requeridos para el funcionamiento adecuado del cerebro. Por último, los receptores de RMT también pueden estar implicados en procesos de señalización celular en el cerebro, y los conjugados pueden interferir potencialmente estos procesos.

50 El RMT a través de receptores específicos también puede usarse para transportar fármacos hacia otros tejidos/órganos distintos de la BBB y el cerebro. Se ha demostrado, por ejemplo, que la captación de colesterol por la retina se produce principalmente a través de un proceso mediado por LDLR (Tserentsoodol *et al.*, 2006, *Molecular Vision*, 2006, 12:1306-1318).

El sistema vascular de órganos, el parénquima de órganos específicos, o ciertos tejidos enfermos pueden expresar niveles elevados de un receptor concreto que puede usarse para el transporte dirigido de fármacos (analizado en Chung y Wasan, 2004, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 7 de mayo de 2004, 56(9):1315-1334). Por ejemplo, el LDLR se expresa a altos niveles en el hígado (en particular en el lado sinusoidal de los hepatocitos) y en otros tejidos, tales como las glándulas adrenales y el intestino (Beisiegel *et al.*, 1981, *J. Biol. Chem.*, 25, 256(8):4071-4078; Huettinger *et al.*, 1984, *J. Clin. Invest.*, 74(3):1017-1026; Fong *et al.*, 1989, *J. Clin. Invest.*, 84(3):847-856).

Por último, existen muchas pruebas del aumento de la expresión de LDLR en numerosos tipos de cánceres y del transporte de fármacos anticáncer mediado por LDL o nanopartículas a través de estos LDLR de células de cánceres, que incluyen el glioblastoma (Varshosaz *et al.*, 2012, *Eur. J. Med. Chem.*, 54:429-438; Kopecka *et al.*, 2011, *Journal of Controlled Release*, 149:196-205; Nikanjam *et al.*, 2007, *Int. J. Pharm.*, 328(1):86-94, analizado en Ng *et al.*, 2011, *Acc. Chem. Res.*, 44(10):1105-1113; Firestone, 1994, *Bioconjug. Chem.*, 5(2):105-113).

También se ha demostrado que varios ligandos endógenos de LDLR, tales como LDL o PCSK9, después de unirse al LDLR, sufren una endocitosis mediada por receptores, seguida del tráfico intracelular de vesículas de membrana (endosomas) que, en último término, se fusionan con lisosomas (Issandou *et al.*, 2004, *Biochem. Pharmacol.*, 67(12):2281-2289, analizado en Lambert *et al.*, 2009, *Atherosclerosis*, 203(1):1-7).

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico ("Lysosomal Storage Diseases", LSD) representan aproximadamente 70 de trastornos genéticamente diferenciados, con una frecuencia en el nacimiento combinada de aproximadamente 1 de cada 7500. Las terapias de sustitución de enzimas ("enzyme replacement therapies", ERT) requieren la captación de las enzimas recombinantes consideradas para el tratamiento de las múltiples LSD. El receptor de manosa fosfato (M6PR) es, en la actualidad, una importante diana para el transporte de enzimas a tejidos y al compartimento lisosómico de células (analizado en Cox, 2012, *J. Pathol.*, 226(2):241-254; Lachmann, 2011, *Curr. Opin. Pediatr.*, 23(6):588-593), pero pueden considerarse otros receptores, tales como los implicados en el RMT, en particular para el transporte dirigido de ERT al SNC, considerando que aproximadamente 2/3 de las LSD afectan al SNC.

La solicitud de patente internacional WO2010/046588 describe, por primera vez, péptidos o pseudopéptidos que se unen a LDLR humanos, de ratón o de rata y que son capaces de transportar a través de la BBB sustancias que pueden tener un alto PM y/o un gran volumen.

La presente solicitud se refiere a nuevos péptidos que se unen a LDLR, en particular LDLR humanos, de ratón y/o de rata, que están optimizados para transportar moléculas hacia tejidos que expresan LDLR (tales como hígado, glándulas adrenales e intestino), sanos o patológicos (células de cáncer), y, en particular, a través de las barreras fisiológicas del sistema nervioso, tales como la BBB, BSCB o BRB.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos péptidos o pseudopéptidos capaces de transportar moléculas de interés a través de las membranas celulares de tejidos que expresan LDLR y, en particular, a través de barreras fisiológicas del SNC o de la retina (BBB/BSCB y BRB). Por tanto, la invención permite diseñar nuevos agentes terapéuticos o de diagnóstico con una mejor biodistribución o biodisponibilidad y, de modo notable, con un mayor acceso (transporte dirigido) al SNC y/o al ojo y/o a otros órganos enriquecidos en LDLR, tales como el hígado, las glándulas adrenales y el intestino y/o hacia diferentes células de cánceres enriquecidas en LDLR y/o hacia los compartimentos lisosómicos de células.

En los documentos WO2010/046588 y WO2011/131896, los inventores han desarrollado derivados de péptidos capaces de unirse a LDLR y de transportar moléculas al cerebro, incluyendo moléculas de interés terapéutico o de diagnóstico.

Los inventores ahora han diseñado y validado nuevos péptidos que muestran propiedades ventajosas para el transporte de moléculas. Los inventores también han diseñado nuevos multímeros de dichos péptidos que muestran una mayor afinidad y alta capacidad de transporte para la administración de cualquier agente a un animal. Estos nuevos péptidos y multímeros son capaces de unirse a LDLR sin competición con el ligando natural y, por tanto, sin interferencia con el transporte de LDL endógeno, y representan nuevos productos que son particularmente ventajosos para la administración, el transporte dirigido o la vectorización de fármacos o agentes terapéuticos o de diagnóstico (incluyendo fármacos o agentes de formación de imágenes), de modo notable para alcanzar el SNC y/ el ojo y/u otros órganos enriquecidos en LDLR (por ejemplo, hígado, glándulas adrenales, intestino) y/o hacia células de cánceres enriquecidas en LDLR y/o hacia los compartimentos lisosómicos de células.

Un objeto de la invención se refiere, en particular, a un péptido seleccionado de SEQ ID NO:1-3 y 5.

Otro objeto de la invención es un agente multimérico con la siguiente fórmula (A):



en la que:

· cada P representa el mismo péptido o un péptido diferente con la secuencia de aminoácidos A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-A3-A4, en la que A1 y A4 representan independientemente una cisteína o uno de sus análogos seleccionados de (D)-cisteína, penicilamina (Pen) y (D)-penicilamina ((D)-Pen), A2 representa una prolina o uno de sus análogos seleccionados de ácido pipercolico (Pip) y ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz), y A3 representa una glicina o una sarcosina (Sar);

· M es un grupo reticulante; y

· h e i son, independientemente entre sí, un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4 o 5.

En una realización preferida, P es un péptido o pseudopéptido con la siguiente fórmula general (I'):



10 en la que A2 representa prolina, Pip o Thz; A3 representa glicina (Gly) o sarcosina (Sar), y A4 representa cisteína, (D)-cisteína, penicilamina (Pen) o (D)-penicilamina ((D)-Pen).

En una realización más preferida, P es un péptido seleccionado de cualquiera de SEQ ID NO:1-5.

En una realización más preferida, h = i = 1.

15 Los péptidos y multímeros de la invención, de forma ventajosa, tienen la capacidad de unirse al receptor de LDL humano (hLDLR), LDLR de ratón, o LDLR de rata con alta afinidad, y de transportar moléculas de interés hacia el interior de células y tejidos que expresan LDLR, o a través de células que expresan LDLR, tales como células endoteliales.

A este respecto, otro objeto de la invención es un péptido o multímero, tal como se definió anteriormente, conjugado con una o varias moléculas, preferiblemente con una o varias moléculas de diagnóstico o terapéuticas.

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



en la que V representa un péptido o multímero tal como se definió anteriormente, S representa un espaciador, D representa una sustancia activa o una sustancia de interés, x es un número entero entre 1 y 5, e y e z son números enteros entre 1 y 10.

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

Otro objeto de la invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un agente de diagnóstico o de formación de imágenes conjugado con un péptido o pseudopéptido o multímero tal como se definió anteriormente.

30 La invención también describe un método para mejorar o permitir el paso de una molécula a través de las membranas celulares de tejidos que expresan LDLR, sanos o patológicos, y, en particular, a través de las barreras fisiológicas BBB/BSCB y BRB, que comprende el acoplamiento de dicha molécula a un péptido o pseudopéptido o multímero tal como se definió anteriormente.

35 La invención también describe un método mejorado para tratar una patología en un sujeto con un fármaco, consistiendo dicha mejora en el acoplamiento de dicho fármaco a un péptido o pseudopéptido o multímero tal como se definió anteriormente.

La invención puede usarse en cualquier animal, en particular en cualquier mamífero y, más en particular, en seres humanos.

Breve descripción de las figuras

40 Figura 1. Diagrama comparativo de la síntesis en tándem y la síntesis a través de un conector de un conjugado de péptido/molécula de interés terapéutico.

Figura 2. Esquema general de péptidos sintetizados conjugados con moléculas indicadores o fluorescentes, tales como biotinas, fluoresceínas (FITC), rodaminas (rodamina RED-X), cianinas (Cy3.5) o péptido Stag, con un conector/espaciador C-terminal (C-term).

45 Figura 3. Experimento de pulso y caza que emplea células CHO-hLDLR-GFP cultivadas sobre cubreobjetos e incubadas con Dil-LDL 20 mg/ml, junto con un conjugado de péptido-STag (SEQ ID NO:1) 10 μ M. Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavan a fondo y después se incuban en medio de caza durante 5 minutos o 3 horas para permitir la endocitosis de péptidos unidos y el tráfico intracelular. Los núcleos celulares se

tiñen usando Hoechst. Los recuadros muestran una magnificación mayor de áreas representativas de imágenes confocales e indican la colocalización del péptido con LDLR y LDL durante las etapas tempranas del tráfico del péptido y del LDL (T5), y la acumulación tardía del péptido en lisosomas que contienen LDL que no contienen LDLR (T180 - recuadro 2) o en vesículas de reciclaje que contienen LDLR que no contienen LDL (T180 - recuadro 1).

5 Figura 4. Se empleó el fragmento Fc humano de un anticuerpo IgG1 como prototipo de resto de proteína para ser transportado hacia el interior de células por medio de los vectores peptídicos unidos químicamente a SEQ ID NO:1. Se usó una fusión con el péptido de referencia 2 (denominado "SEQ ID NO:43", cuya secuencia de aminoácidos se describe como SEQ ID NO:43 en el documento WO2010/046588), preparado por medio de técnicas moleculares recombinantes, para fines comparativos. El experimento de pulso y caza muestra la unión de Fc-SEQ ID NO:1
10 (unidos químicamente) y de Fc-SEQ ID NO:43 (fusión) a células CHO-hLDLR-GFP.

Se incubaron células CHO-hLDLR-GFP cultivadas sobre cubreobjetos durante 30 minutos a 4 °C con Fc-SEQ ID NO:1 químicamente unidos, con la fusión de proteínas Fc-SEQ ID NO:43, o con el Fc 5 nM por sí solo, se lavaron a fondo y después se incubaron en medio de caza durante 5 minutos a 37 °C para permitir la endocitosis de las proteínas unidas. Los núcleos celulares se tiñen usando Hoechst. El Fc se detecta con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 594. Nótese que solo Fc-SEQ ID NO:1 y Fc-SEQ ID NO:43 se unen a hLDLR. Los recuadros muestran una magnificación mayor de áreas representativas de imágenes confocales e indican las regiones en las que los LDLR y los conjugados de péptido-Fc se colocan en endosomas tempranos/de clasificación.
15

Figura 5. Modelo de barrera hematoencefálica (BBB) *in vitro*: Células endoteliales de capilares cerebrales de rata ("rat brain capillary endothelial cells", RBCEC) cocultivadas con astrocitos. En A, se incubaron RBCEC vivas con Dil-LDL a 40 µg/ml durante 30 min de incubación. En B, se marcan los LDLR de rata en la superficie de RBCEC vivas con un anticuerpo de cabra que reconoce el dominio extracelular de LDLR humano, de ratón y de rata a 10 µg/ml durante una incubación de 1 h. En C, el mismo anticuerpo marca los LDLR de RBCEC de rata tras la fijación de las células con PFA al 4%.
20

Citometría de flujo (FACS): Disociación mecánica de la monocapa de RBCEC con EDTA 0,25 mM. En D, RBCEC control marcadas con ficoeritrina PE-A. En E, unión de Dil-LDL a los receptores LDLR de las RBCEC a 40 µg/ml durante 90 min a 4 °C. En F, unión de Dil-LDL a RBCEC procedentes de ratas LDLR *-/-* (LDLR inactivado, ratas KO ("knock-out")) a 40 µg/ml durante 90 min a 4 °C. En G, RBCEC solo con anticuerpo secundario (anti-aloficocianina APC de cabra de burro, usado como control). En H, marcaje con un anticuerpo anti-LDLR de cabra a 10 µg/ml durante 45 min a 4 °C, seguido de un anticuerpo secundario. En I, marcaje con un anticuerpo anti-LDLR de cabra de RBCEC procedentes de ratas LDLR *-/-* a 10 µg/ml durante 45 min a 4 °C, seguido de un anticuerpo secundario. En J, modelo de BBB *in vitro*: Células endoteliales de capilares cerebrales de rata (RBCEC) cocultivadas con astrocitos: transporte en el compartimento inferior de Dil-LDL a diferentes concentraciones después de una incubación durante 30 min en RBCEC WT y RBCEC LDLR *-/-*.
25
30

Figura 6. Modelo de BBB *in vitro*: Células endoteliales de capilares cerebrales de rata (RBCEC) cocultivadas con astrocitos. A a F: incubaciones con RBCEC vivas procedentes de ratas de tipo salvaje ("wild type", WT); G y H: RBCEC vivas procedentes de ratas LDLR *-/-*. En A, unión/captación de Fc a 0,25 µM durante una incubación de 30 min con RBCEC WT vivas. En B, unión/captación de Fc-SEQ ID NO:43 a 0,25 µM durante una incubación de 30 min con RBCEC WT vivas. En C y E, unión/captación de Dil-LDL a 40 µg/ml durante una incubación de 30 min con RBCEC WT vivas. En D, unión/captación de Fc-SEQ ID NO:43 a 0,25 mM durante una incubación de 30 min con RBCEC WT vivas. Estas fotomicrografías muestran la colocalización entre Dil-LDL y Fc-SEQ ID NO:43. En E, unión/captación de Dil-LDL a 40 µg/ml durante una incubación de 30 min con RBCEC vivas procedentes de ratas LDLR *-/-*. En F, unión/captación de Fc-SEQ ID NO:43 a 0,25 µM durante una incubación de 30 min con RBCEC vivas procedentes de ratas LDLR *-/-*. En G, unión/captación de Fc-CTRL a 0,1 µM durante una incubación de 30 min con RBCEC WT vivas. En H, unión/captación de Fc-SEQ ID NO:1 a 0,1 µM durante una incubación de 30 min con RBCEC vivas procedentes de ratas LDLR *-/-*.
35
40
45

Figura 7. Modelo de BBB *in vitro*: Células endoteliales de cerebro de rata (RBCEC) cocultivadas con astrocitos.

En A, unión/captación de Fc y Fc-SEQ ID NO:43 a diferentes concentraciones después de una incubación durante 30 min con RBCEC WT vivas. En B, unión/captación de Fc-SEQ ID NO:1 y Fc-CTRL a 0,1 µM después de una incubación durante 2 hr con RBCEC WT vivas.
50

Figura 8. Dímero de vector peptídico. Los dímeros muestran mejor afinidad por los LDLR que su forma monómera.

En A, dos ejemplos de dímeros basados en dos construcciones moleculares diferentes. A-1: Ejemplo de dímero sintetizado por acoplamiento de péptido sobre una plataforma comercial de triamina. R puede ser hidrógeno, una molécula trazadora, una sustancia activa o cualquier sustancia de interés con o sin un conector entre ellas. A-2: Ejemplo de dímero sintetizado por acoplamiento de péptido sobre una plataforma de dilisina «casera». R₁ y/o R₂ pueden ser hidrógeno, una molécula trazadora, una sustancia activa o cualquier sustancia de interés con o sin un conector entre ellas.
55

En B, cuantificación de la unión/captación del péptido SEQ ID NO:1-STag a CHO-hLDLR-GFP mediante un ELISA anti-STag. Las células CHO-hLDLR-GFP se incubaron durante 60 min a 37 °C con el péptido SEQ ID NO:1-STag por sí solo (100% de unión) a 10 μM o con el péptido SEQ ID NO:1-STag en competición con el péptido SEQ ID NO:1, el péptido CTRL o el péptido D2(SEQ ID NO:1)₂ a 10 μM.

- 5 En C, unión del péptido D2(SEQ ID NO:1)₂-Cy3.5 y D2(CTRL)₂-Cy3.5 a 500 nM, 30 min a 4 °C, a CHO-hLDLR-GFP. Los núcleos celulares se tiñen con Hoechst. Las fotomicrografías muestran la colocalización entre el péptido D2(SEQ ID NO:1)₂-Cy3.5 y LDLR en la membrana plasmática.

