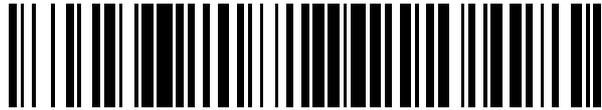


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 536**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/64** (2007.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61K 38/08** (2009.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2015 PCT/EP2015/050856**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2015 E 15700692 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3096795**

54 Título: **Moléculas de neurotensina activadas y sus usos**

30 Prioridad:

**20.01.2014 EP 14305074**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.02.2021**

73 Titular/es:

**VECT-HORUS (50.0%)  
Faculté de Médecine La Timone, 27 Bld Jean  
Moulin, 1er étage Aile Verte Port Laboratoire  
13005 Marseille, FR y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JACQUOT, GUILLAUME;  
LECORCHE, PASCALINE y  
KHRESTCHATISKY, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 805 536 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

### Moléculas de neurotensina activadas y sus usos

La presente invención se refiere a nuevos compuestos que comprenden neurotensina, o uno de sus análogos, conjugada a un grupo activador, según se define en las reivindicaciones (también denominada "neurotensina activada"), a composiciones farmacéuticas que los comprenden y a sus usos. Los compuestos y las composiciones de la invención pueden usarse para reducir la temperatura corporal (por ejemplo, para inducir una normo- o hipotermia farmacológica controlada) en mamíferos que lo necesiten, en particular para inducir una neuroprotección. Pueden usarse, en particular, para reducir los daños en el sistema nervioso central (SNC) asociados, por ejemplo, con isquemia, traumatismos o ataques, así como para tratar el dolor. Los compuestos y las composiciones de la invención también pueden usarse para tratar las convulsiones, la hipertermia, o cualquier trastorno que se beneficiaría de una actividad biológica de la neurotensina.

### Antecedentes

La reducción de la temperatura corporal (hipotermia) es una potente estrategia neuroprotectora contra los daños que aparecen en diversas situaciones, tales como, por ejemplo, una isquemia cerebral asociada a ictus, una parada cardíaca o una isquemia neonatal, ataques, lesiones graves traumáticas del cerebro y la médula espinal, o cirugías cardíacas. La reducción de una hipertermia hasta una normotermia también está justificada en situaciones patológicas con una temperatura corporal elevada (tal como, por ejemplo, hipertensión intracraneal ("intracranial hypertension", ICH), ictus isquémico o hemorrágico, lesión traumática del cerebro ("traumatic brain injury", TBI), sepsis o cualquier infección vírica, bacteriana o parasitaria asociada con fiebre).

En la técnica se han empleado estrategias físicas para reducir la temperatura corporal, que implican métodos externos, tales como un material o un tratamiento enfriante (por ejemplo, mantas de enfriamiento, baños de hielo, etc.) o métodos internos (por ejemplo, sondas de enfriamiento, infusión de fluidos fríos, etc.), o ambos. Sin embargo, estas estrategias físicas son difíciles de poner en práctica, son caras, pueden presentar una aparición retrasada de la acción y/o un efecto transitorio, y pueden inducir efectos secundarios indeseables, tales como temblores que necesiten de la administración de otros tratamientos, que incluyen agentes paralíticos o sedantes.

Se han sugerido estrategias farmacológicas, que fundamentalmente emplean la neurotensina, o uno de sus análogos. La neurotensina (NT) es un tridecapéptido lineal con la secuencia de aminoácidos piroGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH. En los mamíferos, la NT endógena se expresa principalmente en el SNC, en donde actúa como un neurotransmisor y un neuromodulador que interacciona con sistemas dopaminérgicos. La NT también se expresa en tejidos periféricos, principalmente en el tracto gastrointestinal, en donde desempeña un papel en la movilidad intestinal. Además, la desregulación del sistema de la NT se ha implicado en la patofisiología de muchas enfermedades neuropsiquiátricas, así como en varios cánceres. Cuando se administra directamente en el cerebro o la médula espinal, la NT ejerce un potente efecto antinociceptivo independiente de  $\mu$  e hipotermia. Aunque el uso clínico de la NT puede proporcionar un medio interesante e innovador para tratar muchos trastornos patofisiológicos, esto se ve dificultado por su ruptura proteolítica muy rápida en el plasma tras la administración sistémica. Además, su baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica ("blood brain barrier", BBB) obstaculiza su potencial terapéutico, a menos que se administre directamente al cerebro o a la médula espinal. Por tanto, son necesarios métodos de química medicinal que permitan el diseño de compuestos basados en la neurotensina capaces de suscitar una actividad central tras la administración sistémica. Se ha propuesto diseñar análogos de la neurotensina y/o conjugar la neurotensina, o uno de sus análogos, para administrar agentes, tales como anticuerpos (documento WO2011/127580) o para transportar péptidos (documento WO2010/063122; documento WO2012/000118). Se han descrito péptidos de unión a LDLR en el documento WO2010/046588 o el documento WO2011/131896.

Sin embargo, en la técnica se necesitan agentes farmacológicos basados en la neurotensina con una eficacia y unos perfiles de seguridad mejorados, que incluyan una rápida aparición de la acción y una actividad biológica en diferentes trastornos patofisiológicos, que incluyen hipertermia, procesos excitotóxicos, neuroinflamación, convulsiones, así como el dolor.

### Sumario de la invención

La presente invención describe nuevos compuestos de neurotensina que tienen mejores propiedades terapéuticas y su uso en mamíferos, en particular en sujetos humanos. La invención se basa en el diseño de nuevas moléculas que comprenden (a) NT, o uno de sus análogos, acoplada covalentemente con (b) un grupo activador. Los compuestos de "NT activada" de la invención tienen una mejor permeabilidad de la BBB y resistencia a la ruptura proteolítica, y muestra una actividad biológica altamente mejorada. En particular, tras la administración sistémica, los compuestos de NT activada de la invención inducen notables efectos terapéuticos *in vivo*, que incluyen hipotermia, en diversas condiciones terapéuticas, efectos anticonvulsivos en estados epilépticos, y efectos neuroprotectores y antineuroinflamatorios. De modo importante, los compuestos de la presente invención muestran una fuerte actividad biológica con una aparición de la acción muy rápida, junto con una duración de la acción relativamente corta y un perfil de seguridad muy bueno. Estas propiedades proporcionan unos prerrequisitos farmacodinámicos y de

seguridad muy buenos para un control y un ajuste precisos del efecto biológico en trastornos agudos que requieren intervenciones terapéuticas seguras. Además, los compuestos de la invención conservan cierta actividad tras su administración repetida y, por tanto, pueden usarse para un tratamiento repetido o subcrónico.

5 Por tanto, un objeto de la invención se refiere a un compuesto que comprende un polipéptido de neurotensina unido covalentemente a un grupo activador, tal como se define en las reivindicaciones. El acoplamiento al polipéptido de NT puede ser directo o indirecto, concretamente, a través de un grupo conector.

Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto, según se definió anteriormente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Otro objeto de la invención es un método para fabricar un compuesto, según se definió anteriormente, que comprende un acoplamiento covalente de un polipéptido de neurotensina a un grupo activador, tal como se define en las reivindicaciones.

Otro objeto de la invención se refiere a un compuesto o una composición, según se definió anteriormente, para su uso para reducir la temperatura corporal (por ejemplo, para inducir hipotermia o normotermia), para reducir las convulsiones, así como para tratar el dolor, en un sujeto mamífero.

15 Otro objeto de la invención se refiere a un compuesto o una composición, según se definió anteriormente, para su uso para prevenir, proteger o reducir los daños cerebrales en un sujeto mamífero.

En la presente también se describe un método para inducir una hipotermia en un sujeto mamífero, que comprende la administración sistémica a dicho sujeto de un compuesto o una composición según se definió anteriormente.

20 En la presente también se describe un método para tratar un sujeto que presenta daños cerebrales, comprende la administración sistémica a dicho sujeto de un compuesto o una composición según se definió anteriormente.

25 La invención puede usarse para tratar los daños cerebrales (por ejemplo, proteger, prevenir o reducir su efecto) en cualquier sujeto mamífero, tal como un paciente humano. Resulta particularmente adecuada para tratar un sujeto que presenta isquemia cerebral, ictus, parada cardíaca o isquemia neonatal, ataques, lesiones traumáticas graves en la cabeza y la médula espinal, cirugía cardíaca, ICH, sepsis o cualquier infección vírica, bacteriana o parasitaria asociada con fiebre. También es adecuada para tratar un sujeto que presenta ataques resistentes a agentes anticonvulsivos convencionales o hipertermia que es resistente a agentes farmacológicos antipiréticos convencionales o, en combinación con las técnicas de enfriamiento convencionales, para que los pacientes inicien su enfriamiento con más rapidez.

### Leyendas de las figuras

30 Figura 1. Efecto de una disolución salina (NaCl al 0,9%), NT o el compuesto I sobre la temperatura corporal rectal de ratones Swiss (CD-1) tras una inyección intravenosa (en embolada) a la dosis equivalente molar (eq.) de NT de 8 mg/kg.

Figura 2. Relación de dosis-respuesta hipotérmica del compuesto I en ratones Swiss (CD-1) inyectados i.v. (embolada) a unas dosis de eq. de NT que varían de 0,5 a 8 mg/kg.

35 Figura 3. Respuesta hipotérmica en ratones Swiss (CD-1) del compuesto I, compuesto II y compuesto IV. Los compuestos I, II y IV se inyectaron i.v. (en embolada) en ratones al mismo nivel de dosis de 0,5 mg/kg de eq. de NT.

Figura 4. Relación de dosis-respuesta hipotérmica del compuesto II en ratones Swiss (CD-1) inyectados i.v. (embolada) a unas dosis de eq. de NT que varían de 0,03 a 10 mg/kg. La dosis eficaz mínima ("minimal effective dose", MED) es de 0,35 mg/kg de eq. de NT, y se observó el efecto máximo a 10 mg/kg de eq. de NT.

40 Figura 5. Transporte a través de la BBB y de la barrera hematorretiniana ("blood retina barrier", BRB) de [<sup>3</sup>H-Tyr3]-NT, [<sup>3</sup>H-Tyr3]-compuesto I y [<sup>3</sup>H-Tyr3]-compuesto XIV en ratones usando perfusión cerebral *in situ*.

45 Figura 6: Estabilidad en sangre *in vitro* de NT, el compuesto I, el compuesto IV y el compuesto XIV. Se incubaron péptidos a 37 °C en sangre de ratón Swiss (CD-1) recién recolectada, y se cuantificó el porcentaje de péptido intacto remanente en la fracción del plasma en los momentos indicados usando un método analítico de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Figura 7. Comparación de la respuesta hipotérmica en ratones Swiss (CD-1) del compuesto II con los compuestos de neurotensina activada de la invención que comprenden análogos más cortos de la NT. El compuesto II, el compuesto V, el compuesto VI o el compuesto VII se inyectaron i.v. (en embolada) en ratones al mismo nivel de dosis de 0,5 mg/kg de eq. de NT. Todos los conjugados mostraron una potencia hipotérmica similar.

50 Figura 8: Efecto hipotérmico de los compuestos II y VIII en ratones Swiss (CD-1). El compuesto II o el compuesto VIII se inyectaron i.v. (en embolada) en ratones al mismo nivel de dosis de 10 mg/kg de eq. de NT.

Figura 9. Comparación de la respuesta hipotérmica en ratones Swiss (CD-1) de conjugados de neurotensina que comprenden conectores diferenciados entre el grupo activador N-terminal de SEQ ID NO:9 y el resto C-terminal NT(6-13) o NT(8-13). Los conjugados que no comprenden un grupo conector (compuesto IX) o que comprenden un conector GGG (compuesto X), Ahx (compuesto XII), PEG2 (compuesto XIII) o PEG6 (compuesto XIV) se inyectaron i.v. (en embolada) en ratones al mismo nivel de dosis de 10 mg/kg de eq. de NT.

Figura 10: Comparación de la respuesta hipotérmica en ratas Sprague-Dawley de conjugados en tándem de SEQ ID NO:9-NT(8-13) o SEQ ID NO:11-NT(8-13) que comprenden análogos de NT(8-13). Los conjugados que comprenden sustituciones [Tle12] (compuesto XV), [Lys8, Tle12] (compuesto XVI y compuesto XX), [Lys9, Tle12] (compuesto XVII), [Trp11, Tle12] (compuesto XVIII) o [Lys8, Trp11, Tle12] (compuesto XIX) en la secuencia de NT(8-13) se inyectaron i.v. (en embolada) en ratas al mismo nivel de dosis de 5 mg/kg de eq. de NT.

Figura 11. Efecto de la administración repetida del compuesto XIV sobre la temperatura corporal. Ratones Swiss (CD-1) recibieron inyecciones i.v. (en embolada) diarias del compuesto XIV a la dosis de 4 mg/kg de eq. de NT durante 4 días, y se evaluó la respuesta hipotérmica cada día durante 3 horas tras la administración del tratamiento. El compuesto XIV conservó un efecto hipotérmico significativo y estable a lo largo de los días.

Figura 12. Efecto antipirético del compuesto XIV en un modelo de ratón de hipertermia inducida por levaduras. Una inyección subcutánea de una suspensión de levaduras en ratones NMRI provocó un aumento +0,8 °C en la temperatura rectal (línea de base 2, ratones hipertérmicos frente a ratones no expuestos). El compuesto XIV inyectado i.v. (en embolada) a los niveles de dosis indicados no solo mostró un efecto antipirético, sino que también indujo una hipotermia fuerte y dependiente de la dosis a niveles de dosis intermedios y altos.

Figura 13. Efectos del compuesto XIV sobre la temperatura corporal y la intensidad de los estados en el estado epiléptico ("status epilepticus", SE). Se administró a ratones el fármaco proconvulsivo kainita (KA) que induce ataques de estadio 5 o estadio 6 después de 2 horas, característicos del SE y a menudo asociados con hipertermia. El compuesto XIV administrado 30 minutos después de la aparición de SE (SE30) a la dosis de 2 o 4 mg/kg de eq. de NT condujo invariablemente a una hipotermia transitoria que persiste al menos 2 hr (figura 13 A). La hipotermia inducida por el compuesto XIV se asoció con una disminución significativa en los ataques en el grupo de SE30+compuesto XIV. Un subconjunto de animales fueron administrados i.p. con una dosis alta de diazepam (DZP), usado como control positivo por sus efectos anticonvulsivos en modelos de ataques. No se observaron variaciones significativas en la temperatura corporal ni en la intensidad de los ataques cuando se administra neurotensina (NT8-13) 30 min después de la aparición de SE, comparado con animales SE (figura 13 B).

Figura 14. Efectos neuroprotectores y antineuroinflamatorios del compuesto XIV en ratones con daños excitotóxicos graves y neuroinflamación después de SE inducido por KA. Se usó el marcaje inmunohistoquímico (figura 14A) para evaluar el grado de daños cerebrales en secciones coronales de la formación del hipocampo en animales SHAM (A, D, G), SE (B, E, H) y SE + compuesto XIV (SE + HT) (C, F, I). Las neuronas se marcaron en A, B y C con el anticuerpo anti-NeuN que marca una proteína nuclear neuronal específica. Las flechas apuntan a las neuronas en las capas de células piramidales CA1 y CA3, así como en la región hilar (H) del giro dentado (DG). La neuroinflamación se evaluó con anticuerpos anti-GFAP (D, E, F) e Iba1 (G, H, I) para controlar la reactividad astrocítica y microglial, respectivamente. Las flechas pequeñas apuntan a los astrocitos y la microglia reactivos. Barra de escala = 500 µm. La gliosis inducida por SE afectó a los tipos celulares microgliales y astrogliales. En animales SHAM, se detectó un marcaje basal para GFAP e Iba1 en el hipocampo (figura 14A). En animales SE, se produjo una activación muy fuerte de las células gliales en todas las capas del hipocampo. Esta respuesta inflamatoria disminuyó significativamente cuando se administra el compuesto XIV (SE + HT) 30 min después de la aparición de SE.