Figura 9. Distribución tisular del péptido SEQ ID NO:1 por sí solo o químicamente acoplado al fragmento Fc humano en ratones WT o ratones LDLR *-/-* (KO).

- 10 En A, distribución tisular del péptido SEQ ID NO:1 marcado con tritio, 10 min después de una inyección en la vena de la cola en ratones WT o LDLR *-/-*. Los resultados se expresan como porcentaje de la dosis total inyectada por gramo de tejido (%DI/g). El recuento de la radiactividad en los tejidos muestra una mayor acumulación del péptido en los tejidos enriquecidos en LDLR de los ratones WT, comparado con los ratones LDLR *-/-*. En B, distribución tisular de Fc-SEQ ID NO:1 químicamente acoplados, dos horas después de una inyección en la vena de la cola en ratones WT o LDLR *-/-*. Los resultados se expresan como porcentaje de la dosis total inyectada por gramo de tejido (%DI/g). La cuantificación de la acumulación del resto Fc en los tejidos usando un ensayo ELISA muestra una mayor acumulación de Fc en los órganos enriquecidos en LDLR de ratones WT, comparado con ratones LDLR *-/-*.

Descripción detallada de la invención

- 20 La invención se refiere a nuevos derivados de péptidos capaces de unirse al LDLR humano y a su uso en el campo de los productos farmacéuticos, de modo notable para transportar moléculas de interés terapéutico o de diagnóstico a través de las membranas celulares de tejidos que expresan LDLR (tales como hígado, glándulas adrenales e intestino), sanos o patológicos (células de cáncer), y, en particular, a través de las barreras fisiológicas BBB/BSCB y BRB. Los péptidos y multímeros de la invención presentan una alta afinidad por el LDLR humano y pueden transportar moléculas *in vivo*. Los péptidos o pseudopéptidos y multímeros de la invención pueden sintetizarse químicamente con facilidad, y cualquier molécula de interés terapéutico o de diagnóstico (por ejemplo, molécula de formación de imágenes) puede acoplarse a ellos de una manera sencilla y eficaz a través de un espaciador (síntesis a través de un conector) o mediante acoplamiento directo (síntesis en tándem) entre las dos entidades (figura 1). Los péptidos y pseudopéptidos se diseñan para que adopten una configuración cíclica y, por tanto, más resistente a la proteólisis. Además, los péptidos y multímeros de la invención se unen a LDLR sin competición con el ligando natural.

Los péptidos o pseudopéptidos o multímeros de la invención pueden usarse como vectores para moléculas de interés terapéutico, o para agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o para cualquier otra molécula, tal como una sonda molecular, en el tratamiento, la formación de imágenes y/o el diagnóstico de patologías neurológicas, así como en patologías genéticas, infecciosas, inflamatorias o cancerosas del cerebro u otros tejidos.

- 35 Los péptidos, pseudopéptidos y multímeros descritos en la presente invención tienen la capacidad de dirigirse a receptores celulares y órganos y tipos de células concretos, de modo notable a células de cáncer, tejidos nerviosos o no nerviosos, tales como el hígado, las glándulas adrenales o el intestino y/o atravesar las membranas celulares, de modo notable las de las barreras fisiológicas del sistema nervioso y, más en concreto, del SNC y del ojo, en particular la BBB, BSCB, BRB, o la barrera hematotumoral ("blood-tumor barrier", BTB) de tumores del tejido nervioso cancerosos.

- 40 Los péptidos, pseudopéptidos y multímeros de la presente invención tienen la capacidad de unirse a los LDLR humanos, de ratón y/o de rata de las membranas celulares de órganos o tipos de células concretos, tales como el hígado, las glándulas adrenales o el intestino, de modo notable las de las barreras fisiológicas del SNC y del ojo, y de atravesar las membranas mencionadas a través de este receptor mediante endocitosis o transcitosis/transporte mediado por receptores (RMT).

Por tanto, los péptidos, pseudopéptidos y multímeros pueden usarse para diseñar fármacos adecuados para tratar diversas enfermedades, tales como patologías infecciosas u otras patologías de origen/naturaleza bacteriana, vírica, parasitaria o fúngica.

- 50 En la invención se describen, más en concreto, péptidos o pseudopéptidos que comprenden una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1-5:

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

SEQ ID NO:2, (D)-Cys-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Sar-Pen;

SEQ ID NO:3, (D)-Cys-Met-Pip-Arg-Leu-Arg-Sar-Cys;

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

SEQ ID NO:5, (D)-Cys-Met-Pip-Arg-Leu-Arg-Sar-Pen.

En la invención también se describen agentes multiméricos con la siguiente fórmula (A):



en la que:

5 · cada P representa el mismo péptido o pseudopéptido o un péptido o pseudopéptido diferente que comprende la secuencia de aminoácidos : A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-A3-A4, en la que A1 y A4 representan independientemente una cisteína o uno de sus análogos o isómeros, A2 representa una prolina o uno de sus análogos o isómeros, y A3 representa una prolina o uno de sus análogos o isómeros;

· M es una plataforma molecular; y

10 · h e i son, independientemente entre sí, un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4 o 5.

A1 generalmente representa un resto seleccionado de cisteína (Cys, C), de configuración D o L, o uno de sus derivados seleccionado de ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico y sus derivados S-sustituídos, S-acetilcisteína o ácido 2-amino-3-(acetiltio)propanoico, selenocisteína (Sec, U) o ácido 2-amino-3-(seleno)propanoico, cisteinol, ácido 3-mercaptopropanoico (Mpa) o penicilamina (Pen), de configuración L o D. En una realización preferida, A1 es D-Cys, Pen o D-Pen.

A2 preferiblemente representa un resto seleccionado de prolina (Pro, P) o ácido pirrolidin-2-carboxílico, homoprolina o ácido 2-(2-pirrolidinil)etanoico, 3-hidroxiprolina (3Hyp), 4-hidroxiprolina (4Hyp), 3-metilprolina, 3,4-deshidroprolina, 3,4-metanoprolina, 4-aminoprolina, 4-oxoprolina, tioprolina o ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz), ácido 2-oxotiazolidin-4-carboxílico, ácido indolin-2-carboxílico (Idc), ácido piperidínico (Pip) o ácido piperidin-2-carboxílico, ácido nipecótico (Nip) o ácido piperidin-3-carboxílico, ácido 4-oxopiperidínico, ácido 4-hidroxipiperidínico, ácido amino-1-ciclohexancarboxílico, prolinol. En una realización preferida, A2 se selecciona de Pro, Pip o Thz.

A3 preferiblemente representa un resto seleccionado de glicina (Gly, G) o ácido 2-aminoetanoico, sarcosina (Sar) o N-metilglicina (MeGly), N-etilglicina (EtGly), alilglicina (alilGly) o ácido 2-aminopent-4-enoico, 2-ciclopentilglicina (Cpg), 2-ciclohexilglicina (Chg), 2,2-dipropilglicina (Dpg), 2-(3-indolil)glicina (IndGly), 2-indanilglicina (Igl), 2-neopentilglicina (NptGly), 2-octilglicina (OctGly), 2-propargilglicina (Pra) o ácido 2-aminopent-4-inoico, 2-fenilglicina (Phg), 2-(4-clorofenil)glicina, azaglicina (AzGly), o glicinol o 2-aminoetanol. En una realización preferida, A3 se selecciona de Gly y Sar.

A4 preferiblemente representa un resto seleccionado de cisteína (Cys, C), de configuración D o L, o uno de sus derivados seleccionado de ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico y sus derivados S-sustituídos, S-acetilcisteína o ácido 2-amino-3-(acetiltio)propanoico, selenocisteína (Sec, U) o ácido 2-amino-3-(seleno)propanoico, cisteinol, o penicilamina (Pen), de configuración L o D. En una realización preferida, A4 se selecciona de D-Cys, Pen, o D-Pen.

En una clase preferida de agentes multiméricos de la invención, P indica un péptido o pseudopéptido de fórmula (I'):



en la que A2, A3 y A4 son como se definió anteriormente.

35 Los ejemplos concretos de grupos P son péptidos que comprenden una cualquiera de SEQ ID NO:1 a 5.

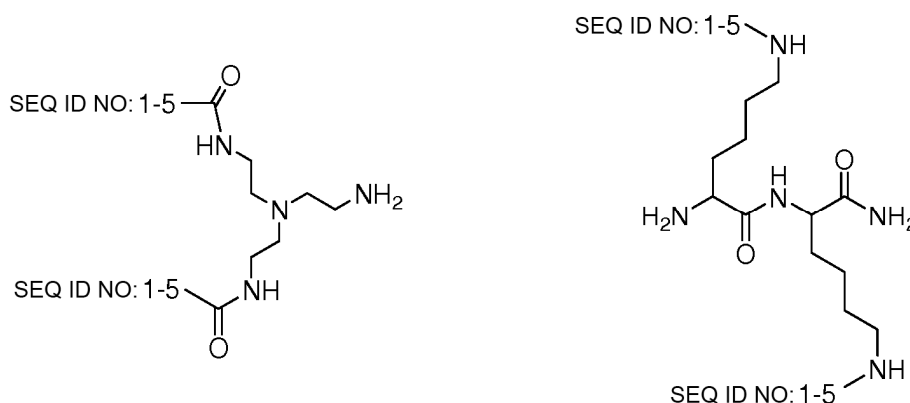
Los agentes multiméricos de la invención pueden comprender de 2 a 10 grupos P, que pueden ser idénticos o diferentes. En una realización preferida, el agente multimérico es un homomultímero, es decir, todos los grupos P son idénticos. Además, los agentes multiméricos preferidos de la invención son dímeros o trímeros, aún más preferiblemente dímeros. En efecto, la invención demuestra que, cuando se usan los péptidos de unión a LDLR, tal como se definieron anteriormente, en una forma dimérica, la capacidad de unión mejora y aumentan las propiedades del RMT. Este resultado no se espera de la técnica anterior, puesto que el ligando natural del receptor es monomérico.

40 En una realización concreta, en un agente multimérico de la invención, h es 1 o 2, e i es 1 o 2. En una realización más preferida, h = i = 1.

45 La plataforma molecular M puede ser cualquier grupo reticulante químico compatible para su uso en el área farmacéutica o veterinaria. El grupo está preferiblemente exento de actividad biológica y toxicidad. El tamaño de la plataforma molecular puede ser ajustado por los expertos en la técnica. Los ejemplos preferidos de grupos M son plataformas de polilisina o compuestos orgánicos multifuncionales, tales como tris(2-aminoetil)amina. Otros grupos M son compuestos orgánicos disponibles en el mercado. En una realización concreta, la plataforma molecular contiene al menos dos grupos funcionales reactivos, preferiblemente al menos tres, lo cual permite el acoplamiento de al menos 2 péptidos y al menos una molécula de interés. Debe advertirse que la molécula de interés puede acoplarse a un péptido o a la plataforma. Los ejemplos de grupos funcionales reactivos incluyen, por ejemplo,

5 aminas, ácidos, tioles, azidas, alquinos, carbonilos o hidrazinas. En una realización preferida, la plataforma molecular es un grupo polilisina, que comprende preferiblemente de 2-10 lisinas. Los ejemplos específicos son dilisina o polilisina que contiene el mismo número de restos lisina que el péptido P. Los péptidos pueden acoplarse sobre la plataforma directamente, mediante un enlace covalente con un grupo funcional reactivo de la plataforma, o a través de un espaciador, que puede estar compuesto, por ejemplo, de una glicina o de una serie de glicinas, una molécula de PEG o un ácido aminohexanoico.

Los ejemplos concretos y preferidos de agentes multiméricos son moléculas con las siguientes fórmulas:



10 en las que "SEQ ID NO:1-5" indica un péptido que comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO:1-5. Debe entenderse que el péptido en las anteriores fórmulas puede comprender cualquier secuencia de fórmula A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-A3-A4, como se definió anteriormente.

15 Los resultados obtenidos por el solicitante demuestran que los péptidos y multímeros de la invención tienen mejor afinidad por LDLR. En particular, comparado con un compuesto de referencia, los péptidos de SEQ ID NO:1-5 muestran una afinidad muy superior, tal como se muestra en la tabla 1 (ejemplo II). Además, la invención demuestra, de forma sorprendente, que los agentes multiméricos muestran afinidad por el receptor y una elevada capacidad para dirigirse a tejidos, tales como el cerebro. Más en concreto, los agentes diméricos que comprenden 2 péptidos de unión a HDLR, tal como se definió anteriormente, tienen una capacidad notablemente elevada para dirigirse a tejidos, tales como el cerebro.

Estos resultados son particularmente notables tomando en cuenta el pequeño tamaño de los péptidos (los anteriores péptidos contienen 8 aminoácidos), lo cual constituye una ventaja adicional en su uso industrial.

20 Tal como se indicó anteriormente, los péptidos o pseudopéptidos o multímeros de la invención pueden comprender enlaces peptídicos, no peptídicos y/o peptídicos modificados. En una realización preferida, los péptidos o pseudopéptidos comprenden al menos un enlace peptidomimético, elegido preferiblemente entre la intercalación de un grupo metileno (-CH₂-) o fosfato (-PO₂-), amina secundaria (-NH-) u oxígeno (-O-), alfa-azapéptidos, alfa-alquilpéptidos, N-alquilpéptidos, fosfonamidatos, depsiépéptidos, hidroximetilenos, hidroxietilenos, dihidroxietilenos, hidroxietilaminas, péptidos retro-inversos, metilenoxi, cetometileno, ésteres, fosfinatos, fosfínicos, fosfonamidas y análogos de carba.

Además, en una realización concreta, los péptidos o pseudopéptidos de la invención comprenden una función N-terminal y/o C-terminal respectivamente protegida, por ejemplo, mediante acilación o amidación o esterificación.

30 Los péptidos o pseudopéptidos de la invención pueden sintetizarse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica (síntesis química, biológica o genética, etc.). Pueden conservarse tal cual, o pueden formularse en presencia de una sustancia de interés o cualquier excipiente aceptable.

35 Para la síntesis química, se emplean aparatos comerciales que pueden incorporar aminoácidos naturales, así como no naturales, tales como D-enantiómeros y restos con cadenas laterales con hidrofobicidades y obstrucciones estéricas diferentes de las de sus homólogos naturales (los denominados aminoácidos exóticos, es decir, no codificados), o una secuencia peptídica que contiene uno o más enlaces peptidomiméticos que pueden incluir, de modo notable, la intercalación de un grupo metileno (-CH₂-) o fosfato (-PO₂-), una amina secundaria (-NH-) o un oxígeno (-O-) o un N-alquilpéptido.

40 Durante la síntesis es posible introducir diversas modificaciones químicas, tales como, por ejemplo, colocar, en la posición N-terminal o C-terminal o sobre una cadena lateral, un derivado de lípido (o fosfolípido) o un constituyente de un liposoma o una nanopartícula, para poder incorporar el péptido o pseudopéptido de la invención dentro de una membrana de lípidos, como la de un liposoma compuesto de una o más capas lipídicas o bicapas o de una

nanopartícula.

Los péptidos de la invención, o una parte proteica de estos, también pueden obtenerse a partir de una secuencia de ácido nucleico que los codifica. La presente invención se refiere también a una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido tal como se definió anteriormente. Más en concreto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia que codifica un péptido de fórmula general (I). Estas secuencias de ácido nucleico pueden ser ADN o ARN y pueden combinarse con secuencias de control y/o insertarse en vectores de expresión biológicos.

El vector de expresión biológico usado se selecciona según el hospedante al cual se va a transferir. Puede ser, por ejemplo, un plásmido, un cósmido, un virus, etc. La invención se refiere, en particular, a estos ácidos nucleicos y vectores de expresión biológicos, que pueden usarse para producir los péptidos de la invención, o sus partes proteicas, en una célula hospedante. Estos vectores de expresión biológicos pueden prepararse y los péptidos pueden producirse o expresarse en un hospedante mediante técnicas de ingeniería genética y de biología molecular muy conocidas por los expertos en la técnica.

La invención también describe el uso de un péptido o pseudopéptido o multímero, tal como se definió anteriormente, como un vector para la transferencia/transporte de moléculas de interés terapéutico, o de agentes de formación de imágenes o de diagnóstico, o de cualquier otra molécula.

La invención también describe el uso de un péptido o pseudopéptido o multímero, tal como se definió anteriormente, para preparar un medicamento capaz de atravesar las membranas de las células de tejidos que expresan LDLR, sanos o patológicos, y, en particular, a través de las barreras fisiológicas BBB/BSCB y BRB.

La invención también describe un método para permitir o mejorar el paso de una molécula a través de las membranas celulares de tejidos que expresan LDLR (tales como el hígado, las glándulas adrenales o el intestino), sanos o patológicos, y, en particular, a través de las barreras fisiológicas BBB/BSCB y BRB, que comprende el acoplamiento de la molécula a un péptido o pseudopéptido o multímero de la invención.

La invención describe también un compuesto conjugado de fórmula (II) como sigue:

25
$$Px Dy \quad (II)$$

en la que P representa un péptido o pseudopéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:1 a 5, D representa una sustancia activa o una sustancia de interés, y x e y son números enteros de entre 1 y 5. En una realización concreta, x e y son igual a 1, x es mayor que y, o y es mayor que x.

La invención también se refiere a un compuesto conjugado de fórmula (III) como sigue:

30
$$Vx Sz Dy \quad (III)$$

en la que V representa un péptido o pseudopéptido o multímero de la invención, S representa un espaciador, D representa una sustancia activa o una sustancia de interés, x es un número entero entre 1 y 5, e y e z son números enteros entre 1 y 10. En una realización concreta, x = z = y = 1, o x = z > y, o y = z > x, o z > x > y.

La sustancia activa o sustancia de interés puede ser cualquier molécula de interés farmacéutico, de forma notable un agente terapéutico, de diagnóstico o de formación de imágenes médicas, o una sonda molecular. En particular, puede ser cualquier entidad química de interés biológico, tal como una molécula química pequeña (antibiótico, antivírico, inmunomodulador, antineoplásico, antiinflamatorio, etc.), un péptido o polipéptido (tal como un neuropéptido, una hormona), una proteína (enzima, de modo notable lisosómica, hormona, citoquina, apolipoproteína, factor de crecimiento, antígeno, anticuerpo o una parte de un anticuerpo), un ácido nucleico (ácido ribonucleico, ARNip, miARN o ácido desoxirribonucleico de origen humano, vírico, animal, eucariota o procariota, vegetal o sintético, etc., cuyo tamaño puede variar desde el de un único oligonucleótido al del genoma o un fragmento de genoma), un genoma vírico o un plásmido, una ribozima, un marcador o un trazador. En general, la "sustancia de interés" puede ser cualquier ingrediente activo de fármaco, tanto un compuesto químico, bioquímico, natural o sintético. La expresión "molécula química pequeña" indica una molécula de interés farmacéutico con un peso molecular máximo de 1000 Daltons, generalmente entre 300 Daltons y 700 Daltons.

En los compuestos conjugados de la invención, el acoplamiento entre los diferentes restos puede realizarse por cualquier medio de unión aceptable, tomando en cuenta la naturaleza química, la obstrucción y número de sustancias activas asociadas y péptidos o pseudopéptidos. Por tanto, el acoplamiento puede realizarse mediante uno o más enlaces covalentes, iónicos, de hidrógeno, hidrófobos o de Van der Waals, que pueden romperse o no romperse en un medio fisiológico o dentro de las células. Además, D puede acoplarse con V o P, si es necesario a través de S, en diversos grupos reactivos y, de modo notable, en uno o más extremos N-terminales y/o C-terminales de V y/o en uno o más grupos reactivos introducidos químicamente o portados por las cadenas laterales de los aminoácidos naturales o no naturales constitutivos de V.

El acoplamiento puede realizarse en cualquier sitio del péptido o pseudopéptido en el que están presentes grupos funcionales naturales, tales como -OH, -SH, -CO₂H, -NH₂, -SO₃H, -CN, -N₃, -NCS, -PO₂H, maleimida o éster de succinimida, o estos han sido introducidos. Por tanto, una molécula terapéutica de interés o un agente de diagnóstico (o de formación de imágenes médicas) o cualquier otra molécula, tal como una sonda molecular, puede unirse (acoplarse) al vector de péptido o pseudopéptido mediante un enlace covalente en el extremo N-terminal o C-terminal, o en los grupos reactivos portados por las cadenas laterales de aminoácidos naturales o no naturales de esta secuencia peptídica.

De manera similar, el acoplamiento puede realizarse en cualquier sitio de la sustancia activa o sustancia de interés (molécula de interés terapéutico, agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas o cualquier otra molécula, tal como una sonda molecular) en la que, por ejemplo, están presentes grupos funcionales naturales, tales como -OH, -SH, -CO₂H, -NH₂, -SO₃H, -CN, -N₃, -NCS, -PO₂H, maleimida o éster de succinimida, o estos han sido introducidos.

Esta química de acoplamiento también es adecuada para conjugar péptidos o fármacos a una plataforma molecular, tal como se describió anteriormente.

Resulta preferible que la interacción sea suficientemente fuerte para que el péptido no se disocie de la sustancia activa antes de alcanzar su sitio de acción. Por esta razón, el acoplamiento preferido de la invención es el acoplamiento covalente, pero también puede usarse un acoplamiento no covalente. La sustancia de interés puede acoplarse directamente al péptido (síntesis en tándem) en uno de sus extremos terminales (N-terminal o C-terminal), o a la cadena lateral de uno de los aminoácidos constitutivos de la secuencia o, en el caso de multímeros, a cualquiera de los grupos funcionales introducidos. La sustancia de interés también puede acoplarse de modo indirecto por medio de un conector o espaciador, a uno de los extremos terminales del péptido, o a la cadena lateral de uno de los aminoácidos constitutivos de la secuencia (figura 1). Los medios para el acoplamiento químico covalente, tanto si se emplea un espaciador como si no se emplea, incluyen los seleccionados de agentes bi- o multifuncionales que contienen grupos alquilo, arilo, PEG o peptídicos mediante ésteres, aldehídos o ácidos de alquilo o arilo, grupos anhídrido, sulfhidrilo o carboxilo, grupos derivados de bromuro o cloruro de cianógeno, carbonildiimidazol, ésteres de succinimida, haluros sulfónicos, maleimidias, azida, isotiocianato, alquinos.

A este respecto, la invención también se refiere a un método para preparar un compuesto conjugado, tal como se definió anteriormente, que se caracteriza porque comprende una etapa de acoplamiento entre un péptido o multímero y una sustancia D, si es necesario a través de S, preferiblemente mediante una vía química, bioquímica o enzimática, o mediante ingeniería genética.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que se caracteriza porque comprende al menos un compuesto conjugado, tal como se definió anteriormente, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La invención también se refiere a una composición de diagnóstico que se caracteriza porque comprende un agente de diagnóstico o de formación de imágenes compuesto de un compuesto conjugado tal como se definió anteriormente.

El conjugado puede usarse en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere, por ejemplo y de una manera no restrictiva, a sales de adición de bases o ácidos farmacéuticamente aceptables, hidratos, ésteres, solvatos, precursores, metabolitos o estereoisómeros, estando dichos vectores o conjugados cargados con al menos una sustancia de interés.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas que, en general, puede prepararse haciendo reaccionar una base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Estas sales conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres. Los ejemplos representativos de dichas sales incluyen sales hidrosolubles e hidrosolubles, tales como acetatos, N-metilglucamina amonio, amsonatos (4,4-diaminoestilben-2,2'-disulfonatos), bencensulfonatos, benzonatos, bicarbonatos, bisulfatos, bitartratos, boratos, bromhidratos, bromuros, buriratos, camsilatos, carbonatos, clorhidratos, cloruros, citratos, clavulanatos, diclorhidratos, difosfatos, edetatos, edetatos de calcio, edisilatos, estolatos, esilatos, fumaratos, gluceptatos, gluconatos, glutamatos, glicolilarsanilatos, hexafluorofosfatos, hexilresorcinatos, hidrabaminas, hidroxinaftoatos, yoduros, isotionatos, lactatos, lactobionatos, lauratos, malatos, maleatos, mandelatos, mesilatos, metilbromuros, metilnitratos, metilsulfatos, mucatos, napsilatos, nitratos, 3-hidroxi-2-naftoatos, oleatos, oxalatos, palmitatos, pamoatos (1,1-metilen-bis-2-hidroxi-3-naftoatos, o emboatos), pantotenatos, fosfatos, picratos, poligalacturonatos, propionatos, p-toluensulfonatos, salicilatos, estearatos, subacetatos, succinatos, sulfatos, sulfosalicilatos, suramatos, tanatos, tartratos, teoclatos, tosilatos, trietyoduros, trifluoroacetatos y valerianatos.

Las composiciones de la invención comprenden, de modo ventajoso, un vector o excipiente farmacéuticamente aceptable. El vector farmacéuticamente aceptable puede seleccionarse de los vectores que se emplean habitualmente según cada modo de administración. Según el modo de administración considerado, los compuestos pueden estar en forma sólida, semisólida o líquida. Para las composiciones sólidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos o gránulos libres o incluidos en cápsulas de gelatina, la sustancia activa puede combinarse con: a) diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina; b) lubricantes, por

ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol; c) ligantes, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sodio y/o polivinilpirrolidona; d) disgregantes, por ejemplo, almidón, agar, ácido alginico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes; y/o d) absorbentes, tintes, agentes aromatizantes y edulcorantes. Los excipientes pueden ser, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y análogos de calidad farmacéutica. Para las composiciones semisólidas, tales como supositorios, el excipiente puede ser, por ejemplo, una emulsión o suspensión oleosa, o con una base de polialquilenglicol, tal como polipropilenglicol. Pueden prepararse composiciones líquidas, en particular inyectables, o las que se incluyen en una cápsula blanda, por ejemplo mediante disolución, dispersión, etc., de la sustancia activa en un disolvente farmacéuticamente puro, tal como, por ejemplo, agua, disolución salina fisiológica, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, aceite y sus análogos.

Las composiciones o conjugados de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada y, de una manera no restrictiva, por la vía parenteral, tal como, por ejemplo, en forma de preparaciones que pueden inyectarse por la vía subcutánea, intravenosa o intramuscular; por vía oral (o *per os*), tal como, por ejemplo, en forma de comprimidos revestidos o no revestidos, cápsula de gelatina, polvos, gránulos, suspensiones o disoluciones orales (una de estas formas de administración oral puede ser con liberación inmediata o con liberación extendida o retrasada); por vía rectal, tal como, por ejemplo, en forma de supositorios; por vía tópica, en particular por vía transdérmica, tal como, por ejemplo, en forma de parches, pomadas o geles; por vía intranasal, tal como, por ejemplo, en forma de aerosol y pulverizado; por vía perlingual; o por vía intraocular.

Las composiciones farmacéuticas comprenden generalmente una dosis eficaz de un péptido o pseudopéptido o conjugado de la invención. Una "dosis terapéuticamente eficaz", tal como se describe en la presente, se refiere a la dosis que produce un efecto terapéutico en un trastorno y programa de administración concreto. Generalmente, es la dosis promedio de sustancia activa que se administra para mejorar, de modo apreciable, algunos de los síntomas asociados con una enfermedad o un estado patológico. Por ejemplo, cuando se trata un cáncer del cerebro o de otro tejido, una patología, una lesión o un trastorno del SNC, la dosis de una sustancia activa que disminuye, previene, retrasa, elimina o detiene una de las causas o síntomas de la enfermedad o trastorno sería terapéuticamente eficaz.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de una sustancia activa no cura necesariamente una enfermedad o un trastorno, pero proporcionará un tratamiento para esta enfermedad o trastorno, de tal modo que su aparición se retrasa, se impide o se previene, o sus síntomas se atenúan, o su condición se modifica o, por ejemplo, se hace menos grave, o se acelera la recuperación del paciente.

Se entiende que la "dosis terapéuticamente eficaz" para una persona en particular dependerá de diversos factores, que incluyen la actividad/eficacia de la sustancia activa, el momento de su administración, su vía de administración, su tasa de eliminación y su metabolismo, las combinaciones/interacciones con fármacos y la gravedad de la enfermedad (o trastorno) tratada sobre una base preventiva o curativa, así como la edad, el peso, la salud general, el sexo y/o la dieta del paciente.

Dependiendo de la sustancia que se acopla, los conjugados y las composiciones de la invención pueden usarse para tratar, prevenir, diagnosticar o formar imágenes de numerosas patologías, de modo notable patologías que afectan al SNC o al ojo, patologías infecciosas o cánceres, enfermedades inflamatorias y/o cirrosis hepática o fibrosis, hepatocarcinomas, enfermedades de otros tejidos, tales como las glándulas adrenales y el intestino.

A este respecto, la invención describe el uso de conjugados o composiciones farmacéuticas como se describió anteriormente, para tratar o prevenir patologías o trastornos del SNC, tumores cerebrales u otras células de cáncer, patologías infecciosas bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas del cerebro u otros tejidos, enfermedades inflamatorias y/o cirrosis hepática o fibrosis, hepatocarcinomas, enfermedades de otros tejidos, tales como las glándulas adrenales y el intestino.

La invención también describe el uso de conjugados o composiciones farmacéuticas como se describió anteriormente, para diagnosticar o formar imágenes de patologías o trastornos oculares o del SNC, tumores cerebrales u otras células de cáncer, patologías infecciosas bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas del cerebro u otros tejidos, enfermedades inflamatorias y/o cirrosis hepática o fibrosis, hepatocarcinomas, enfermedades de otros tejidos, tales como las glándulas adrenales y el intestino.

La invención también describe el uso de un conjugado o una composición según se definió anteriormente, para tratar, formar imágenes y/o diagnosticar un tumor cerebral u otros tipos de células de cáncer. En efectos, ciertos estudios han demostrado que pacientes con ciertos cánceres presentan hipocolesterolemia. Esta hipocolesterolemia es consecuencia de un uso excesivo del colesterol por las células del cáncer. Estas, para sobrevivir, inducen un aumento en el nivel de expresión de LDLR dentro de los órganos con tumores (Henricksson *et al.*, 1989, *Lancet*, 2(8673), 1178-1180). Por tanto, existe una correlación entre el aumento en el nivel de expresión de LDLR por las células y ciertos cánceres. En fechas recientes, se ha demostrado que el número de LDLR es muy elevado sobre la superficie de ciertas células patológicas, tales como células de cáncer. En general se acepta que de 1000 a 3000 LDLR están presentes en la superficie de una célula no patológica. De modo similar, están presentes pocos LDLR en las células de la materia gris de la corteza (Pitas *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262, 14352-14360). En el caso del

glioblastoma, se ha demostrado sobreexpresión de LDLR. Por tanto, sobre la superficie de células tumorales cerebrales, se han contado de 125.000 (para células U-251) a 900.000 (para células SF-767) LDLR (Malentiska *et al.*, 2000, *Cancer Res.*, 60, 2300-2303; Nikanjam *et al.*, 2007, *Int. J. Pharm.*, 328, 86-94). Debe advertirse que muchas células tumorales sobreexpresan LDLR, tales como las del cáncer de próstata (Chen *et al.*, 2001, *Int. J. Cancer*, 91, 41-45), cáncer de colon (Niendorf *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer*, 61, 461-464), leucemia (Tatidis *et al.*, 2002, *Biochem. Pharmacol.*, 63, 2169-2180), cáncer colorrectal (Caruso *et al.*, 2001, *Anticancer Res.*, 21, 429-433), cáncer de mama (Graziani *et al.*, 2002, *Gynecol. Oncol.*, 85, 493-497), así como cánceres del hígado, glándulas adrenales, páncreas, ovarios, pulmón, etc.

La invención también describe el uso de un conjugado o una composición según se definió anteriormente, para tratar, formar imágenes y/o diagnosticar patologías infecciosas bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas del cerebro u otros tejidos, tales como y de una manera no restrictiva, SIDA o meningitis, etc. Los LDLR también están presentes sobre células hepáticas. Se sabe que puede producirse la endocitosis del virus de la hepatitis C (HCV) a través de LDLR. Los LDLR pueden actuar como receptor vírico en un estadio temprano de la infección de hepatocitos humanos por el HCV (Molina *et al.*, 2007, *J. Hepatol.*, 46(3), 411-419). Por tanto, los conjugados de la invención se pueden usar para dirigirse específicamente a células patológicas, infectadas por virus, tales como los virus de la hepatitis B y hepatitis C, que expresan LDLR y/o para modular, a través de los LDLR, el proceso de infección vírica de células sanas. La invención también se refiere al uso de conjugado o una composición según se definió anteriormente, para tratar, formar imágenes y/o diagnosticar otras patologías hepáticas, tales como y de una manera no restrictiva, hepatitis no vírica provocada o no por el consumo de alcohol, inflamación hepática aguda, cirrosis hepática o fibrosis, cirrosis biliar primaria y otras patologías del tracto hepatobiliar, etc. (Poeltra *et al.*, 2012, *J. Control Release*, 161(2):188-197).

La invención también describe el uso de un conjugado o una composición según se definió anteriormente, para formar imágenes o tratar enfermedades de la glándula adrenal o del intestino que están enriquecidos en LDLR.

La invención también describe el uso de un conjugado o una composición según se definió anteriormente, para tratar, formar imágenes y/o diagnosticar patologías neurodegenerativas, tales como y de una manera no restrictiva, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, accidentes cerebrovasculares (CVA), encefalopatía espongiiforme bovina, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones de la médula espinal, etc.

La invención también describe el uso de un conjugado o una composición según se definió anteriormente, para tratar, formar imágenes y/o diagnosticar patologías neurológicas, tales como y de una manera no restrictiva, epilepsia, migraña, encefalitis, dolor del SNC, etc.

La invención también describe el uso de un conjugado o una composición según se definió anteriormente, para tratar, formar imágenes y/o diagnosticar la neurodegeneración y procesos excitotóxicos, tales como y de una manera no restrictiva, las consecuencias de una parada cardiorrespiratoria transitoria, ictus, isquemia neonatal, etc.

La invención también describe el uso de un conjugado o una composición según se definió anteriormente, para tratar, formar imágenes y/o diagnosticar patologías neuropsiquiátricas, tales como y de una manera no restrictiva, depresión, autismo, ansiedad, esquizofrenia, etc.