Se usó un marcaje con NeuN y Fluoro-jade C para cuantificar la muerte neuronal y los efectos del compuesto XIV (figura 14 B). En animales SHAM, no se observó muerte neuronal en el hipocampo. En animales SE, se observó una importante muerte neuronal en las capas de células piramidales CA1-3 y DG. La neurodegeneración observada en animales SE disminuyó significativamente cuando se administra el compuesto XIV o DZP 30 min después de la aparición de SE, pero no se observaron cambios cuando se administra NT(8-13) (figura 14 B).

Figura 15. El compuesto XIV atenúa la germinación de fibras musgosas en el hipocampo 8 semanas después de SE. Se produce una germinación aberrante de fibras musgosas, los axones de células granulares del giro dentado, en la capa molecular interna ("inner molecular layer", IML) en respuesta a la pérdida de células hilares, y esto está bien establecido en modelos de ataques en animales y en la epilepsia en seres humanos. Los efectos del compuesto XIV sobre la germinación se evaluaron 8 semanas después de la inducción de SE con marcaje inmunohistoquímico para el transportador vesicular de cinc 3 (ZnT3). En animales SHAM, están presentes terminales de fibras musgosas en el hilo y el estrato lúcido de la región CA3 y no se observaron terminales en la IML del DG. En animales SE, se observaron terminales de fibras musgosas dentro de la IML. En comparación con animales SE, el número de terminales que inervan la IML se redujo considerablemente en animales administrados con el compuesto XIV (SE + HT, figura 15A) o DZP 30 min después de la aparición de SE, pero permaneció relativamente sin cambios cuando se administra NT(8-13) (figura 15A, 15B).

Figura 16. Efecto antinociceptivo del compuesto XIV en el ensayo de contorsión en ratones. El compuesto XIV se

inyectó i.v. (en embolada) a niveles de dosis crecientes de 0,5, 1 y 5 mg/kg de eq. de NT en ratones 30 min antes de una inyección intraperitoneal de 10 ml/kg de ácido acético al 0,5%. Se midió el número de estiramientos abdominales que aparecen en cada ratón durante un periodo de 10 min que comienza 5 min después de la inyección i.p. de ácido acético (recuento de contorsiones/10 min).

## 5 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos compuestos basados en neurotensina, composiciones farmacéuticas que los comprenden, y sus usos, por ejemplo, para inducir una reducción controlada de la temperatura corporal (por ejemplo, hipotermia o normotermia), un efecto anticonvulsivo controlado, o una analgesia en sujetos que lo necesitan.

10 Más en concreto, un objeto de la invención reside en un compuesto que comprende un polipéptido de neurotensina unido covalentemente a un grupo activador, tal como se define en las reivindicaciones.

Tal como se ilustra en la sección experimental, los compuestos de neurotensina activada de la invención muestran unas propiedades biológicas altamente mejoradas, que incluyen una mejor permeabilidad del BBB y una alta resistencia a la ruptura proteolítica, cuando se comparan con la NT nativa. Los compuestos muestran una potente actividad biológica a niveles de dosis bajos tras la administración sistémica, con una aparición de la acción muy rápida, junto con unos perfiles de seguridad y tolerancia elevados. En particular, los compuestos de la invención i) inducen un efecto hipotérmico central hasta 80 veces superior al obtenido con la NT nativa, ii) no inducen temblores asociados con la hipotermia, iii) muestran un efecto meseta que previene una hipotermia exagerada potencialmente mortal, iv) muestra un margen de seguridad significativo entre la dosis eficaz mínima (MED) tras una inyección intravenosa (en embolada) y la dosis máxima tolerada ("maximal tolerated dose", MTD), v) conservan una actividad biológica significativa tras la administración intravenosa repetida, lo cual demuestra su idoneidad para trastornos que requieren un tratamiento repetido o subcrónico, vi) muestran potentes actividades antipiréticas, vii) reducen o detienen, de modo eficaz, los ataques motores, viii) muestran actividades neuroprotectoras y antineuroinflamatorias, ix) reducen, de modo eficaz, la germinación axonal aberrante tras los ataques y en la epilepsia, y x) inducen unos efectos analgésicos significativos, con lo que demuestran una eficacia y unos efectos beneficiosos inesperados en trastornos patofisiológicos diferenciados.

Los compuestos de la invención fundamentalmente comprenden un polipéptido de neurotensina acoplado covalentemente a un grupo activador. El grupo activador puede estar unido covalentemente al polipéptido de neurotensina, directa o indirectamente, a través de un grupo conector. Los compuestos también pueden representarse mediante la siguiente fórmula (I):



en la que NT indica el polipéptido de neurotensina; Conector es una plataforma o molécula reticulante que tiene al menos dos grupos reactivos, iguales o diferentes; y AG es el grupo activador, tal como se define en las reivindicaciones. Debe entenderse que la disposición espacial, la estrategia de conexión y los puntos de anclaje de los restos entre sí pueden ajustarse para proporcionar una actividad optimizada

### *Polipéptido de neurotensina*

El polipéptido de neurotensina según esta solicitud es un polipéptido que comprende SEQ ID NO:2, o uno de sus análogos que comprende una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos y que tiene una actividad biológica de la neurotensina, tal como la capacidad de inducir hipotermia o analgesia. La expresión polipéptido de neurotensina incluye la neurotensina, o sus fragmentos o variantes, que conserva una o varias actividades biológicas de la neurotensina.

La neurotensina de tipo salvaje humana es un péptido de 13 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia: pELYENKPRRPYILOH (SEQ ID NO:1).

Por tanto, un polipéptido de neurotensina de la invención incluye, preferiblemente, cualquier polipéptido que comprenda:

(i) SEQ ID NO:1,

(ii) un variante natural de (i),

(iii) un fragmento de (i) o (ii), o

(iv) un análogo de cualquier secuencia de (i)-(iii), que comprende preferiblemente una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos, que comprende aún más preferiblemente una sustitución o modificación de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 restos aminoácidos, aún más preferiblemente de 1, 2, 3 o 4 restos aminoácidos,

teniendo dicho polipéptido la capacidad para suscitar una o varias actividades biológicas de la neurotensina, tales como hipotermia o analgesia.

Los polipéptidos de neurotensina según la invención comprenden fragmentos de neurotensina que comprenden al menos los aminoácidos 8-13 de la neurotensina humana ("NT(8-13)"), o los aminoácidos 6-13 de la neurotensina humana ("NT(6-13)"), o los aminoácidos 2-13 de la neurotensina humana ("NT(2-13)"). Se ha indicado que estos fragmentos que comprenden al menos el fragmento C-terminal de NT(8-13) suscitan la mayoría, sino todas, las actividades biológicas de la neurotensina. A continuación, se proporcionan las correspondientes secuencias de aminoácidos:

NT(8-13): RRPYIL (SEQ ID NO:2)

NT(6-13): KRRRPYIL (SEQ ID NO:3)

NT(2-13): LYENKRRRPYIL (SEQ ID NO:4)

En una realización particular, la secuencia del polipéptido de neurotensina según la invención comprende 1, 2, 3, o 4 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustitución o inserción o modificación química), comparado con la secuencia de un polipéptido de neurotensina de tipo salvaje, o uno de sus fragmentos. A este respecto, pueden realizarse la siguientes sustituciones y modificaciones de aminoácidos en la NT, o cualquiera de sus fragmentos, de manera individual o en una o más combinaciones, para producir análogos biológicamente activos de la neurotensina para su uso en la invención:

- Acetilación N-terminal, para generar, por ejemplo, acetil-NT (2-13), o acetil-NT(6-13), o acetil-NT(8-13),
- Sustitución de Arg8 por (D)-Arg, Lys, (D)-Lys, HLys (homolisina), Dab (ácido diaminobutírico), Orn (ornitina), (D)-Orn o por alfa-desamino-N,N-dimetilhomolisina, para generar, por ejemplo, [(D)-Lys8]NT(8-13), [Lys8]NT(8-13) o [HLys8]NT(8-13),
- Sustitución de Arg9 por Lys, (D)-Lys, Orn, (D)-Orn, Dab, (D)-Arg, HLys (homolisina), o por alfa-desamino-N,N-dimetilhomolisina, para generar, por ejemplo, [Lys9]NT, [Lys9]NT(8-13), [(D)-Orn9]NT o [(D)-Orn9]NT(8-13),
- Sustitución de Tyr11 por Trp, (D)-Trp, *neo*Trp, (D)-Tyr, Phe, (D)-Phe, Nal (naftilalanina) o (D)-3,1-naftilalanina, para generar, por ejemplo, [Trp11]NT(8-13), [(D)-Tyr11]NT(8-13), [Trp11]NT, [(D)-Tyr11]NT;
- Sustitución de Ile12 por Tle (terc-butil-leucina) para generar, por ejemplo, [Tle12]NT(8-13), [Tle12]NT;
- Sustituciones combinadas de Arg8, Arg9, Tyr11 e Ile12, para generar, por ejemplo, [(D)-Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13), [Lys9, Trp11, Tle12]NT(8-13), [Lys8, Tle12]NT(8-13), [Lys9, Tle12]NT(8-13), [Trp11, Tle12]NT(8-13), [Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13) o [HLys8, Tle12]NT(8-13);
- Modificación de enlaces peptídicos en las posiciones 8-9, 9-10, 10-11, 11-12 o 12-13 con enlaces reducidos de CH<sub>2</sub>NH (psi); y/o
- Ciclación de un dímero de NT(8-13), con o sin cualquiera de las posibles sustituciones o modificaciones de aminoácidos anteriores.