La invención también describe el uso de un conjugado o una composición según se definió anteriormente, para tratar, formar imágenes y/o diagnosticar patologías del ojo, tales como y de una manera no restrictiva, retinitis pigmentosa, degeneración macular, distrofia de los conos-bastones (CORD), separación retiniana, desprendimiento de retina, retinopatía hipertensiva y retinopatía diabética, retinoblastoma, lipemia retinalis, etc.

Los términos "tratamiento", "tratar" y otras expresiones similares se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de células de cáncer, la muerte de células de cáncer o la mejora de una enfermedad o un trastorno neurológico u ocular. El efecto puede ser profiláctico o preventivo para prevenir completa o parcialmente el agravamiento de una enfermedad o un síntoma de dicha enfermedad en una persona enferma, o su propagación en sujetos sanos y/o puede ser terapéutico para tratar completa o parcialmente una enfermedad y/o sus efectos perjudiciales relacionados. El término "tratamiento", tal como se emplea en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero y, más en concreto, en el ser humano, y comprende: (a) la prevención de una enfermedad (por ejemplo, la prevención del cáncer) o un trastorno que puede surgir en una persona predispuesta a esta patología o trastorno, pero que todavía no ha recibido un diagnóstico positivo, (b) el frenado de una enfermedad (por ejemplo, deteniendo su desarrollo), o (c) el alivio de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo los síntomas asociados con una enfermedad). Este término "tratamiento" también cubre cualquier administración de una sustancia activa para atender, curar, aliviar, mejorar, disminuir o inhibir un trastorno en un individuo o paciente que incluye, pero no se limita a la administración, a una persona que lo necesita, de un fármaco compuesto por un vector o conjugado según se describe en el presente documento.

La presente invención también describe el uso de un péptido o pseudopéptido de la invención para aumentar la actividad biológica de una sustancia activa o de una sustancia de interés (molécula terapéutica de interés, agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas, o cualquier otra molécula, tal como una sonda molecular) al cual

está acoplado.

La presente invención también describe el uso de un péptido o pseudopéptido de la invención para disminuir la toxicidad de una sustancia activa o de una sustancia de interés (molécula terapéutica de interés, agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas, o cualquier otra molécula, tal como una sonda molecular) al cual está acoplado.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la consideración de los siguientes ejemplos, cuya naturaleza es solo ilustrativa y no limitan el alcance de la presente solicitud.

EJEMPLOS

Ejemplo I: Síntesis de péptidos y acoplamiento con una molécula indicadora (biotina, fluoresceínas, rodaminas, cianinas o péptido Stag con actividad enzimática)

Se sintetizaron péptidos mediante el método de síntesis peptídica en fase sólida ("solid phase peptide synthesis", SPPS) en un sintetizador Advanced ChemTech Apex396 (AAPPTec) o un sintetizador de microondas (CEM) Liberty™, usando una estrategia de Fmoc/tBu sobre una resina Rink Amide AM sobre poliestireno-DVB al 1%, Wang sobre poliestireno-DVB al 1%, Barlos (cloruro de 2-clorotritilo) sobre poliestireno-DVB al 1%, Sieber Amide sobre poliestireno-DVB al 1%. La carga (o sustitución) es de entre 0,25 mmol/g y 1,6 mmol/g según la resina usada.

Los aminoácidos N-prottegidos por Fmoc (o Boc para ciertos extremos N-terminales) y/o protegidos por funciones ortogonales (de forma notable, funciones lábiles frente a ácidos) en sus cadenas laterales, el acoplamiento químico y los reactivos de desprotección y los disolventes se adquirieron en empresas especializadas y se emplearon tal cual.

Las resinas Rink Amide y Wang permiten sintetizar secuencias peptídicas completamente desprotegidas en sus cadenas laterales y sus extremos C-terminales. Esta es, por tanto, una SPPS bidimensional (Fmoc/tBu) ortogonal.

Las resinas Barlos y Sieber hipersensibles lábiles frente a ácidos ("hypersensitive acid labile", HAL), respectivamente, permiten la liberación de la función ácido o amida terminal (C-terminal), al mismo tiempo que se conservan las protecciones laterales ortogonales de los diversos aminoácidos del péptido sintetizado, así como la protección de amina terminal (N-terminal) de la función amina de su último aminoácido (por ejemplo, N-acetilación por cuestiones de estabilidad de la secuencia peptídica neosintetizada). Este tipo de resinas, a través de una estrategia de síntesis con Fmoc (Prot₁), permiten usar protecciones laterales ortogonales lábiles frente a ácidos (Prot₂: Boc, tBu, OtBu, Trt, Mmt, Acn, etc.), que se rompen solo en un medio fuertemente ácido, mientras que el péptido protegido se rompe en condiciones ácidas muy débiles. Este tipo de ruptura permite recuperar la secuencia peptídica completamente protegida en sus funciones laterales (Prot₂), con vistas, en particular, a acoplar una molécula terapéutica de interés con el péptido. Esta es, por tanto, una SPPS tridimensional (Barlos o Sieber/Fmoc/tBu) ortogonal.

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

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

La desprotección del grupo Fmoc (Prot₁) de un nuevo aminoácido acoplado de esta forma se realiza usando piperidina al 20% en DMF.

El último aminoácido acoplado durante la secuenciación del péptido estará protegido por una función Boc (con vistas a liberar su función amina terminal libre al final de la síntesis) o estará acetilado (para estabilizar el neopéptido sintetizado, pero también para reducir los riesgos de reacciones secundarias durante el acoplamiento covalente de la molécula terapéutica de interés en la posición C-terminal, por ejemplo) o estará propionilado.

Según el péptido sintetizado, se obtienen puentes disulfuro mediante ciclación intramolecular a partir de dos funciones tiol de dos Cys protegidas de modo adecuado (Acn, Trt, tBu, etc.), en disolución o sobre una resina, usando reactivos que emplean habitualmente los expertos en la técnica: H₂O/AcOH/(NH₄)₂CO₃/DMSO, H₂O/AcOH/(NH₄)₂CO₃, I₂/DMF, I₂/HFIP/DCM, TFA/DMSO/anisol, I₂/DCM/MeOH/H₂O, etc. Una Cys en la posición N-terminal puede ser reemplazada, de modo ventajoso, por Pen o Mpa para la ciclación a través de un puente disulfuro. También pueden obtenerse puentes de lantionina (mediante ciclación a través de deshidroalanina) o dicarba (mediante ciclación a través de alilGly) mediante vías de síntesis conocidas por los expertos en la técnica. Puede crearse un puente de lactama entre la función ácido lateral de un resto Glu (o Asp) y una función amina lateral sobre una Lys o una amina N-terminal. De forma similar, la ciclación entre la función amina N-terminal y la función ácido C-terminal (cabeza/cola) puede realizarse a través de un enlace amida, igual que la ciclación entre la

función amina lateral de Lys y la función ácido C-terminal del péptido.

Los péptidos en las resinas Barlos o Sieber pueden romperse mediante métodos que habitualmente emplean los expertos en la técnica, con TFA al 0,5% (en v/v) en DCM, o con AcOH/TFE/DCM (1/1/3), o con HFIP (al 30%) en DCM, o con TFE (al 30%) en DCM, etc. La desprotección de las cadenas laterales y la ruptura de los péptidos en las resinas Rink Amide o Wang se realizan mediante métodos que habitualmente emplean los expertos en la técnica: con TFA/H₂O/TIS o TIPS (95/2,5/2,5), o con TFA/H₂O/EDT/TIS o TIPS (94/2,5/2,5/1), o con TFA/tioanisol/H₂O (94/5/1), o con TFA/TIS/H₂O/tioanisol (90/5/3/2), o con TFA/H₂O/fenol/tioanisol/EDT (82,5/5/5/2,5), etc.

En general, se introducen biotinas, fluoresceínas (FITC), rodaminas (rodamina RED-X), cianinas (Cy3.5) o STag (véase el ejemplo IV a continuación) en la posición C-terminal o N-terminal, y estos indicadores a veces se acoplan en la posición N-terminal, según los métodos de síntesis y acoplamiento clásicos conocidos por los expertos en la técnica.

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

Las purificaciones preparativas se realizan con un sistema Waters Prep LC 4000 con una columna Guard-Pak™ (fase estacionaria) con cartuchos Delta-Pak™ C18 (25 mm x 10 mm) con un detector de absorbancia de longitud de onda dual Waters 2487.

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

Las condiciones del análisis de LC-MS usadas son las siguientes:

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

Los espectros de masas en modo de electronebulización positivo se adquieren a un caudal de 100-200 μl/min. Los datos se obtienen en el modo de barrido de 200-1700 *m/z* con intervalos de 0,1 s.

Ejemplo II: Diseño del vector de péptido

Se determinó la capacidad de los péptidos para unirse a hLDLR.

Para este fin se cultivaron células CHO-hLDLR-RFP adherentes y confluentes en placas de 6 pocillos. Se emplearon tres pocillos de células por condición.

Se preparó una disolución que contenía 10 μM de un péptido de referencia 1 (denominado "SEQ ID NO:17", cuya secuencia de aminoácidos se describe como SEQ ID NO:17 en el documento WO2011/131896) unido a Stag ("SEQ ID NO:17-Stag") en medio de cultivo HamF12-BSA al 1%. A esta disolución se le añadió 10 μM del péptido para la evaluación (competición).

También se prepararon varias disoluciones control:

- (i) Medio HamF12-BSA al 1%.
- (ii) Medio HamF12-BSA al 1% + péptido control CTRL-STag 10 μM (evaluación de la unión no específica de cualquier péptido que comprenda Stag).
- (iii) Medio HamF12-BSA al 1% + péptido SEQ ID NO:17-STag 10 μM + péptido control CTRL 10 μM (evaluación de la competición "no específica" entre el péptido de interés y el péptido control CTRL).

Las estrategias de FRET usadas son las que se describen en el ejemplo III.

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla 1. La tabla ofrece los resultados de las competiciones en porcentaje de vector de péptido de referencia (SEQ ID NO:17-STag), afinidad por hLDLR, desplazado por los péptidos de la invención. Cuanto mayor es el valor de desplazamiento, más afinidad tiene el péptido por hLDLR.

Cuando este valor es mayor que 50%, el péptido tiene una afinidad mayor que la del péptido de referencia 1.

Tabla 1

Péptidos	Desplazamiento del péptido control
SEQ ID NO:1	100%
SEQ ID NO:2	93%
SEQ ID NO:3	70%
SEQ ID NO:4	67%
SEQ ID NO:5	100%
Péptido de referencia 1 ("SEQ ID NO:17-Stag")	50%

5 Los resultados presentados demuestran que los péptidos de la invención, que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:1 a 5, tienen una afinidad muy superior por el LDLR humano que el péptido de referencia 1. Estos resultados son particularmente interesantes considerando el pequeño tamaño de los péptidos.

10 Además, la afinidad de unión K_D de los péptidos de la invención, medida usando la resonancia de plasmón de superficie (Biacore®), también muestra unos resultados notables. Por ejemplo, el péptido de SEQ ID NO:1 muestra un valor bajo de K_D de 22 nM.

Tabla 2

Péptidos de ensayo	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	Rmax
SEQ ID NO:17	5,77E+05	5,05E-02	8,82E-08	20
SEQ ID NO:1	3,04E+06	6,53E-02	2,24E-08	21
D1(SEQ ID NO:17) ₂	-	-	< 1E-09	-
D2(SEQ ID NO:1) ₂	-	-	< 1E-09	-
Fc-SEQ ID NO:43	5,55E+03	7,10E-05	1,33E-08	268
Fc-SEQ ID NO:1	1,03E+06	2,20E-04	2,13E-10	186

15 También se evaluó la estabilidad en plasma *in vitro* (es decir, la semivida o $t_{1/2}$) de los péptidos de la invención. Brevemente, cada péptido se incubó durante hasta 8 horas a 37 °C en sangre de ratón Swiss (CD-1) recién recolectada, y el analito se cuantificó en la fracción plasmática en varios momentos usando un método analítico de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Los resultados demuestran que todos los péptidos de la invención muestran unos valores de semivida *in vitro* de al menos 3,9 horas y hasta 9,2 horas.

Tabla 3

Péptidos de ensayo	Semivida <i>in vitro</i> (h)
SEQ ID NO:1	4,0
SEQ ID NO:2	4,9
SEQ ID NO:3	5,9
SEQ ID NO:4	3,9
SEQ ID NO:5	9,2
Péptido de referencia 2	1,5

Péptido de referencia 1	3,0
-------------------------	-----

Por consiguiente, los péptidos o pseudopéptidos de la invención tienen las siguientes propiedades farmacológicas notables:

5 (i) una afinidad aparente (K_m) por hLDLR en el intervalo de 100 nM, y una afinidad (K_D) en el intervalo de 10 nM, que es muy superior a los péptidos anteriores y está adaptada a la unión, la endocitosis, la excreción-liberación/post transcitosis o intracelular del péptido (Yu *et al.*, 2011, *Sci. Transl. Med.*, 25 de mayo, 3(84):84ra44);

(ii) características fisicoquímicas que favorecen su especificidad por el hLDLR (conformación constreñida debido a la ciclación por puente disulfuro); un tamaño reducido a 8 aminoácidos; hasta 4 aminoácidos no naturales para estimular su especificidad por este receptor;

10 (iii) una mayor resistencia a la proteólisis enzimática: mientras que los péptidos endógenos y, en general, los péptidos lineales pequeños que contienen solo aminoácidos naturales tienen una semivida ($t_{1/2}$) *in vitro* muy corta en sangre, generalmente en un intervalo muy pequeño (Foltz *et al.*, 2010, *J. Nutr.*, enero, 140(1):117-118), la $t_{1/2}$ de los péptidos de la invención varía de 1,5 horas hasta 9,2 horas;

(iv) un tamaño pequeño y un peso molecular cercano a 1 kDa, lo cual permite reducir los costes de la síntesis y de la futura producción a escala industrial.

15 Ejemplo III: Unión y endocitosis de los péptidos sintetizados con afinidad por hLDLR en líneas celulares CHO-LDLR-GFP

Los péptidos de la invención se acoplan/conjugan en la posición C-terminal o N-terminal con diversas moléculas indicadoras, rodamina Red-X, Cy3.5, FITC o STag, separadas por un espaciador compuesto, en general, por tres restos Gly (figura 2). El STag (un péptido de 15 aminoácidos derivado de la secuencia 1-15 de la ribonucleasa pancreática bovina A), por una parte, puede ser reconocido por un anticuerpo anti-STag en estrategias de inmunocitoquímica o FACS y, por otra parte, puede reconstituir su actividad enzimática uniéndose a la proteína S de ribonucleasa (porción C-terminal, aminoácidos 21-124) en ensayos de actividad *in vitro* usando el kit de ensayo FRETworks STag (Novagen 70724-3). La ribonucleasa activada de esta forma digiere un sustrato de ARN liberando un agente fluorescente enmascarado que se visualiza mediante FRET ("fluorescence resonance energy transfer", transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) y se cuantifica en una placa de 96 pocillos en un espectrofluorímetro Beckmann. Para estos experimentos de FRET se emplean células CHO control, y se reemplazó la GFP condensada en la posición C-terminal con hLDLR y mLDLR, que genera un fuerte ruido de fondo a las longitudes de onda usadas para FRET, por proteína fluorescente roja (RFP). Por tanto, las líneas celulares estables generadas por los experimentos de FRET fueron CHO-RFP y CHO-hLDLR-RFP.

30 Para las estrategias de FRET, las células se lavan dos veces con 2 ml de PBS y después se incuban durante 1 h a 37 °C con 250 μ l de disolución de péptido. De nuevo se lavan dos veces con 2 ml de PBS y después dos veces con 1 ml de PBS, y después se raspan en 1 ml de PBS y se centrifugan durante 5 min a 1250 rpm. Después el sobrenadante se aspira y el sedimento celular se lava en 80 μ l de PBS + Triton X100 al 0,1%. Se analizan 20 μ l de cada lisado celular midiendo la emisión de fluorescencia después de la reacción de FRET.

35 Así, se realizan experimentos que implican la incubación de péptidos con diversas células que expresan hLDLR, que demuestran que los péptidos se unen a las células CHO-LDLR-GFP y que sufren una endocitosis para acumularse en las células de la línea celular que expresa hLDLR, lo cual no es el caso para los péptidos de control. En estos experimentos, la incubación preliminar de los péptidos conjugados con STag, con un anticuerpo primario (Ab primario) dirigido contra STag, y un anticuerpo secundario (Ab secundario) dirigido contra el anticuerpo primario, demuestra que el complejo entre un péptido-STag, un Ab primario y un Ab secundario se une a células que expresan hLDLR y es internalizado por endocitosis. Estos resultados indican que los péptidos de esta invención pueden unirse a células que expresan hLDL y vectorizan grandes cargas (dos anticuerpos), es decir, estas cargas son internalizadas por endocitosis.

45 Para evaluar más a fondo el tráfico subcelular preciso de péptidos conjugados con STag, se realizaron experimentos de pulso y caza en células CHO-hLDLR-GFP (figura 3). En estos experimentos, el complejo compuesto de péptido SEQ ID NO:1-STag/anticuerpo primario/anticuerpo secundario se incubó con células CHO-hLDLR-GFP durante 30 minutos a 4 °C, junto con LDL, el ligando natural de LDLR, acoplado con la sonda fluorescente Dil (Dil-LDL). Después las células se lavan 3 veces con 1 ml de PBS y se incuban en medio de caza durante 5 minutos (figura 3 - T5), lo cual permite la acumulación de vesículas endocíticas citoplásmicas, o durante 3 horas (figura 3 - T180), lo cual permite el tráfico y la fusión de los endosomas con lisosomas, en donde el ligando natural LDL se acumula, mientras que el LDLR se vuelve a reciclar a la membrana plasmática a través de la vía endosómica de reciclaje. Después las células se fijan con PFA al 4% durante 10 minutos y se procesan sin permeabilización. Los resultados indican que i) los péptidos de la invención se unen específicamente a hLDLR expresados en la superficie de células y sufren una endocitosis mediada por LDLR sin alterar la unión y la endocitosis de LDL, el ligando natural de LDLR, ii) tras la endocitosis, una parte sustancial de estos péptidos sigue la misma vía de tráfico intracelular que LDL, lo cual conduce, en último término, a la fusión de las vesículas que contienen el péptido con los lisosomas (figura 3 -

T180/cuadrado 2), mientras que otra parte que varía entre los análogos de péptidos sigue la misma vía de reciclaje que LDLR (figura 3 - T180/cuadrado 1).

Ejemplo IV: Toxicidad, endocitosis y transcitosis de los péptidos sintetizados con afinidad por LDLR en células endoteliales en modelos de BBB *in vitro*

5 Los efectos tóxicos potenciales de los péptidos sobre las células endoteliales, la unión/acumulación de péptidos en estas células, y el paso por transcitosis de los péptidos se evalúa en modelos de BBB *in vitro*. Las células necesarias para construir el modelo de cocultivo son células endoteliales de capilares cerebrales de rata o ratón (BCEC) y astrocitos de rata o ratón. Este tipo de modelo de BBB *in vitro* se emplea para evaluar el paso pasivo o el transporte activo de numerosas moléculas, de modo notable agentes farmacológicos, a través de las BCEC y, por tanto, por
10 extrapolación, su capacidad para alcanzar el tejido del SNC *in vivo*. Los diferentes modelos desarrollados hasta la fecha (modelos bovinos, porcinos, murinos, humanos) presentan propiedades ultraestructurales características del endotelio cerebral, de modo notable zonas de unión estrecha, ausencia de fenestraciones, ausencia de canales transendoteliales, baja permeabilidad a moléculas hidrófilas y alta resistencia eléctrica. Además, estos modelos han demostrado unas correlaciones sólidas entre los resultados de las mediciones tomadas en diversas moléculas
15 evaluadas *in vitro* e *in vivo* para su propiedad de pasar a través de la BBB. Hasta la fecha, todos los datos obtenidos demuestran que estos modelos de BBB *in vitro* imitan en gran medida la situación *in vivo* reproduciendo algunas de las complejidades del entorno celular que existe *in vivo*, al mismo tiempo que conservan las ventajas asociadas con la experimentación con cultivos celulares.

Por ejemplo, el modelo de BBB de rata *in vitro* pone en juego un cocultivo de BCEC y astrocitos. Antes del cultivo celular, se tratan inserciones de membrana (Millicell porosidad 1,0 μm ; para placas de 6 pocillos o de 12 pocillos) sobre la parte superior con colágeno de tipo IV y fibronectina para permitir la adhesión óptima de las BCEC y para crear las condiciones de una lámina basal. Se establecen cultivos primarios de astrocitos mixtos a partir de corteza cerebral de rata neonatal (Dehouck *et al.*, 1990, J. Neurochem., 54, 1798-1801). Brevemente, después de retirar las meninges, el tejido cerebral se hace pasar a través de un tamiz de nailon de 82 μm . Los astrocitos se distribuyen en pocillos de microplacas a una concentración de $1,2 \times 10^5$ células/ml con 2 ml de medio de cultivo óptimo (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal inactivado con calor al 10%. El medio se cambia dos veces por semana. Las BCEC se cultivan en presencia de medio DMEM/F12 suplementado con suero derivado de plasma pobre en plaquetas bovino al 20% (v/v), glutamina 2 mm, gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ y factor de crecimiento de fibroblastos básico 1 ng/ml, añadido cada dos días. Las BCEC entonces se distribuyen sobre la superficie superior de los filtros en 2 ml de cocultivo. Este medio de BCEC se cambia tres veces por semana. Bajo estas condiciones, las BCEC diferenciadas forman una monocapa de células confluyentes siete días después.

Para ensayar su toxicidad, los péptidos de la invención condensados o conjugados químicamente con el fragmento Fc humano de un anticuerpo IgG1 se incuban en la cámara superior del sistema de cultivo, en contacto con las células endoteliales durante 30 min o 2 h. El medio de cultivo de la cámara inferior se recoge en diversos momentos y se cuantifica el fragmento Fc mediante un ELISA de "sandwich". En todos los pocillos analizados se emplea amarillo de Lucifer (LY), una pequeña molécula fluorescente que no atraviesa la BBB, en primer lugar para evaluar la integridad de la BBB *in vitro*, y en segundo lugar para la coincubación del péptido para evaluar la ausencia de toxicidad de los péptidos para las células endoteliales que forman esta BBB. El medio de cultivo se recoge en diferentes momentos y se cuantifica la fluorescencia mediante una fluorimetría. Los resultados se expresan como permeabilidad de la superficie endotelial (o P_e) en 10^{-3} cm/min. La barrera *in vitro* se considera "permeable" o "abierta" si el valor P_e de LY es mayor que $0,6 \times 10^{-3}$ cm/min. La resistencia eléctrica transendotelial ("transendothelial electrical resistance", TEER), medida con un ohmetro y expresada en ohm.cm^2 , también permite medir la integridad de la BBB *in vitro* durante los ensayos de paso a través de la BBB. El valor umbral de calidad se ajusta a >500 ohm.cm^2 .

45 Los experimentos realizados muestra la ausencia de toxicidad de los péptidos, así como para el péptido de control usado, y la ausencia de efectos perjudiciales sobre las propiedades de permeabilidad de la BBB.

Como control, se cuantificó Dil-LDL en el compartimento inferior del modelo de BBB *in vitro* (figura 5-J, curva WT). La gráfica muestra la saturación del transporte a 4 μg por inserción. Para confirmar la especificidad de la señal de LDLR que se cuantificó con Dil-LDL, este experimento se repitió con un modelo de BBB *in vitro* basado en BCEC procedentes de ratas LDLR $-/-$ (KO). La gráfica de la figura 5-J demuestra que no se produce transporte de Dil-LDL a través de la monocapa de BCEC hacia el compartimento inferior cuando se preparan a partir de ratas LDLR $-/-$ (existen diferencias significativas entre los experimentos con BCEC de ratas WT y LDLR $-/-$).

La unión/captación de LDLR en la BBB *in vitro* del péptido de la invención conjugado con el fragmento Fc humano (Fc-SEQ ID NO:43 y Fc-SEQ ID NO: 1) se verificó en el modelo de rata *in vitro* descrito anteriormente (figura 7). Este análisis se realiza midiendo, mediante un ELISA de "sandwich", la cantidad del fragmento Fc o el fragmento Fc conjugado con el péptido de la invención, acumulado en las células endoteliales y los pocillos receptores en diversos momentos (de 30 min a 2 h) y concentraciones (de 0,1 a 0,4 μM). La ausencia de toxicidad se evalúa midiendo la integridad de la BBB en los diversos pocillos analizados por medio de la medición simultánea del nivel de LY que pasa desde un compartimento a otro como una función del tiempo.

Ejemplo V: Fusión biomolecular del péptido de referencia 2 y acoplamiento bioquímico del péptido de referencia 1 y de SEQ ID NO:1, al fragmento constante de un anticuerpo IgG1 humano (fragmento Fc) y evaluación de la unión, endocitosis y RMT en una línea de células CHO hLDLR y un modelo de BBB de rata *in vitro*

5 Algunos de los péptidos que presentan afinidad por los hLDLR se ensayaron para su capacidad para estimular la unión y/o la endocitosis y/o la transcitosis de un fragmento Fc unido covalentemente a hLDLR expresados en líneas celulares o en células endoteliales primarias. Para este fin, los inventores clonaron la secuencia que codifica el péptido SEQ ID NO:43 en fusión con el fragmento Fc, o acoplaron químicamente los péptidos SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:1 al mismo fragmento Fc.

10 Para producir el fragmento Fc condensado con el péptido SEQ ID NO: 43, se generó una construcción de plásmido basada en el plásmido pINFUSE hlgG1-Fc2 (InvivoGen), que se empleó como molde. Se sintetizó un megacebador que codifica Fc-SEQ ID NO:43 mediante PCR como se describe en el documento WO2011/131896. El producto de la reacción de PCR (Fc-SEQ ID NO:43) se purificó, se digirió con DpnI (una enzima que digiere el ADN metilado de origen) y se empleó como megacebador en una segunda reacción de PCR realizada con el plásmido pINFUSE hlgG1-Fc2 usado como matriz empleando el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange II (Agilent). Después de
15 la transformación de bacterias competentes se obtuvieron colonias aisladas y se preparó el ADN del plásmido, y la construcción de ADNc se secuenció para ambas hebras para la verificación. Este vector, denominado pFc-SEQ ID NO:43, permite la expresión del fragmento Fc condensado en su N o C-terminal con el péptido SEQ ID NO:43 después de la transfección de células de mamífero. Se transfectaron células de riñón embrionario humano (HEK 293) usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) con el plásmido pFc-SEQ ID NO:43. Setenta y dos horas después de la transfección, se purificó la proteína Fc-SEQ ID NO:43 contenida en el sobrenadante del cultivo usando el kit de purificación de proteína A Prosep (Millipore). La proteína de fusión purificada se ensayó mediante un ensayo de ELISA de "sandwich" y después se usó para realizar ensayos en células hLDLR CHO, células endoteliales primarias y modelos de BBB *in vitro*.

25 Para el acoplamiento químico de los péptidos SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:1 al fragmento Fc (Millipore), se empleó el kit de reticulación de proteína-proteína controlada Controlled Protein-Protein Crosslinking Kit (Thermo Scientific). Los péptidos SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:1 se sintetizaron para que portasen un grupo sulfhidrilo libre (cisteamida) disponible para su enlace con un fragmento Fc purificado con grupos maleimida añadidos a aminas primarias del fragmento Fc. Se consideró que el número de moles de péptido por mol de fragmento Fc era de 1 a 7. Las proteínas obtenidas se denominaron Fc-SEQ ID NO:17 y Fc-SEQ ID NO:1 y se ensayaron mediante un ensayo ELISA de "sandwich". Después se utilizaron para realizar ensayos en células CHO hLDLR.

30 La unión y endocitosis de Fc-SEQ ID NO:43 y de Fc-SEQ ID NO:1 también se evaluó mediante inmunocitoquímica usando experimentos de pulso y caza (figura 4). Brevemente, se incubaron células CHO-hLDLR-GFP durante 30 minutos a 4 °C con Fc-péptidos a una concentración de 5 nM, después se lavaron a fondo y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C en medio de caza para permitir la acumulación de vesículas endocíticas citoplásmicas. Después las células se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos y se permeabilizaron con PBS/Triton X100 al 0,1% durante 10 minutos antes de inmunotefñir con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con Alexa 594. El péptido SEQ ID NO:43 condensado al fragmento Fc y el péptido SEQ ID NO:1 unido químicamente al fragmento Fc sufren una endocitosis mediada por LDLR, según se observa con los péptidos acoplados a STag. No se observa unión para el Fc solo. No se observa unión en las células CHO WT (no se muestra).

40 Las BCEC de rata procedentes del modelo de BBB *in vitro*, según se describe en el ejemplo V, se usaron en los experimentos de unión/captación y de transporte de Fc-SEQ ID NO:43 frente al fragmento Fc solo usado como control negativo, y de Fc-SEQ ID NO:1 frente a Fc-CTRL (mezcla de SEQ ID NO:43) como control negativo. Se evaluó la expresión de los LDLR y su funcionalidad por RMT en el modelo de BBB *in vitro* (figura 5). Después se incubó Fc-SEQ ID NO:43 frente a Fc a diferentes concentraciones durante 30 min en RBCEC vivas a 37 °C (figura 7-A). También se incubó Fc-SEQ ID NO:1 frente a Fc-CTRL a 0,1 µM durante 30 min (figuras 6-G y 6-H) o durante 2 h en RBCEC vivas a 37 °C (figura 7-B). Después de esta coincubación, la monocapa de células se lavó a fondo y se fijó con PFA al 4%. La monocapa de células se permeabilizó con una disolución de Triton X100 al 0,1%. Se revelaron Fc, Fc-SEQ ID NO:43, Fc-SEQ ID NO:1 y Fc-CTRL usando un anticuerpo primario contra el fragmento Fc humano (figura 6). Después se empleó la microscopía confocal para evaluar la colocalización entre la fluorescencia de las vesículas de Dil-LDL y Fc-SEQ ID NO:43 (figuras 6-A a D). También se realizaron los mismo experimentos con BCEC de rata procedentes de ratas LDLR -/- (KO) (laboratorios SAGE de Sigma Aldrich) (figuras 6-E y 6-F). Este experimento confirmó el papel del LDLR en la unión y endocitosis de Dil-LDL, puesto que no se observó unión de Dil-LDL en las BCEC de ratas LDLR -/-. Al mismo tiempo, no se detectó unión de Dil-LDL ni tinción de Fc-SEQ ID NO:43 en BCEC de LDLR -/-.
50

55 Para confirmar la unión/captación de Fc-SEQ ID NO:43 y Fc-SEQ ID NO:1 a BCEC, se evaluaron diferentes tiempos y concentraciones en el modelo de BBB de rata *in vitro* (figura 7). La gráfica de la figura 7-A muestra una diferencia significativa de unión/captación de Fc-SEQ ID NO:43, en comparación con el fragmento Fc. La gráfica en la figura 7-B muestra una diferencia significativa de unión/captación de Fc-SEQ ID NO:1 en comparación con Fc-CTRL.

60 Ejemplo VI: Protocolos para la síntesis química de conjugados formados por un vector y una molécula terapéutica de interés o un agente de formación de imágenes (o de diagnóstico) o cualquier otra molécula, tal como una sonda

molecular

Una molécula terapéutica de interés o un agente de formación de imágenes o de diagnóstico o cualquier otra molécula, tal como una sonda molecular, puede romperse/liberarse/precipitar con sales del vector después del transporte y paso a través de membranas celulares, más en concreto la BBB, por ejemplo, a través de una estrategia de profármaco mediante hidrólisis o ruptura enzimática de un enlace químico entre el vector y la sustancia activa.

El acoplamiento covalente entre el vector de péptido completamente protegido en sus funciones laterales reactivas (acoplamiento en el C-terminal y N-terminal) o parcialmente protegido (acoplamiento en una función reactiva de una cadena lateral) y la molécula terapéutica de interés se realiza a través de dos estrategias generales (figura 1):

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

Según el vector de péptido y la molécula terapéutica de interés seleccionada, se aplica una u otra de las diversas estrategias en el C-terminal, o en el N-terminal, o sobre una función reactiva de cadena lateral de este vector de péptido. De manera ideal, en una estrategia de profármaco, los espaciadores seleccionados deberían permitir la liberación adecuada de la sustancia activa y la mejora en la solubilidad del conjugado (Molema *et al.*, 2001, Drug targeting, organ-specific strategies, en Methods and principles in medicinal chemistry, vol. 12; Kratz *et al.*, 2008, Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy, en ChemMedChem, vol. 3). Por tanto, pueden generarse diversos enlaces químicos covalentes lábiles entre las dos entidades (vector y sustancia activa) a través o no de un espaciador: amidas, carbamatos, ésteres, tioésteres, disulfuros, etc. Por ejemplo, en la bibliografía se ha demostrado que los enlaces disulfuro, relativamente estables en el plasma, pueden romperse por enzimas tales como la proteína disulfuro reductasa, dentro del compartimento intracerebral para restablecer una función tiol libre (Saito *et al.*, 2003, Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 199-215).

Otros compuestos de interés son aquellos en los que el espaciador es un polímero, tal como polietilenglicol (PEG). En efecto, en la bibliografía se ha demostrado que la conjugación de una molécula orgánica de interés biológico con PEG permite aumentar la semivida en plasma de esta molécula (Greenwald *et al.*, 2003, Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 217-250) y disminuir su eliminación.

Otra estrategia consiste en el uso de conectores inestables frente a ácidos tales como, por ejemplo, los agrupamientos *cis*-aconitilo o hidrazona, estables en el entorno del plasma a pH 7,4, pero que se rompen en el entorno ácido de los endosomas, en donde el pH se sitúa entre 5,5 y 6,5 (D'Souza y Topp, 2001, Release from Polymeric Prodrugs: Linkages and Their Degradation, en Journal of Pharmaceutical Science, vol. 93). Puede utilizarse una tercera familia de conectores de naturaleza peptídica que resiste a las enzimas plasmática, pero que es muy sensible a las proteasas lisosómicas, tales como la catepsina-B, por ejemplo, los tetrapéptidos GFAL y GFLG (Bildstein *et al.*, 2011, Prodrug-based Intracellular Delivery of Anticancer Agents, en Advanced Drug Delivery Review, vol. 63).