En una realización preferida, el polipéptido de neurotensina se selecciona de NT humana, NT(2-13), NT(6-13) o NT(8-13), o sus análogos que tienen de 1 a 4 modificaciones de aminoácidos.

A este respecto, en la realización más preferida, el polipéptido de neurotensina se selecciona de [Lys8]NT(8-13), [Lys9]NT(8-13), [HLys8]NT(8-13), [(D)-Lys8]NT(8-13), [(D)-Orn9]NT(8-13), [Lys8, Lys9]NT(8-13), [(D)-Lys8, Lys9]NT(8-13), [Trp11]NT(8-13), [*neo*Trp11]NT(8-13), [Tle12]NT(8-13), [Trp11, Tle12]NT(8-13), [*neo*Trp11, Tle12]NT(8-13), [Lys8, Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8, Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8, Trp11]NT(8-13), [(D)-Lys8, *neo*Trp11]NT(8-13), [Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8, *neo*Trp11, Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8, Lys9, Trp11, Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8, Lys9, *neo*Trp11, Tle12]NT(8-13), [Lys9, Trp11]NT(8-13), [Lys9, *neo*Trp11]NT(8-13), [Lys9, Trp11, Tle12]NT(8-13), [Lys9, *neo*Trp11, Tle12]NT(8-13), [HLys8, Tle12]NT(8-13), [HLys8, Trp11]NT(8-13), [HLys8, *neo*Trp11]NT(8-13), [HLys8, Trp11, Tle12]NT(8-13), [HLys8, *neo*Trp11, Tle12]NT(8-13), [(D)-Orn9, Tle12]NT(8-13), [(D)-Orn9, Trp11]NT(8-13), [(D)-Orn9, *neo*Trp11]NT(8-13), [(D)-Orn9, Trp11, Tle12]NT(8-13), o [(D)-Orn9, *neo*Trp11, Tle12]NT(8-13).

En otra realización preferida, el polipéptido de neurotensina de la invención es una NT de tamaño completo, o un polipéptido NT(2-13) o NT(6-13) que comprende cualquiera de las anteriores sustituciones de aminoácidos.

En la realización más preferida, el polipéptido de neurotensina es NT(8-13) o uno de sus análogos que conserva una o varias actividades biológicas de la neurotensina.

Se describen polipéptidos de neurotensina o sustituciones de neurotensina, por ejemplo, en Rivier *et al.*, J. Med. Chem., 1977; Tokumura *et al.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokio), 1990; Labbé-Jullié *et al.*, J. Pharm. Exp. Ther., 1994; Tyler *et al.*, Brain Res., 1998; Podstawka-Proniewicz *et al.*, J. Phys. Chem., 2011; Kitabgi *et al.* Mol. Pharm., 18, 11-19 (1980), solicitudes de patente US2009/0062212, WO 2008/137720, WO 1999/52539, WO 2007/070672, WO 2010/063122 o WO 2012/000118.

*Grupo activador*

Los compuestos de neurotensina activada de la invención comprenden un grupo activador, tal como se define en las reivindicaciones, que potencia su actividad. A este respecto, el grupo activador comprende la secuencia de aminoácidos M-aa1-R-L-R, en la que aa1 es un resto prolina ("P") o uno de sus análogos seleccionados de ácido pipecólico (Pip) y ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz). En la anterior fórmula, M indica metionina, R indica arginina, y L indica leucina. Tal como se muestra en la sección experimental, dicho grupo activador confiere a las moléculas de neurotensina activada de la invención una actividad biológica y una forma farmacológicamente activa mejoradas. En particular, el injerto de dicho grupo activador genera moléculas de neurotensina activada que son hasta 80 veces más potentes para reducir la temperatura corporal que la NT endógena cuando se administran por vía intravenosa. Además de este notable efecto hipotérmico, los compuestos muestran una actividad antipirética inesperada. También tienen el potencial de reducir o detener ataques motores y muestra una actividad neuroprotectora potente e inesperada mediante la inhibición de la muerte neuronal asociada a la excitotoxicidad y la neuroinflamación, y mediante la reducción de la germinación axonal aberrante asociada con convulsiones y epilepsia. Además, las moléculas de neurotensina activada de la invención muestran unos perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos muy buenos, con una rápida aparición de la acción tras la administración sistémica, una fuerte actividad hipotérmica a niveles de dosis bajos, y un perfil de seguridad muy bueno sin temblores asociados con la hipotermia, un efecto meseta que evita la aparición de una hipotermia exagerada potencialmente mortal, y un margen de seguridad 400 veces mayor entre la MED y la MTD. Por último, el compuesto muestra un efecto analgésico significativo mediante administración intravenosa.

Según realizaciones preferidas, el grupo activador comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

M-P-R-L-R (SEQ ID NO:5);

M-Pip-R-L-R (SEQ ID NO:6); o

M-Thz-R-L-R (SEQ ID NO:7).

En otra realización particular, la secuencia de aminoácidos en el grupo activador comprende otro resto cisteína N-terminal ("C") en configuración L o D, es decir, comprende la secuencia de aminoácidos C-M-aa1-R-L-R o c-M-aa1-R-L-R, en la que aa1 es como se definió anteriormente. En la realización más preferida, el resto cisteína N-terminal "C" está en la configuración D.

En otra realización particular, la secuencia de aminoácidos en el grupo activador comprende dos restos C-terminales más, es decir, comprende la secuencia M-aa1-R-L-R-aa2-aa3, preferiblemente c-M-aa1-R-L-R-aa2-aa3, en la que aa1 es como se definió anteriormente, aa2 es Gly o su análogo Sar (sarcosina), y aa3 es Cys o su análogo Pen (penicilamina).

Los grupos activadores específicos más preferidos comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

c-M-P-R-L-R-G-C (SEQ ID NO:8)

c-M-Pip-R-L-R-Sar-C (SEQ ID NO:9)

c-M-Thz-R-L-R-G-Pen (SEQ ID NO:10)

c-M-Pip-R-L-R-Sar-Pen (SEQ ID NO:11)

*Diseño de la neurotensina activada*

Las moléculas de neurotensina activada preferidas de la invención comprenden un polipéptido de neurotensina y un grupo activador. Sin embargo, en realizaciones alternativas, puede resultar ventajoso combinar varias moléculas de NT con un grupo activador, o a la inversa. A este respecto, los compuestos concretos de la invención tienen la fórmula (NT)<sub>1</sub>-Conector-AG o NT-Conector-(AG)<sub>1</sub>, en la que 1 es un número entero comprendido entre 2 y 5, generalmente 1 es 2 o 3.

El grupo activador preferiblemente está unido covalentemente a la molécula de neurotensina. El acoplamiento puede realizarse mediante cualquier reacción o proceso que, en general, se conoce *per se* en la técnica, tal como una reacción química, bioquímica o enzimática, o mediante modificación genética cuando el polipéptido de neurotensina y los grupos activadores solo comprenden aminoácidos naturales.

El acoplamiento puede realizarse en cualquier sitio del grupo activador y el polipéptido de neurotensina en el que están presentes funciones reactivas, de modo natural o tras su introducción, tales como -OH, -SH, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H, -CN, -N<sub>3</sub>, -NCS, -maleimida o éster de succinimida o -PO<sub>2</sub>H. Por tanto, el acoplamiento puede realizarse en el N-terminal o en el C-terminal y/o en un grupo reactivo portado por una cadena lateral. El grupo activador puede acoplarse directamente al polipéptido de neurotensina mediante un enlace covalente. Como alternativa, el grupo activador también puede acoplarse indirectamente por medio de un grupo conector. El acoplamiento químico covalente preferiblemente incluye el uso de agentes bi- o multifuncionales que contienen grupos alquilo, arilo o

5 péptido mediante ésteres, aldehídos o ácidos de alquilo o arilo, cetonas, anhídrido, grupos sulfhidrilo o hidroxilo, grupos derivados de bromuro o cloruro de cianógeno, azidas, nitrilos, maleimidas, carbonildiimidazol, ésteres de succinimida o haluros sulfónicos. Un agente de acoplamiento químico preferido es sulfo-EMCS (éster de N-épsilon-maleimidocaproil-oxisulfosuccinimida), que puede añadirse, por ejemplo, al polipéptido de neurotensina y después usarse para unir covalentemente al grupo activador.

Los ejemplos de conectores adecuados incluyen mono-, di-, tri-, o multiaminoácidos que comprenden, por ejemplo, Lys, Glu, Asp, poliLys, un dipéptido, tal como Gly-Lys o un multiaminoácido, tal como GGG o G4S. Otros conectores incluyen, por ejemplo, ácido succínico, Ahx (ácido aminohexanoico) o una molécula de PEG (polietilenglicol).

10 En una realización preferida, el polipéptido de neurotensina y el grupo activador se acoplan usando un conector seleccionado de una molécula de PEG. Puede emplearse cualquier molécula de PEG, tal como, en particular, PEG2 (ácido 12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico), PEG3, PEG4, PEG5, o PEG6 (ácido 21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoico). Más preferiblemente, el conector comprende una molécula de PEG2 o PEG6, aún más preferiblemente un PEG6.

15 En una realización preferida, el polipéptido de neurotensina y el grupo activador se acoplan directamente, por medio de un enlace peptídico.

En otra realización preferida, el polipéptido de neurotensina y el grupo activador se acoplan usando un conector flexible seleccionado de una molécula de poliG, más preferiblemente un aminoácido G o un tripéptido GGG, o el ácido aminohexanoico lineal.

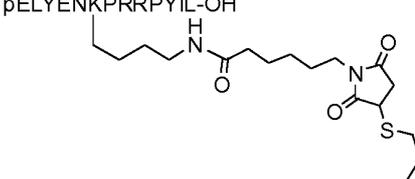
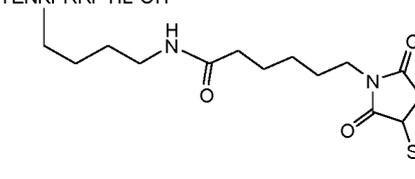
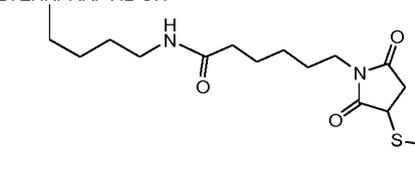
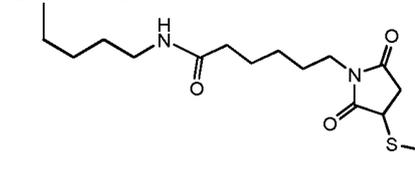
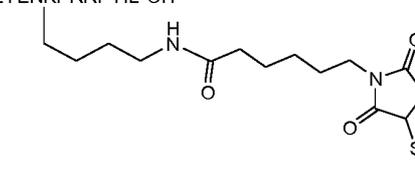
20 En otra realización preferida, el polipéptido de neurotensina y el grupo activador se acoplan usando un enlace disulfuro rompible.

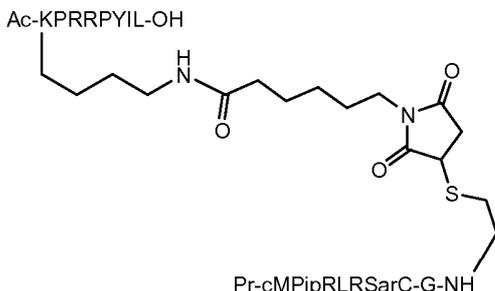
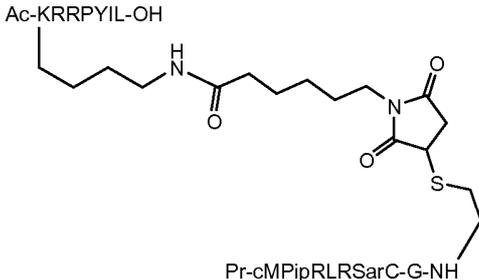
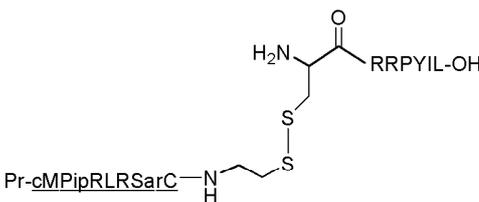
En otra realización preferida, el polipéptido de neurotensina y el grupo activador se acoplan usando un reticulador heterobifuncional, más preferiblemente el reactivo sulfo-EMCS.

En la siguiente tabla A se proporciona una lista de las moléculas de neurotensina activada más preferidas de la invención.

25 Tabla A

Compuesto	Fórmula	Estructura química	PM (g/mol)	Carga neta (pH 7,4)
	NT	pELYENKPRRPYIL-OH	1672,92	+1 (3+/2-)

<p><b>I</b></p>	<p><b>NT-SEQ ID NO: 8</b></p>	<p>pELYENKPRRPYIL-OH</p>  <p>Ac-cMPRLRGC-G-NH</p>	<p>2957,60</p>	<p>+2 (4+/2-)</p>
<p><b>II</b></p>	<p><b>NT- SEQ ID NO: 9</b></p>	<p>pELYENKPRRPYIL-OH</p>  <p>Pr-cMPipRLRSarC-G-NH</p>	<p>2999,60</p>	<p>+2 (4+/2-)</p>
<p><b>III</b></p>	<p><b>NT- SEQ ID NO: 10</b></p>	<p>pELYENKPRRPYIL-OH</p>  <p>Pr-cMThzRLRGPen-G-NH</p>	<p>3017,64</p>	<p>+2 (4+/2-)</p>
<p><b>IV</b></p>	<p><b>NT- SEQ ID NO: 11</b></p>	<p>pELYENKPRRPYIL-OH</p>  <p>Pr-cMPipRLRSarPen-G-NH</p>	<p>3027,65</p>	<p>+2 (4+/2-)</p>
<p><b>V</b></p>	<p><b>NT(2-13)- SEQ ID NO: 9</b></p>	<p>Ac-LYENKPRRPYIL-OH</p>  <p>Pr-cMPipRLRSarC-G-NH</p>	<p>2930,54</p>	<p>+2 (4+/2-)</p>

VI	NT(6-13)- SEQ ID NO: 9	 <p>Pr-cMPipRLRSarC-G-NH</p>	2410,99	+3 (4+/1-)
VII	Lys-NT(8-13)- SEQ ID NO: 9	 <p>Pr-cMPipRLRSarC-G-NH</p>	2313,88	+3 (4+/1-)
VIII	NT(8-13)-SS- SEQ ID NO: 9		2051,6	+4 (5+/1-)
IX	SEQ ID NO: 9- NT(8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-RRPYIL-OH	1816,27	+3 (4+/1-)
X	SEQ ID NO: 9- GGG-NT(6-13)	Pr-cMPipRLRSarC-GGG-KRRPYIL-OH	2212,71	+4 (5+/1-)
XI	SEQ ID NO: 9- Ahx-NT(6-13)	Pr-cMPipRLRSarC-Ahx-KRRPYIL-OH	2154,71	+4 (5+/1-)
XII	SEQ ID NO: 9- Ahx-NT(8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-Ahx-RRPYIL-OH	1929,4	+3 (4+/1-)
XIII	SEQ ID NO: 9- PEG2-NT(8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-PEG <sub>2</sub> -RRPYIL-OH	1963,4	+3 (4+/1-)
XIV	SEQ ID NO: 9- PEG6-NT(8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-PEG <sub>6</sub> -RRPYIL-OH	2151,7	+3 (4+/1-)
XV	SEQ ID NO: 9- [Tle12]NT(8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-RRPYTleL-OH	1816,29	+3 (4+/1-)
XVI	SEQ ID NO: 9- [Lys8, Tle12]NT(8-13)	Pr-cMPipRLRSarC-KRPYTleL-OH	1788,27	+3 (4+/1-)