Los vectores conjugados con una sustancia activa o una sustancia de interés pueden usarse en el diagnóstico, la formación de imágenes o la terapia de una patología, lesión o trastorno de diferentes células u órganos, tales como el hígado, las glándulas adrenales y el intestino, del SNC y del ojo, para preparar un fármaco capaz de atravesar la BBB/BSCB/BRB, para dirigirse a un tumor cerebral u otro tipo de célula de cáncer para preparar un fármaco capaz de atravesar las membranas de las células de cáncer y/o en patologías infecciosas para preparar un fármaco capaz de atravesar membranas celulares y de dirigirse a las células infectadas de patologías infecciosas bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas del SNC, el ojo u otros tejidos/órganos.

Los ejemplos de sustancias activas de interés terapéutico conjugadas con vectores de péptidos de la invención incluyen, pero no se limitan a doxorubicina y otros agentes citotóxicos, citarabina-C (Ara-C), ribavirina, aciclovir, adefovir y otros agentes antivíricos, inhibidores de prolil-4-hidroxilasa (P4H), metaloproteinasas de matriz (MMP) y otros agentes antifibróticos.

Ejemplo VII: Distribución tisular de péptidos o péptidos conjugados con fármacos de interés terapéutico, agentes de formación de imágenes (o de diagnóstico) o cualquier otra sustancia usada como marcador

Se evalúa la distribución de péptidos y conjugados de péptidos que se dirigen a LDLR en ratones para ilustrar su capacidad para acumularse preferentemente en tejido y órganos que expresan niveles elevados del receptor diana.

De modo similar a los experimentos de perfusión cerebral, los péptidos y conjugados de péptidos inyectados en ratones se marcan de modo radiactivo usando tritio. Diez minutos después de una inyección intravenosa en la vena de la cola de ratones de tipo salvaje o de ratones que carecen del gen que codifica LDLR (ratones LDLR-KO), los ratones se sacrifican y se cuantifica la radiactividad presente en el plasma y los tejidos. Los resultados obtenidos usando el péptido SEQ ID NO:1 como ejemplo ilustran la capacidad de esta familia de vectores de péptidos para dirigirse a los LDLR *in vivo* y para acumularse preferentemente en órganos y tejidos que se sabe que expresan niveles elevados del receptor y que muestran una alta captación de LDL (es decir, una alta actividad de receptores),

que incluyen el hígado, las glándula adrenales y el intestino, con una disminución en aproximadamente 4 veces, en aproximadamente 3,4 y en aproximadamente 3,6 veces de la concentración de péptidos, respectivamente, en los ratones LDLR^{-/-} (KO) comparado con los ratones de tipo salvaje (WT) (figura 9-A).

5 De modo similar, se evaluó la distribución tisular de los péptidos condensados o químicamente acoplados con el fragmento Fc humano de un anticuerpo IgG1 en ratones WT o LDLR^{-/-} cuantificando el resto Fc usando un ensayo ELISA. Dos horas después de una inyección intravenosa en la vena de la cola, los ratones se sacrifican y el plasma, así como los tejidos enriquecidos en LDLR, se analiza para la presencia del péptido-Fc. Como ejemplo, los resultados obtenidos con el péptido SEQ ID NO:1 químicamente acoplado a Fc demuestran que los péptidos de la invención son capaces de activar la acumulación tisular dependiente de LDLR de una proteína acoplada *in vivo*, con una disminución de aproximadamente 6,7 veces y de aproximadamente 30 veces en la acumulación de Fc en el hígado y las glándulas adrenales, respectivamente, en ratones LDLR^{-/-} comparado con ratones WT (figura 9-B).

Ejemplo VIII: Perfusión cerebral *in situ* de vectores solos y vectores conjugados con una molécula terapéutica de interés o un agente de formación de imágenes (o de diagnóstico) o cualquier otra molécula, tal como una sonda molecular, y estudio de su cinética de transporte a través de la BBB y su acumulación en el cerebro de ratón

15 Se emplea la técnica de perfusión cerebral *in situ* (en ratones OF1 macho adultos) para ilustrar el paso hacia el cerebro a través de la BBB.

Antes, los vectores de péptidos se marcan de modo radiactivo con tritio (³H), un elemento que ofrece la mayor sensibilidad para la detección de compuestos radiactivos, de modo notable en secciones de tejidos. Se preparan péptidos radiactivos con elevada radiactividad específica (RAS, hasta 100 Ci/mmol) mediante una estrategia de acilación de la función amina N-terminal mediante anhídrido propiónico (o propanoico) tritiado o N-propionilsuccinimida (NPS) tritiada. Este método de trititación puede aplicarse a todos los péptidos (vectores, o conjugados entre un péptido terapéutico y un vector de péptido en tándem o a través de un conector (de naturaleza peptídica u orgánica)), con la condición de que la modificación del N-terminal no afecte a la afinidad de los péptidos por el receptor diana (es decir, LDLR) o a su actividad biológica en el caso de los péptidos terapéuticos.

25 La reacción de trititación del vector de péptido en la posición N-terminal mediante propionilación se realiza en DMF (1 mg de péptido en 100 μ l a 450 μ l según la solubilidad) añadiendo 0,1 equivalentes de NPS tritiado durante 5 min a temperatura ambiente, después 0,9 equivalentes NPS frío (no tritiado) durante 1 h, y después un nueve equivalente de NPS frío durante 5 h. Después el medio de reacción se deja a 4 °C durante la noche y se purifica al día siguiente mediante HPLC. La RAS para cada péptido tritiado es generalmente de entre 5 Ci/mmol y 60 Ci/mmol. La cantidad total de radiactividad preparada mediante síntesis es, en general, de entre 500 μ Ci y 1000 μ Ci.

Los péptidos radiomarcados (radiomarcados con ³H, por ejemplo) se acoplan covalentemente con una sustancia activa radiomarcada (radiomarcada con ¹⁴C, por ejemplo), según se describe, por ejemplo, en el ejemplo VII. Tal como se mencionó previamente, este acoplamiento covalente se realiza según la estructura y las propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa, en particular en presencia de grupos químicos funcionales que pueden modificarse sin disminuir la actividad biológica de esta sustancia. Los conjugados radiomarcados se sintetizan mediante extrapolación de las vías sintéticas desarrolladas para conjugados no radiomarcados.

Las técnicas resumidas brevemente a continuación fueron desarrolladas previamente para estudiar la distribución en el cerebro de las sustancias activas y, en particular, el papel de la BBB y, más concretamente, de los LDLR en la penetración de estas moléculas en el cerebro. Las técnicas de perfusión cerebral *in situ* son de las más complejas desde el punto de vista técnico y de las más difíciles de realizar en ratones. Sin embargo, la perfusión cerebral *in situ* (como los modelos *in vitro*) permiten el control total de la composición del perfusionado artificial para mantener las células y la vascularización del cerebro bajo condiciones fisiológicas y anatómicas normales dentro del animal, sin el factor de alteración de la distribución sistémica.

Esta estrategia de perfusión cerebral *in situ* realizada en ratas se adaptó para ratones (Dagenais *et al.*, 2000, J. Cereb. Blood Flow Metab., 20(2), 381-386) para ampliar su aplicación para evaluar los parámetros de la cinética de transporte en la BBB y la barrera hematorretiniana, y también en ratones mutantes KO y transgénicos para los receptores, las enzimas o los transportadores de sustancias activas. Implica la cateterización de la arteria carótida en ratones anestesiados (generalmente OF1) y la ligadura de ciertas ramas de esta arteria carótida (externa, tiroidea, occipital) para perfusionar específicamente la carótida interna y las arterias pterigopalatinas, que se emplean para evaluar la captación en el cerebro de los vectores y conjugados. El catéter permite reemplazar la circulación general por la infusión con un perfusionado bien controlado (tampón bicarbonato, plasma o sangre) haciéndolo pasar por la carótida. Primero se emplea también bicarbonato de Krebs oxigenado para evaluar las capacidades de los vectores y los conjugados para pasar al cerebro. Después de la cateterización de la carótida, se detiene el flujo sanguíneo endógeno cortando los ventrículos del corazón para evitar la mezcla del tampón con la sangre y el aumento en la presión sanguínea. La duración de la perfusión de caudal fijo se controla. La perfusión del tampón puede extenderse hasta 20 min, o hasta 1 h en presencia de transportadores de oxígeno (eritrocitos lavados) para los estudios de transporte mediado por receptores ("receptor-mediated transport", RMT).

Los experimentos realizados permiten establecer el transporte cerebral, o el coeficiente de transferencia (K_{in} :

relación entre el volumen de distribución y el tiempo de perfusión cerebral), de varios vectores de péptidos y conjugados de la invención. La duración de la perfusión cerebral en estos experimentos es de 2-5 min, con un caudal de perfusionado de 2 ml/min.

5 Por ejemplo, el K_{in} del péptido opiáceo dalargina, conjugado con SEQ ID NO:17 es de aproximadamente 20×10^{-4} ml/s/g, mientras que el K_{in} de dalargina por sí sola es de aproximadamente $0,9 \times 10^{-4}$ ml/s/g.

Como comparación, Tf, el ligando natural de TfR, tiene un K_{in} de $3,0 \times 10^{-4}$ ml/s/g (Demeule *et al.*, 2008, J. Neurochem., 106 (4), 1534-1544).

Por tanto, estos resultados demuestran que los conjugados de la invención, debido a su pequeño tamaño y configuración ventajosa, presentan un coeficiente de transferencia cerebral mayor que el de Tf.

10 Ejemplo IX: Síntesis y propiedades de los multímeros

Se emplearon péptidos de la invención con afinidad por hLDLR-GFP/RFP como monómeros para sintetizar dímeros. Los monómeros se acoplaron, en disolución o sobre un soporte sólido, a plataformas moleculares que contenían al menos tres grupos funcionales reactivos seleccionados de aminas, ácidos, tioles, azidas, alquinos, carbonilos, hidrazinas. Los monómeros se separan de la plataforma mediante un espaciado compuesto, en general, de una glicina, pero puede ser una molécula de PEG, ácido aminohexanoico o una serie de glicinas. Las plataformas pueden ser compuestos comerciales orgánicos o pueden diseñarse para adaptarse al caso concreto usando la química de péptidos.

Después, los dímeros de la invención se acoplaron/conjugaron con diversos trazadores o sustancias activas usando, por ejemplo, grupos funcionales reactivos libres de la plataforma, separados o no por un grupo espaciador, tal como PEG, ácido aminohexanoico, series de glicinas o conectores heterobifuncionales comerciales.

Se realizó una RP-HPLC analítica y preparativa usando un dispositivo Dionex (Ultimate 3000™). Las columnas analíticas y preparativas C18 se adquirieron en Phenomenex. Se realizó un MALDI-TOF-TOF MS empleando un Ultraflex II Bruker, con ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) como matriz. Se utilizó un sintetizador de microondas Liberty™ (CEM) para la síntesis peptídica automática.

25 - Síntesis de dímeros D1 con péptidos P: (P-CH₂CH₂)₂-N-CH₂CH₂-NH₂

La tris(2-aminoetil)amina y la DMF (dimetilformamida) seca se adquirieron en Sigma-Aldrich, y el PyBop (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio) y la DIEA (diisopropiletilamina) en Iris Biotech.

Los péptidos de la invención P (2 eq.) se preactivaron con PyBop y DIEA (P/PyBop/DIEA: 1/1/2) durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA) en DMF seca y después se añadieron a una disolución de tris(2-aminoetil)amina en DMF seca a 0 °C. Después la mezcla de reacción se dejó en agitación durante la noche a TA. La finalización de la reacción se controló mediante una cromatografía de RP-HPLC analítica. Se obtuvo el dímero puro como un polvo blanco mediante una purificación con RP-HPLC. El dímero bruto se purificó mediante una cromatografía de RP-HPLC. Las fracciones recolectadas se liofilizaron para producir un sólido blanco puro (2,9 mg, 7% con relación a P, pureza > 95%). La masa se confirmó mediante MALDI-TOF MS: m/z [M+H]⁺, calculado 2293,03; encontrado 2294,20.

35 - Síntesis de dímeros D2 con péptidos P: ejemplos de protocolos con Pr-K(P)-K(P)-NH₂, Cya3.5-PEG2-K(P)-K(P)-NH₂

Se adquirieron Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-PEG2-OH, TFA (ácido trifluoroacético), TIS (trisisopropilsilano), HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), HATU (hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5- β]piridinio 3-óxido), piperidina, PyBop, DIEA y la resina Fmoc-Rink Amide AM en Iris Biotech. Se adquirieron Cya 3.5 y Pr₂O (anhídrido propiónico), respectivamente, en Interchim y Sigma Aldrich. Se adquirieron DCM (diclorometano) y DMF en Analytic Lab.

Etapa 1: Se sintetizaron las plataformas de dilisina Pr-K-K-NH₂ y Cya3.5-PEG2-K-K-NH₂ usando la síntesis peptídica en fase sólida ("Solid Phase Peptide Synthesis", SPPS). La SPPS se realizó a mano o sobre un sintetizador de péptidos usando la protección del terminal amino con Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo). El péptido se sintetizó en una escala de 100 μ mol usando un exceso molar en 5 veces de Fmoc-aminoácidos en el caso de la síntesis automática (0,2 M), y un exceso molar en 2,5 veces en el caso de la síntesis manual (0,3-0,5 M). El acoplamiento se realizó sobre una resina Rink Amide AM sobre poliestireno-DVB al 1% (carga = 0,714 mmol/g) para la amida C-terminal usando 1:1:2 aminoácido/HBTU o HATU/DMF. La desprotección se realizó usando piperidina al 20%/DMF. El péptido unido a la resina Pr-K-K-resina se obtuvo después de la propionilación N-terminal usando Pr₂O/DCM: 1/1. El péptido unido a la resina Cya3.5-PEG2-K-K-resina se obtuvo después del acoplamiento N-terminal de Cya3.5-éster de succinimida (1,25 eq.) en DMF. Los productos unidos a resinas se rompieron usando una disolución formada por TFA/TIS/H₂O: 95/2,5/2,5 durante 1 h y 30 min a TA. Los péptidos brutos se precipitaron usando éter enfriado en hielo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 8 min, y se liofilizaron en H₂O/TFA al 0,1%. Se obtuvieron unos sólidos blancos sin purificación, con una pureza mayor que 95%.

- Etapa 2: Después los péptidos P se conjugaron con las plataformas peptídicas a través de las cadenas laterales del aminoácido lisina en disolución. Se añadieron los péptidos P, PyBop y DIEA (P/PyBop/DIEA: 1/1/10) a una disolución de la plataforma peptídica en DMF seca. Después se dejó la mezcla de reacción en agitación a TA. La finalización de la reacción se controló mediante una cromatografía de RP-HPLC analítica. Normalmente fueron suficientes unos pocos minutos para que la plataforma reaccionase completamente. Los dímeros brutos se purificaron mediante una cromatografía de RP-HPLC. Se recogieron las fracciones por encima del 95% y se liofilizaron para obtener sólidos blancos puros. Pr-K(P)-K(P)-NH₂: m = 3,7 mg, 34%, m/z [M+H]⁺, calculado 2476,12; encontrado 2477,09. Cya-PEG2-K(P)-K(P)-NH₂: m = 1,4 mg, 24% m/z [M+H]⁺, calculado 3104,47; encontrado 3107,25.
- 5
- 10 Los péptidos dímeros D2(SEQ ID NO:1)₂ y D2(CTRL)₂ se conjugaron con Cy3.5 (figura 7-A). Para evaluar la capacidad de unión a hLDLR de los péptidos D2(SEQ ID NO:1)₂-Cy3.5 y D2(CTRL)₂-Cy3.5, se realizaron experimentos de pulsos en CHO-hLDLR-GFP (figura 7-B). En estos experimentos, se realizó la unión de 500 nM de péptidos durante 30 min a 4 °C. Después las células se lavan 3 veces con PBS y se fijan con PFA al 4%. Los núcleos de las células se tiñen de azul con Hoechst. Los resultados indican que el péptido D2(SEQ ID NO:1)₂-Cy3.5 se une y se colocaliza con los hLDLR expresados en la membrana plasmática de células CHO-hLDLR-GFP, mientras que el péptido D2(CTRL)₂-Cy3.5 no lo hace. Se evalúa la unión/captación del péptido SEQ ID NO:1-STag frente al péptido SEQ ID NO:1, al péptido D2(SEQ ID NO:1)₂ y al péptido D2(CTRL)₂ en células CHO-hLDLR-GFP usando un ensayo ELISA anti-STag. Con respecto a las estrategias de FRET, las células se lavaron dos veces con 2 ml de PBS y después se incubaron durante 1 h a 37 °C con 250 µl de disolución de péptido (10 µM). Se analizaron 20 µl de cada lisado celular mediante un ensayo de ELISA de "sandwich" desarrollado para la detección de S-Tag. La figura 12-C demuestra que el péptido SEQ ID NO:1-STag es ligeramente desplazado por el péptido CTRL, es desplazado a la mitad por el péptido SEQ ID NO:1, y es casi totalmente desplazado por el péptido D2(SEQ ID NO:1)₂. La afinidad del péptido D2(SEQ ID NO:1)₂ por LDLR es mayor que la del péptido SEQ ID NO:1. La afinidad (K_D) del péptido D1(SEQ ID NO:17)₂ y el péptido D2(SEQ ID NO:1)₂ por hLDLR se determinó mediante resonancia de plasmón de superficie en un sistema Biacore. Para estos experimentos, un chip NiHc (XanTec, referencia: SCBS NIHC1000M) se conjugó con el dominio extracelular de LDLR recombinante (Sino Biological Inc, referencia: 10231-H08H). Los péptidos D1(SEQ ID NO:17)₂ y D2(SEQ ID NO:1) tienen una afinidad muy alta, por debajo de 1E-09 nM (tabla 2).
- 15
- 20
- 25

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> VECT-HORUS CNRS UNIVERSITE AIX MARSEILLE
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS
- 5 <130> B1687PC00
- <160> 5
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 8
<212> PRT
- 15 <213> Artificial
- <220>
<223> péptido
- 20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = (D)-cys
- 25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thz
- 30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Pen
- 35 <400> 1
Xaa Met Xaa Arg Leu Arg Gly Xaa
1 5
- <210> 2
<211> 8
<212> PRT
- 40 <213> Artificial
- <220>
<223> péptido
- 45 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = (D)-Cys
- 50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Thz
- 55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Sar
- 60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (8)..(8)

<223> Xaa = Pen

<400> 2
Xaa Met Xaa Arg Leu Arg Xaa Xaa
 1 5

5 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> péptido

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = D-Cys

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Pip

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Sar

30 <400> 3
Xaa Met Xaa Arg Leu Arg Xaa Cys
 1 5

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> péptido

40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = (D)-cys

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Pip

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = Pen

55 <400> 4
Xaa Met Xaa Arg Leu Arg Gly Xaa
 1 5

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Péptido

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = (D)-cys

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Pip

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Sar

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa = Pen

<400> 5
 Xaa Met Xaa Arg Leu Arg Xaa Xaa
 25 1 5

REIVINDICACIONES

1.- Un péptido seleccionado de cualquiera de SEQ ID NO:1-3 y 5.