<b>XVII</b>	<b>SEQ ID NO: 9- [Lys9, Tle12]NT(8-13)</b>	Pr-cMPipRLRSarC-RKPYTleL-OH	1788,27	+3 (4+/1-)
<b>XVIII</b>	<b>SEQ ID NO: 9- [Trp11, Tle12]NT(8-13)</b>	Pr-cMPipRLRSarC-RRPWTleL-OH	1839,32	+3 (4+/1-)
<b>XIX</b>	<b>SEQ ID NO: 9- [Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13)</b>	Pr-cMPipRLRSarC-KRPWTleL-OH	1811,31	+3 (4+/1-)
<b>XX</b>	<b>SEQ ID NO: 11-[Lys8, Tle12]NT(8-13)</b>	Pr-cMPipRLRSarPen-KRPYtLeL-OH	1816,33	+3 (4+/1-)

En la sección experimental se describen métodos detallados para producir moléculas de neurotensina activada de la invención. A este respecto, la invención también se refiere a un método para preparar una molécula de neurotensina activada, que comprende una etapa de acoplamiento covalente (directo o indirecto) entre un polipéptido de neurotensina y un grupo activador, según se definió anteriormente. El método puede comprender una etapa posterior de recolectar o purificar la neurotensina activada y/o una etapa posterior opcional de modificar la neurotensina activada y/o una etapa posterior opcional de formular la neurotensina activada con un excipiente aceptable.

En una realización particular, el polipéptido de neurotensina y el grupo activador primero se sintetizan por separado y después se enlazan covalentemente, por ejemplo, mediante acoplamiento químico, enzimático o bioquímico. Tal como se describió anteriormente, el acoplamiento puede realizarse a través de diversas funciones reactivas presentes y/o insertadas en la neurotensina y/o el grupo activador y, opcionalmente, usando un conector adecuado.

En otra realización particular, el polipéptido de neurotensina y el grupo activador se sintetizan directamente como una única molécula. Por ejemplo, la molécula de neurotensina activada puede producirse en un sintetizador de polipéptidos como una entidad molecular exclusiva. Como alternativa, la molécula de neurotensina activada puede producirse mediante fusión genética y expresión en una célula hospedante recombinante. Este método es factible cuando ambos componentes comprenden aminoácidos naturales.

A este respecto, en la presente también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica una neurotensina activada de la invención, en la que el polipéptido de neurotensina y el grupo activador comprenden aminoácidos naturales y están acoplados mediante un conector o un enlace de aminoácidos.

En la presente también se describe un vector de clonación o de expresión (por ejemplo, un plásmido, fago, virus, cósmido, etc.) que comprende dicha molécula de ácido nucleico, y una célula hospedante recombinante que comprende dicho ácido nucleico o vector.

Las moléculas de neurotensina activada de la invención pueden modificarse para aumentar aún más su actividad o para mejorar las propiedades farmacocinéticas usando técnicas conocidas *per se* en la técnica. Por ejemplo, pueden unirse a un polímero (PEG, albúmina), o pueden modificarse mediante la adición de un sustituyente lipófilo o mediante la adición de un grupo químicamente reactivo. Además, los aminoácidos naturales pueden reemplazarse por peptidomiméticos o pueden generarse análogos de aminoácidos y/o polipéptidos cíclicos.

#### *Métodos y composiciones farmacéuticas*

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de neurotensina activada, según se definió anteriormente, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La neurotensina activada puede usarse en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" 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.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere preferiblemente a sales no tóxicas, que pueden prepararse en general 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, glicilarsanilatos, 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.
- 5 En la presente también se describe una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico, un vector o una célula hospedante, según se definió anteriormente, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 Las composiciones de la invención comprenden, de modo ventajoso, un excipiente farmacéuticamente aceptable que puede seleccionarse de los excipientes que se emplean habitualmente en la industria farmacéutica, tales como diluyentes, vehículos sólidos, estabilizantes, conservantes, tensioactivos, etc. La composición puede formularse en forma sólida, semisólida o líquida.
- 15 Se prefieren las composiciones líquidas. Dichas formulaciones líquidas, en particular inyectables, pueden prepararse, por ejemplo, mediante la disolución o la dispersión de las moléculas de neurotensina activada en un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, agua, disolución salina fisiológica, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, aceite y sus análogos.
- 20 Para composiciones sólidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos o gránulos, 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 algínico 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.
- 25 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. Otros excipientes adecuados para su uso en la invención son compuestos según se describen en el documento WO 2012/090070 o en el documento US2012/0172454.
- 30 En la presente también se describe un kit que comprende un recipiente que contiene una composición, según se definió anteriormente, y un manual o dispositivo de administración de fármaco. El dispositivo de administración de fármaco es preferiblemente una jeringa.
- Las composiciones de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada, tal como, aunque sin limitarse a mediante la vía parenteral, oral, rectal, tópica o intranasal.
- 35 La administración parenteral puede realizarse mediante inyección usando, por ejemplo, una inyección intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intraocular o intramuscular, opcionalmente con liberación extendida o retrasada o con liberación controlada. La administración oral (o *per os*) puede realizarse usando, por ejemplo, preparaciones 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, retrasada o controlada) Puede usarse la vía rectal, por ejemplo, con preparaciones en forma de supositorios. Otras vías incluyen la vía tópica, en particular mediante la vía transdérmica, tal como, por ejemplo, en forma de parches, pomadas o geles; la vía intranasal, tal como, por ejemplo, en forma de aerosol y pulverizado; la vía perlingual; la vía intraocular o intraperitoneal.
- 40 Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden una dosis eficaz de una neurotensina activada 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 concretos. Generalmente, es la dosis promedio de sustancia activa que se administra para lograr, de modo apreciable, el efecto biológico esperado que es responsable o que contribuye a la mejora de algunos de los síntomas asociados con una enfermedad o un estado patológico. Por ejemplo, cuando se trata una lesión o un trastorno del SNC, la dosis que disminuye, previene, retrasa, elimina o detiene una de las causas o síntomas de la enfermedad o trastorno sería terapéuticamente eficaz.
- 45 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.
- 50 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, y la gravedad de la enfermedad (o trastorno) tratada sobre una base
- 55

preventiva o curativa, así como la edad, el peso, la salud general, el sexo y/o la dieta del paciente. Por tanto, los expertos en la técnica pueden ajustar la dosis eficaz. Sin embargo, en general, la dosis eficaz (expresada en equivalentes molares con respecto a la neurotensina) se incluye entre 0,001 y 10 mg/kg, más preferiblemente entre 0,002 y 5 mg/kg. En un intervalo preferido, la dosis eficaz se incluye entre 0,01 y 2 mg/kg. Estos intervalos de dosis son particularmente adecuados para la inyección parenteral, en particular para la inyección intravenosa (en embolada).

Las moléculas y las composiciones de la invención pueden usarse para inducir una hipotermia farmacológica en mamíferos, y para tratar cualquier enfermedad o trastorno que pueda beneficiarse de una hipotermia.

La invención resulta particularmente adecuada para tratar trastornos del SNC asociados con isquemia del SNC global, focal y neonatal, traumatismos del SNC, cirugías cardíacas, dolor e hipertermia. De modo más específico, la invención resulta adecuada para prevenir o reducir o minimizar los daños neuronales excitotóxicos y la neuroinflamación provocados en el SNC de un sujeto por una parada cardíaca, ictus, isquemia neonatal, ataques, lesiones traumáticas graves en la cabeza y la médula espinal, cirugías cardíacas, para reducir la hipertermia asociada con ICH, sepsis o cualquier infección vírica, bacteriana o parasitaria asociada con fiebre, y para reducir el dolor.

Un objeto de la invención se refiere a un compuesto o una composición, según se definió anteriormente, para su uso para inducir una hipotermia en un sujeto mamífero y/o para tratar un sujeto que presenta daños cerebrales.

En la presente también se describe un método para inducir una hipotermia en un sujeto mamífero, que comprende la administración sistémica a dicho sujeto de un compuesto o una composición según se definió anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto o una composición, según se definió anteriormente, para su uso en un método para reducir la temperatura corporal en un sujeto mamífero, que comprende la administración sistémica a dicho sujeto de dicho compuesto o composición.

Otro objeto de la invención es un compuesto o una composición, según se definió anteriormente, para su uso en un método para tratar un sujeto que presenta daños cerebrales, que comprende la administración sistémica a dicho sujeto de dicho compuesto o composición.

Otro objeto de la invención es un compuesto o una composición, según se definió anteriormente, para su uso en un método para reducir el dolor en un sujeto, que comprende la administración sistémica a dicho sujeto de dicho compuesto o composición.

Otro objeto de la invención es un compuesto o una composición, según se definió anteriormente, para su uso en un método para reducir los ataques en un sujeto, que comprende la administración sistémica a dicho sujeto de dicho compuesto o composición.

La invención puede usarse para tratar (por ejemplo, proteger, prevenir o reducir) el efecto de los daños cerebrales en cualquier sujeto mamífero, tal como un paciente humano. Resulta particularmente adecuada para tratar un sujeto después de una parada cardíaca repentina, que presenta ictus, isquemia neonatal, ataques, después de lesiones traumáticas graves en la cabeza y la médula espinal, durante una cirugía cardíaca, para reducir la hipertermia asociada con ICH, sepsis o cualquier infección vírica, bacteriana o parasitaria asociada con fiebre, y para reducir el dolor.

Los términos "tratamiento", "tratar" y otras expresiones similares se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico, por ejemplo, la reducción de la temperatura corporal y cualquier efecto beneficioso indirecto en el trastorno del paciente. El efecto puede ser profiláctico o preventivo para prevenir completa o parcialmente el agravamiento de una enfermedad o un síntoma 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 sujetos humanos, y comprende: (a) la prevención de una enfermedad 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.

En la presente también se describe un método para reducir la temperatura corporal de un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un compuesto o una composición según se definió anteriormente, en una cantidad suficiente para reducir la temperatura corporal del sujeto. El sujeto puede estar padeciendo o puede haber padecido recientemente, por ejemplo, una parada cardíaca repentina, ictus, isquemia neonatal, lesiones cerebrales o en la médula espinal, ataques, hipertermia, puede estar sometándose a una cirugía cardíaca, y puede necesitar neuroprotección.

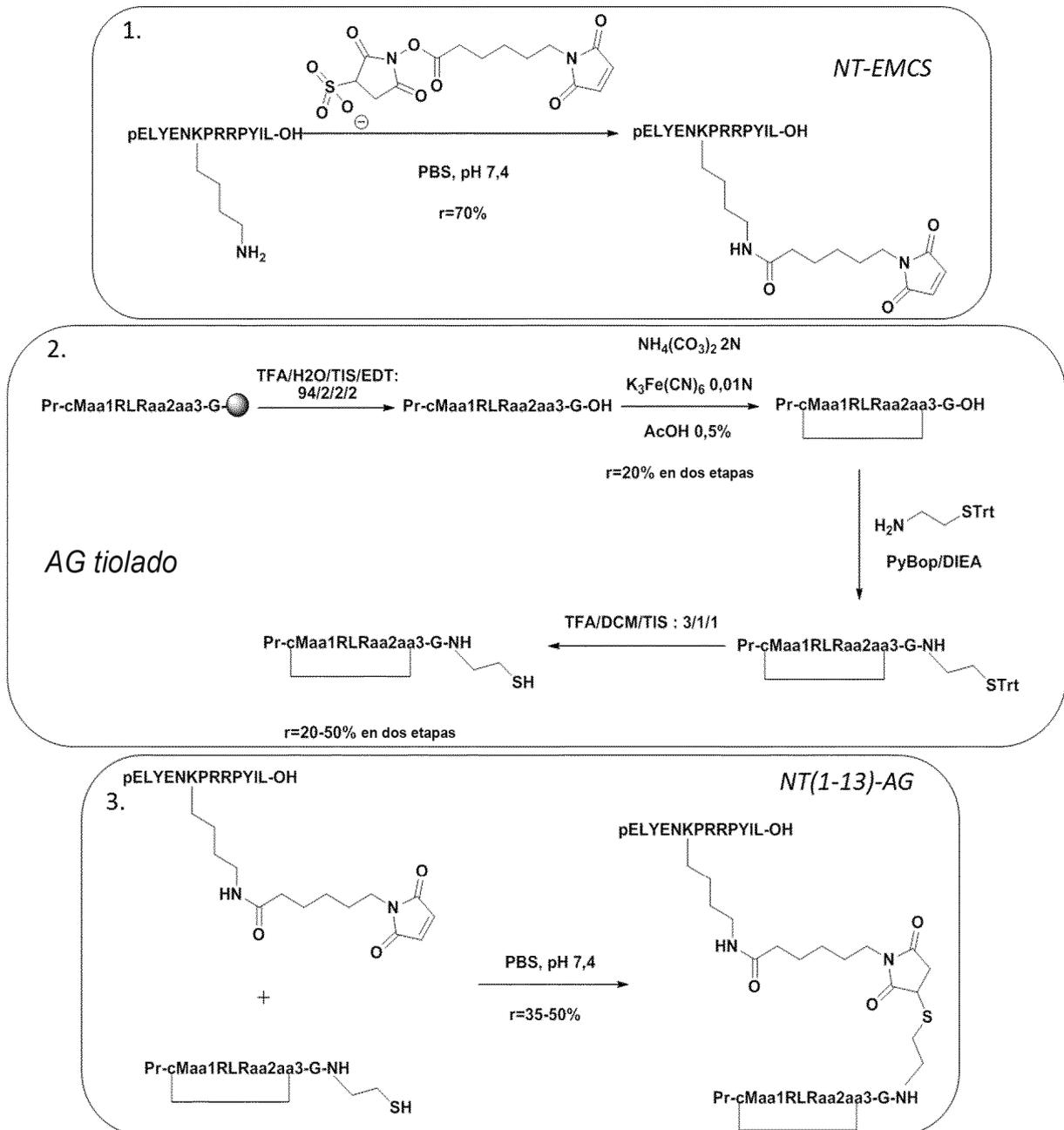
Otros aspectos y ventajas de la presente invención serán evidentes tras considerar los siguientes ejemplos.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Síntesis de fármacos de NT(1-13)-AG activada a través de NT-Lys6

5 En una primera etapa, la neurotensina de tamaño completo pELYENKPRRPYIL-OH (NT) se acopló a diversos grupos activadores (AG) desarrollados por los inventores. El objetivo era seleccionar las mejores combinaciones de AG/NT. Para sintetizar estas moléculas, se aprovechó la reactividad de amina de la cadena lateral de lisina 6 en la secuencia de la neurotensina. Se acopló sulfo-EMCS (éster de N-épsilon-maleimidocaproil-oxisulfosuccinimida) disponible en el mercado a través de su resto éster succinimida a la lisina 6. Después de una purificación, la neurotensina funcionalizada (NT-EMCS) se conjugó a diferentes AG tiolados.

10 Por tanto, se realizaron tres etapas para lograr los conjugados finales deseados: la síntesis de los dos restos funcionalizados, NT-EMCS y los AG tiolados, y su acoplamiento. A continuación, se representan esquemáticamente estas etapas:



## Métodos analíticos y de purificación:

• El avance de la reacción y el control de la pureza se realizaron en un sistema Dionex UltiMate® 3000 equipado con una C18 Kinetex™ (5 µm, 150 mm x 4,6 mm). La detección se realizó a 214 nm. El sistema de elución estaba compuesto de H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% (disolución A) y MeCN/TFA al 0,1% (disolución B). El caudal fue de 2 ml/min con un gradiente de B al 0-100% en 4 min.