2.- Un agente multimérico que tiene la siguiente fórmula (A):



5 en la que:

· cada P representa el mismo péptido o un péptido diferente con la secuencia: A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-A3-A4, en la que A1 y A4 representan independientemente una cisteína o uno de sus análogos seleccionados de (D)-Cys, penicilamina (Pen) y (D)-penicilamina ((D)-Pen), A2 representa una prolina o uno de sus análogos seleccionados de ácido piperídico (Pip) y ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz), y A3 representa una glicina o una sarcosina (Sar);

10 · M es un grupo reticulante; y

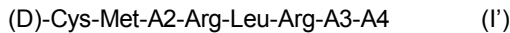
· h e i son, independientemente entre sí, un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4 o 5.

3.- El agente multimérico de la reivindicación 2, en el que A1 es (D)-Cys.

4.- El agente multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que A2 es Pip o Thz.

15 5.- El agente multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que h e i son, independientemente entre sí, 1 o 2, preferiblemente h = i = 1.

6.- El agente multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que P es un péptido de fórmula (I'):



en la que A2 representa Pro, Pip o Thz, A3 representa Gly o Sar, y A4 representa Cys, (D)-Cys, Pen o (D)-Pen.

20 7.- El agente multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que P es un péptido seleccionado de una cualquiera de SEQ ID NO:1 a 5.

8.- El agente multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que M es polilisina o un grupo tris(2-aminoetil)amina.

9.- El agente multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que es un homodímero.

25 10.- El péptido o agente multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho péptido contiene al menos un enlace peptidomimético, elegido entre la intercalación de un grupo metileno (-CH₂-) o fosfato (-PO₂-), amina secundaria (-NH-) u oxígeno (-O-), alfa-azapéptidos, alfa-alquilpéptidos, N-alquilpéptidos, fosfonamidatos, depsipéptidos, hidroximetilenos, hidroxietilenos, dihidroxietilenos, hidroxietilaminas, péptidos retro-inversos, metilenoxi, cetometileno, ésteres, fosfinatos, fosfínicos, fosfonamidas o grupos carba.

30 11.- El péptido o agente multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la función N-terminal (N-term) de dicho péptido se protege mediante acilación y/o la función C-terminal (C-term) de dicho péptido se protege mediante amidación o esterificación.

12.- Un compuesto conjugado de la siguiente fórmula (III):



35 en la que V representa un péptido o un agente multimérico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, S representa un espaciador, D representa una sustancia activa o una sustancia de interés, x es un número entero entre 1 y 5, e y e z son números enteros entre 1 y 10.

13.- El compuesto conjugado de la reivindicación 12, que se caracteriza porque x = z = y = 1; x = z > y; y = z > x; o z > x > y.

40 14.- El compuesto conjugado de la reivindicación 12, que se caracteriza porque la sustancia activa o sustancia de interés es una molécula de interés terapéutico, un agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas, una sonda molecular, una molécula química pequeña, un péptido o polipéptido, una proteína, un antígeno, un anticuerpo o parte de un anticuerpo, un ácido nucleico o un oligonucleótido, un ARNip, un miARN, una ribozima, un marcador o un trazador.

45 15.- El compuesto conjugado de la reivindicación 12, que se caracteriza porque el acoplamiento entre V y D, o entre V y S por una parte, y S y D por otra, se realiza mediante uno o más enlaces covalentes, iónicos, de hidrógeno, hidrófobos o de Van der Waals, que pueden romperse o no romperse en un medio fisiológico o dentro de las células.

16.- El compuesto conjugado de la reivindicación 12, en el que D se acopla con V, si es necesario a través de S, en uno o más extremos N-terminales y/o C-terminales de V y/o en uno o más grupos reactivos portados por las cadenas laterales de los aminoácidos naturales o no naturales constitutivos de V.

17.- Un compuesto conjugado de la siguiente fórmula (IV):

5 P_xD_y (IV)

en la que P representa un péptido de la reivindicación 1, D representa una sustancia activa o una sustancia de interés, y x e y son números enteros de entre 1 y 5.

10 18.- Un método para preparar un compuesto conjugado, que se caracteriza porque comprende una etapa de acoplamiento entre un péptido o multímero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y una sustancia D, si es necesario a través de un espaciador S, mediante una vía química, bioquímica o enzimática, o mediante ingeniería genética.

19.- Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto conjugado de la reivindicación 12 o 17, y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 20.- Una composición de diagnóstico que comprende un agente de diagnóstico o de formación de imágenes médicas constituido por un compuesto conjugado de la reivindicación 12 o 17.

Figura 1

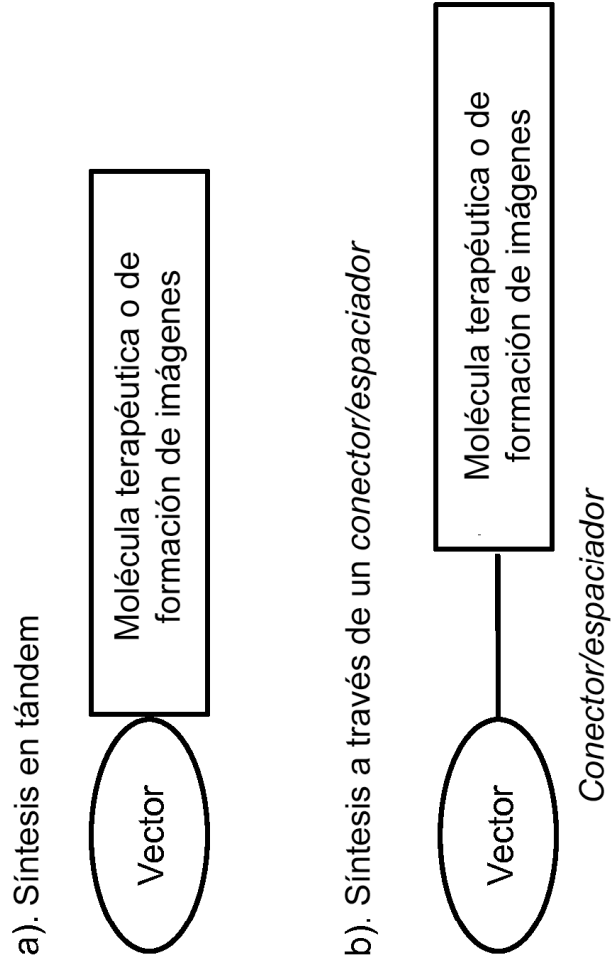


Figura 2

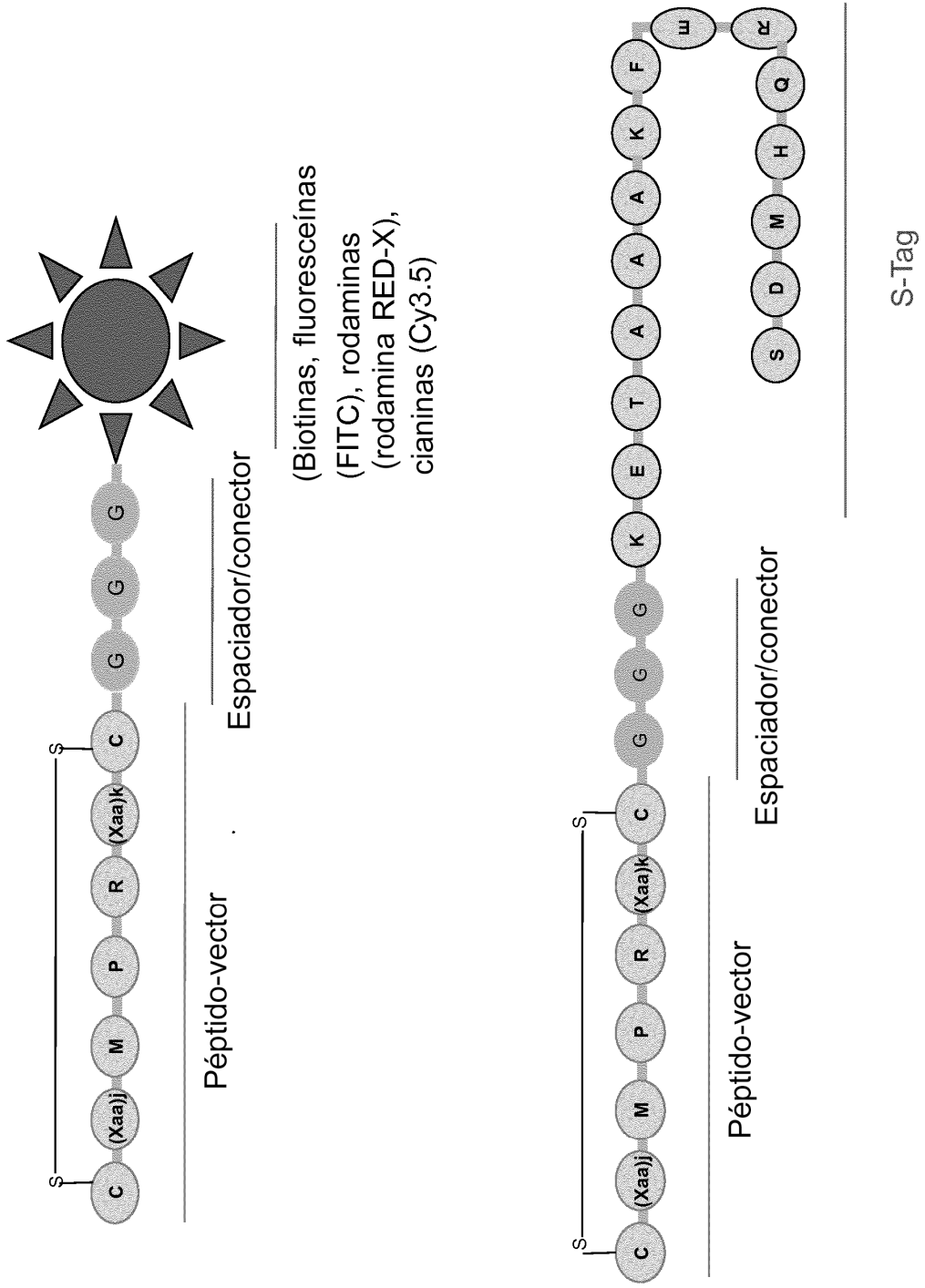


Figura 3

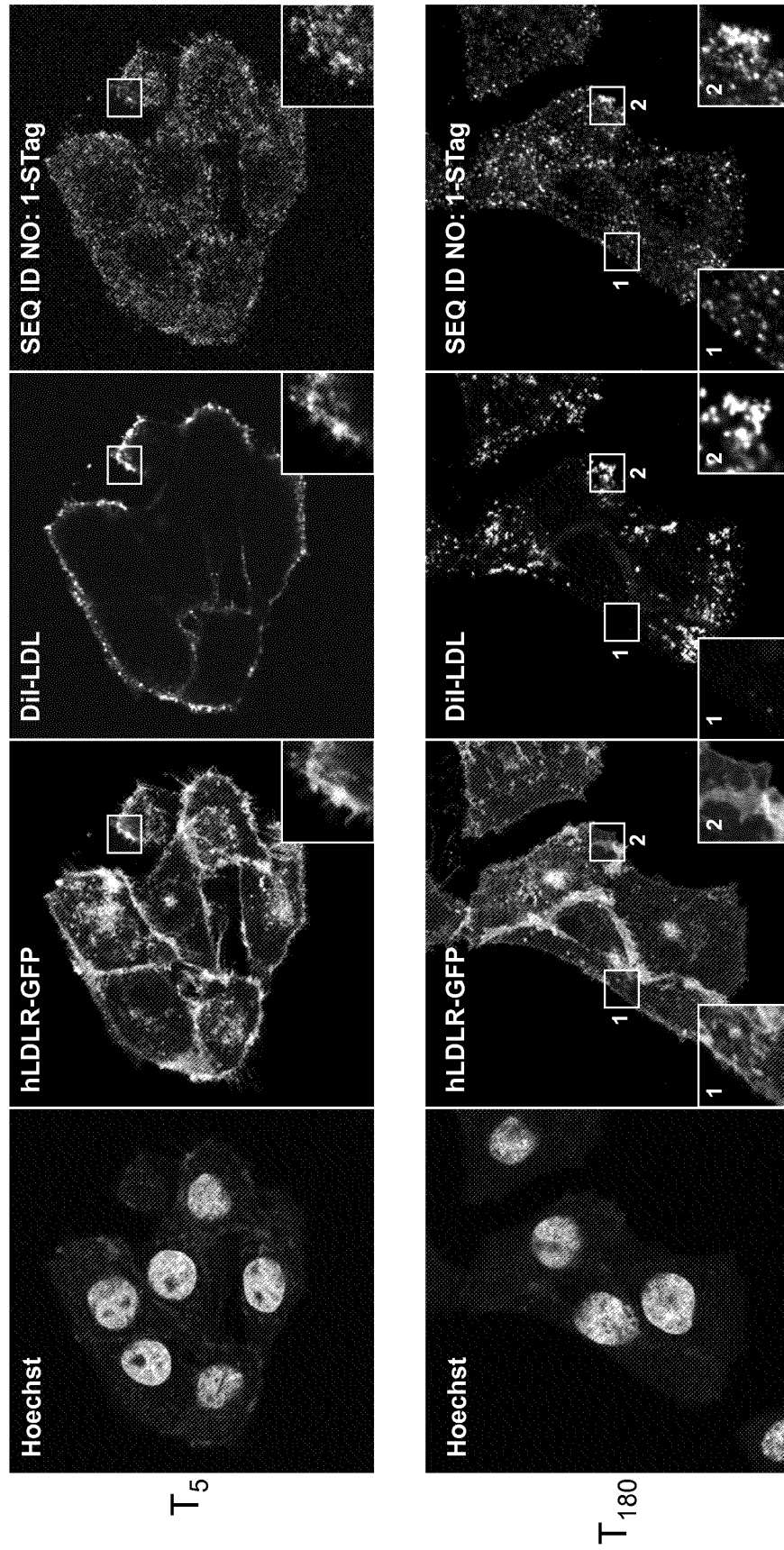


Figura 4

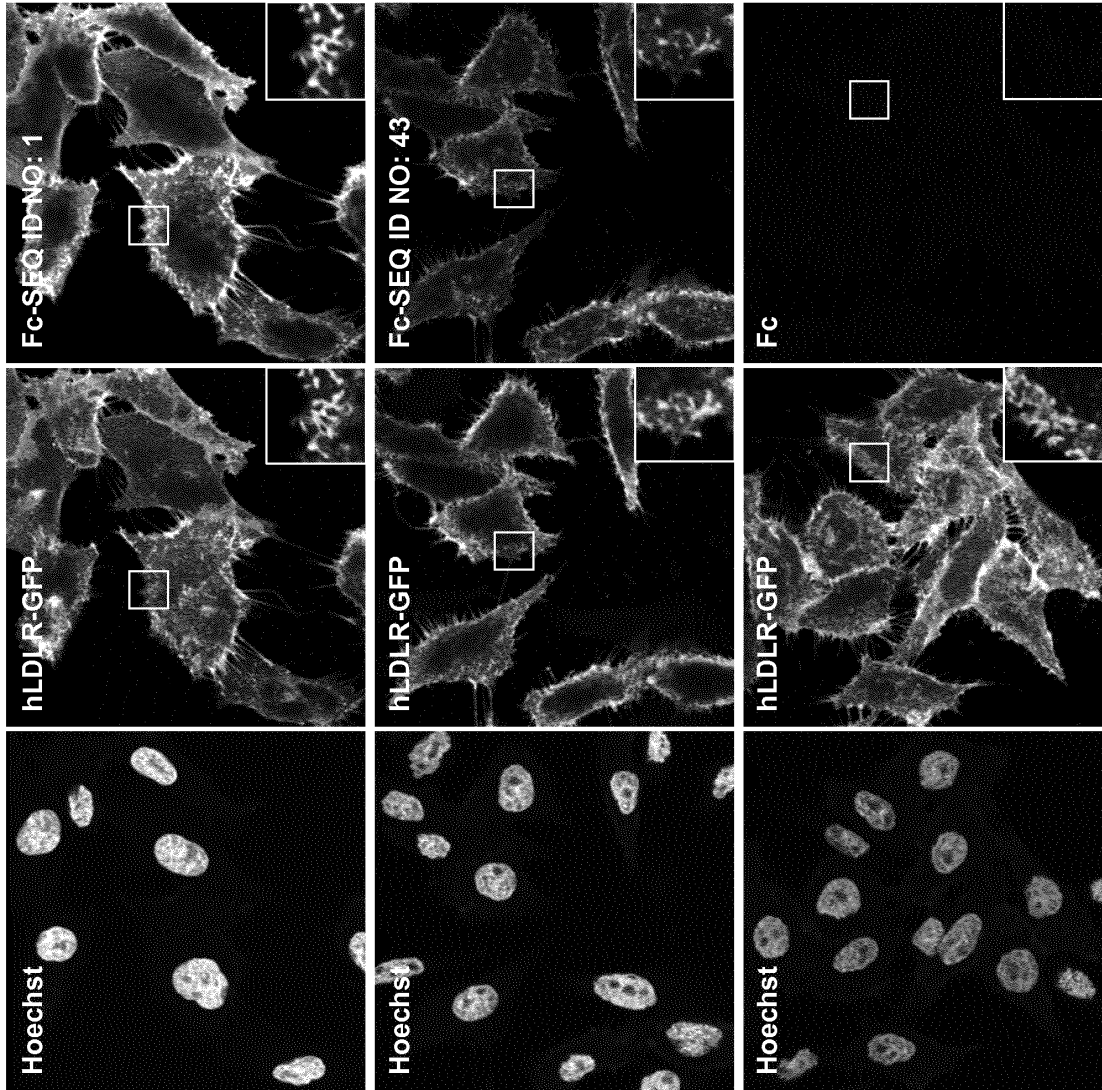


Figura 5

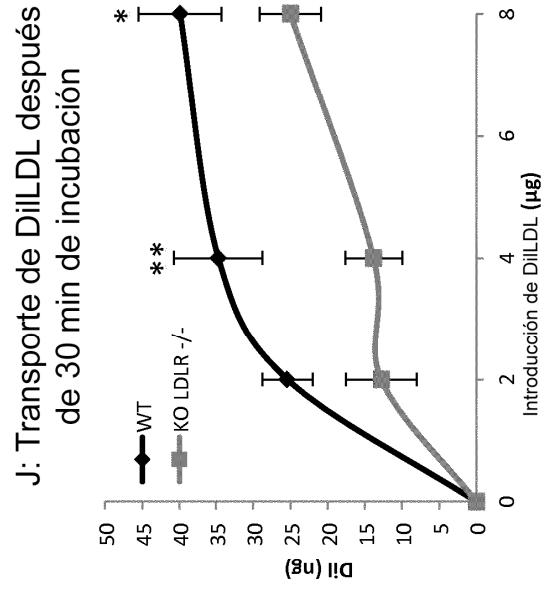
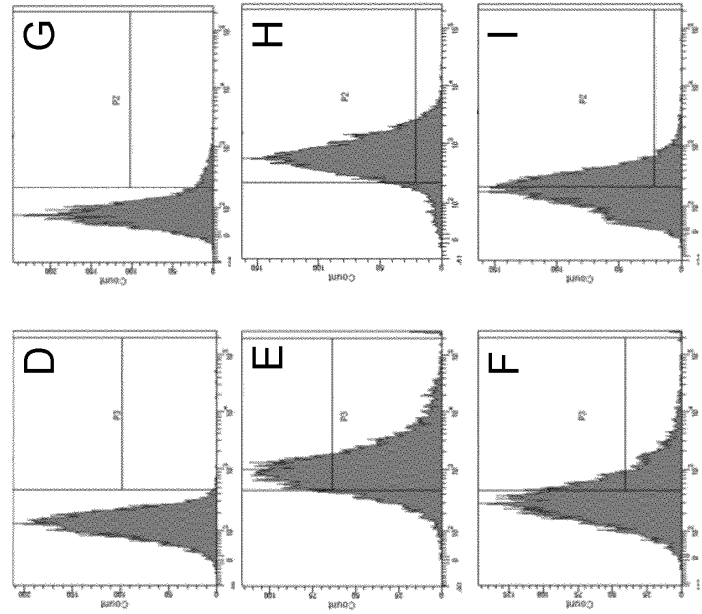
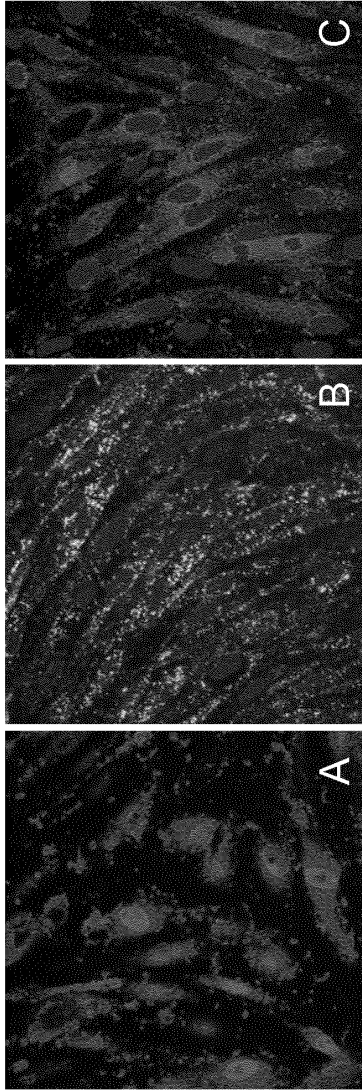


Figura 6

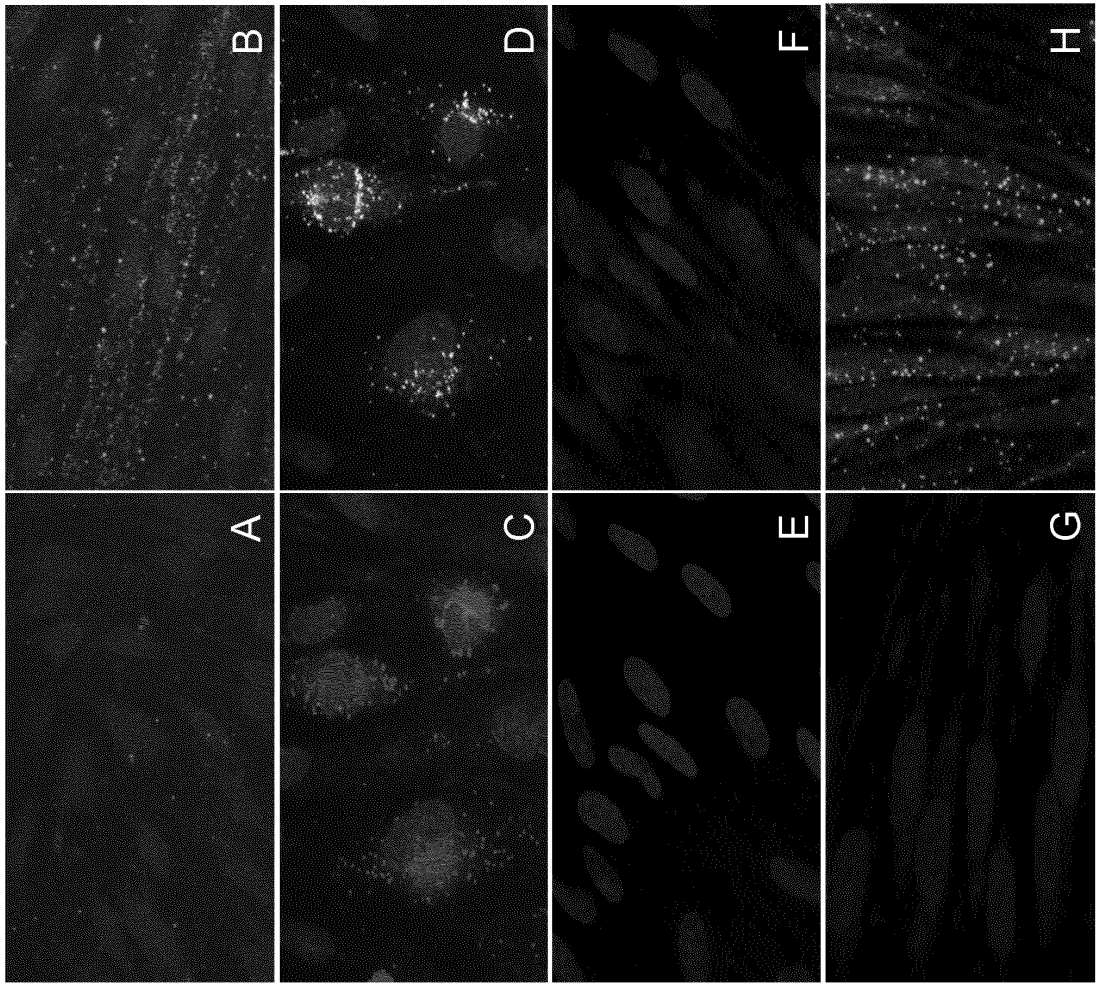


Figura 7

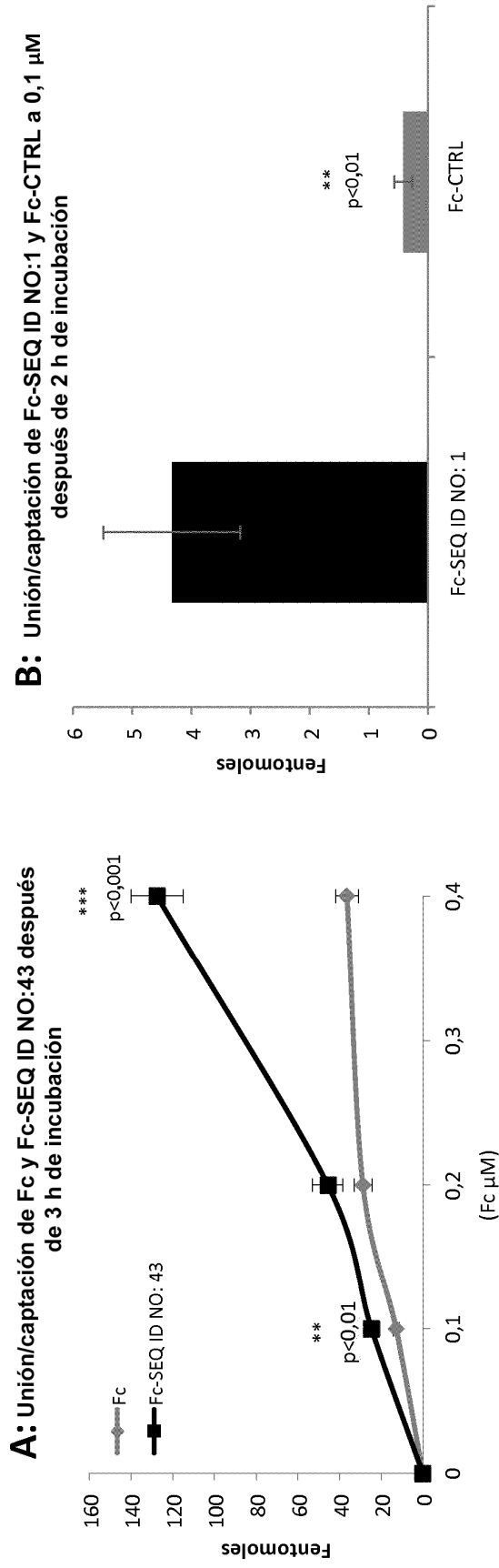
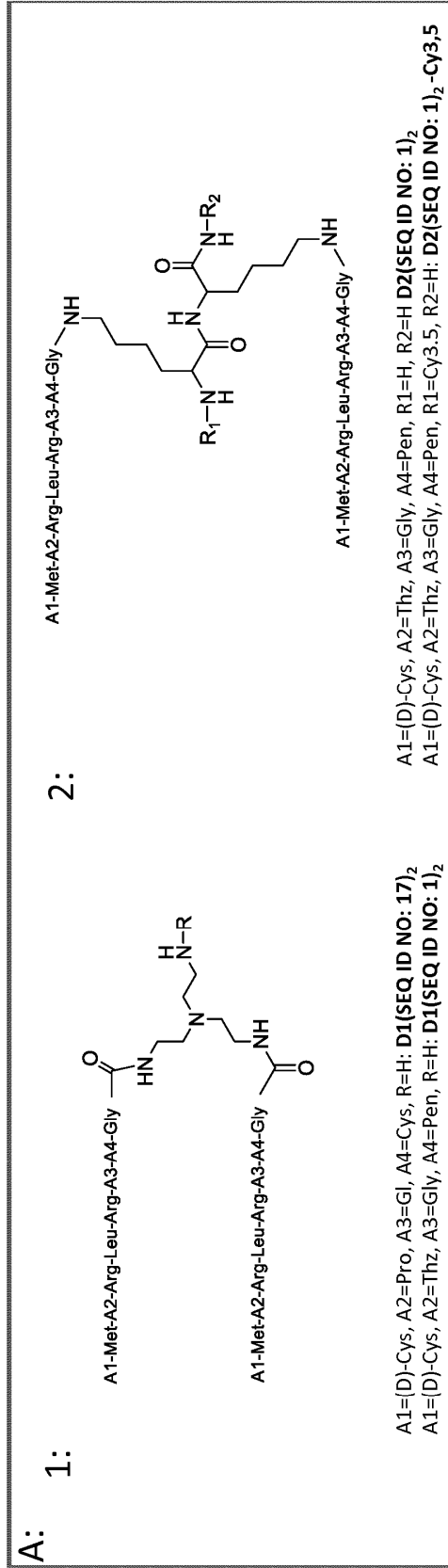
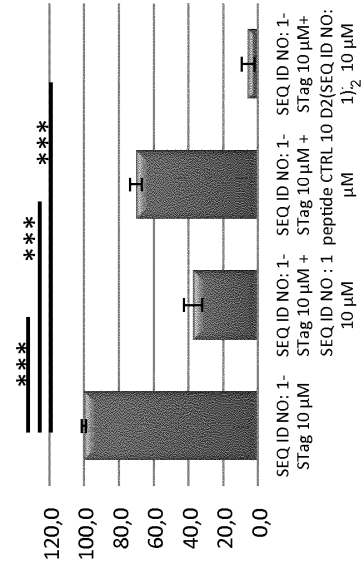


Figura 8



B: Porcentaje de péptido SEQ ID NO:1-STag fijado sobre células CHO-LDLR-GFP determinado mediante un ELISA anti-STag



C:

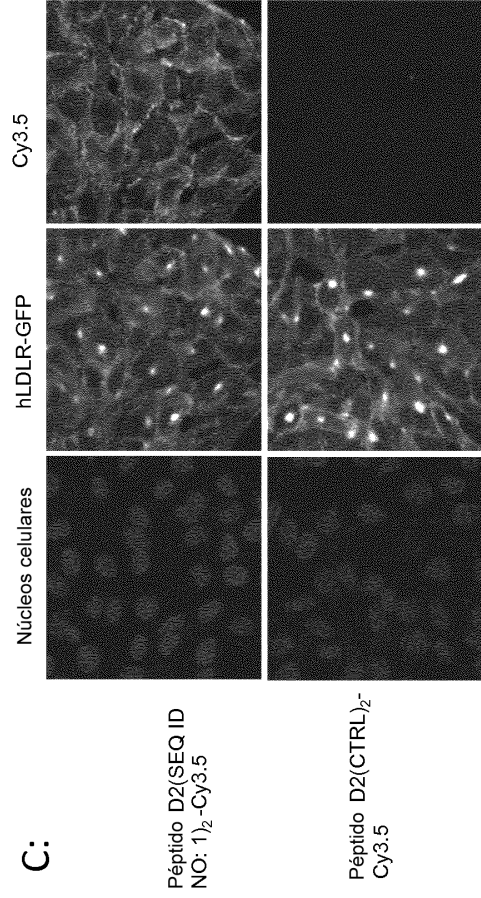


Figura 9