• Los productos brutos se purificaron mediante RP-HPLC en un sistema Dionex UltiMate® 3000 equipado con una C18 Luna™ (5 mm, 100 mm x 21,2 mm). La detección se realizó a 214 nm. El sistema de elución estaba compuesto de H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% (disolución A) y MeCN/TFA al 0,1% (disolución B). El caudal fue de 20 ml/min.

## 1. Síntesis de NT-EMCS:

La NT de tamaño completo se adquirió en Biochem AG, mientras que el sulfo-EMCS (éster de N-épsilon-maleimidocaproil-oxisulfosuccinimida) se adquirió en Thermo Scientific (Pierce Biotechnology).

La NT-EMCS funcionalizada se preparó añadiendo una disolución de sulfo-EMCS (9,2 mg, 15 µmol, 1 eq. en 1 ml de PBS 4X, pH = 7,4) a una disolución de NT (25 mg, 15 mmol, 1 eq. en 1,25 ml de PBS 4X, pH = 7,4). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. El control de la reacción se realizó mediante RP-HPLC analítica. Después de agitar durante la noche, la mezcla bruta se purificó mediante RP-HPLC con un gradiente de B al 21-30% B en 30 min. Las fracciones con unas purezas mayores que 95% se recogieron y se liofilizaron para obtener un polvo blanco puro (m = 21 mg, rendimiento = 75%, pureza > 95%). La masa se confirmó mediante análisis de MS MALDI-TOF: m/z [M+H]<sup>+</sup>, calculado, 1865,98; encontrado, 1865,97.

## 2. Síntesis de AG tiolado

Para la conjugación de AG al resto maleimida de la NT funcionalizada, se introdujo un grupo reactivo a tiol en cada AG candidato.

*Síntesis de péptidos Pr-cMaa1RLRaa2aa3-G-OH:*

Los péptidos Pr-cMaa1RLRaa2aa3-G-OH se sintetizaron mediante el método de síntesis peptídica en fase sólida ("solid phase peptide synthesis", SPPS) en un sintetizador de microondas Liberty™ (CEM), usando una estrategia de Fmoc/tBu y Fmoc-Gly-resina de Wang (malla 100-200, DVB al 1%, carga 0,7 mmol/g) adquiridos en Iris Biotech. Esta resina permite la síntesis de péptidos completamente desprotegidos en sus cadenas laterales y sus extremos C-terminales.

Se eligieron aminoácidos N-α-Fmoc-protégido con protecciones de cadena lateral ortogonal convencionales: Fmoc-Cys(Trt)-OH (en configuración D o L), Fmoc-Pen(Trt)-OH (en configuración D o L), Fmoc-Met-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pip-OH, Fmoc-Thz-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH y Fmoc-Sar-OH. Todos ellos se adquirieron en Iris Biotech, así como la piperidina, ácido trifluoroacético (TFA), diisopropiletilamina (DIEA), etanditiol (EDT), trisopropilsilano (TIS), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-β]piridinio-3-oxid (HATU). La dimetilformamida (DMF), el diclorometano (DCM) y el anhídrido propiónico (Pr<sub>2</sub>O) se adquirieron en Sigma-Aldrich.

Los aminoácidos se acoplaron a través de activación con microondas de la función ácido del aminoácido n+1 usando aa/DIEA/HBTU: 4/4/8 equivalentes (con respecto a la resina) en una síntesis a escala 0,25 mmol, y aa/DIEA/HBTU: 5/5/10 equivalentes (con respecto a la resina) en una síntesis a escala 0,1 mmol. El tiempo de acoplamiento se ajustó a 10 min. Fueron necesarios acoplamientos dobles para la incorporación de metionina y cisteína de la introducción del aa1. La desprotección del grupo Fmoc de un nuevo aminoácido acoplado de este modo se realizó usando piperidina al 20% en DMF. El último aminoácido acoplado durante el alargamiento del péptido se propioniló o acetiló usando anhídrido propiónico o anhídrido acético al 50% en DCM. El objetivo del bloqueo N-terminal fue estabilizar el neopéptido sintetizado, pero también reducir el riesgo de reacciones secundarias durante el acoplamiento covalente en la posición C-terminal, por ejemplo. Para mantener una estructura química N-terminal similar a la de algunos péptidos radiomarcados, que a veces se marcan en el grupo amino N-terminal usando un éster propionil succinimida tritiado, se eligió un resto propionilo en lugar de un resto acetilo. Los péptidos unidos a la resina después se escindieron usando una disolución formada por TFA/TIS/H<sub>2</sub>O/EDT: 94/2/2/2 durante al menos 2 horas a temperatura ambiente (TA). Se usó un mínimo de 15 ml de disolución de escisión por gramo de resina. Los péptidos brutos después se precipitaron usando éter enfriado en hielo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 8 min, y se liofilizaron en H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1%. Se obtuvieron sólidos blancos y se utilizaron en la siguiente etapa sin más purificación.

*Ciclación de los péptidos Pr-cMaa1RLRaa2aa3-G-OH:*

Se obtuvieron puentes disulfuro mediante ciclación intramolecular a partir de dos funciones tiol de dos Cys o Pen protegidas de modo adecuado, en configuración L o D. Se adquirió el AcOH, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] y el carbonato de amonio en Sigma-Aldrich. Los péptidos Pr-cMaa1RLRaa2aa3-G-OH brutos se disolvieron en AcOH al 0,5% para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml. Se añadió carbonato de amonio (2 N) a las disoluciones de péptidos para

5 alcanzar un pH básico aproximado de 8-9. Después se añadió  $K_3[Fe(CN)_6]$  (0,01 N) a las mezclas de reacción hasta que se observó un color amarillo brillante y persistente. El control de las reacciones se realizó mediante RP-HPLC analítica. Habitualmente, las reacciones fueron cuantitativas en menos de 30 min. Las mezclas de reacción se filtraron con una membrana de 0,45  $\mu$ m y se purificaron mediante RP-HPLC preparativa. Las fracciones con purzas mayores que 95% se recogieron y se liofilizaron para obtener polvos blancos puros (pureza final > 95%). A continuación, se proporcionan los gradientes detallados, los rendimientos y el análisis de masas.

Péptido	Gradiente (% de B en 30 min)	Rendimiento	MS (exacto/encontrado)
SEQ ID NO:8	14-24	12%	1032,40/1032,42
SEQ ID NO:9	14-20	15%	1074,49/1074,50
SEQ ID NO:10	15-25	20%	1092,47/1092,47
SEQ ID NO:11	18-24	25%	1101,52/1101,54

*Acoplamiento de cisteamina a péptidos Pr-cMaa1RLRaa2aa3-G-OH ciclados:*

10 El clorhidrato de 2-tritilitio-1-etilamina (Trt-cisteamina) se adquirió en Iris Biotech, mientras que los otros reactivos se adquirieron como se describió anteriormente. Se prepararon disoluciones de Trt-cisteamina (2 eq.), DIEA (4 eq.) y péptidos ciclados que contienen un C-terminal libre (1 eq.) en DMF anhidra (0,05 M con respecto al péptido). Por último, se añadió PyBop (1,1 eq, en DMF anhidra 0,13 M) a las mezclas. Las reacciones se completaron casi inmediatamente, puesto que un control con HPLC después de 2 min mostró la desaparición completa de los péptidos de partida. La DMF se evaporó al vacío para producir un aceite amarillo pálido. Para eliminar la protección del tritil tiol se añadió una disolución de DCM/TIS/TFA: 3/1/1 (aproximadamente 0,5 ml/mg de péptidos de partida).  
 15 Las mezclas de reacción se agitaron a TA. El control de las reacciones se realizó mediante RP-HPLC analítica. Después se evaporaron la DCM y el TFA usando burbujeo de un gas inerte, y el Et<sub>2</sub>O provocó la precipitación de los péptidos brutos. Después de una centrifugación a 3000 rpm durante 8 min, los péptidos brutos se liofilizaron en H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y se purificaron mediante RP-HPLC preparativa. Las fracciones con unas purzas mayores que 95% se recogieron y se liofilizaron para obtener polvos blancos puros (pureza final > 95%). A continuación, se proporcionan los gradientes detallados, los rendimientos y el análisis de masas.

Péptido	Gradiente (% de B en 30 min)	Rendimiento	MS (exacto/encontrado)
SEQ ID NO:8-G-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	12-22	66%	1091,40/1091,44
SEQ ID NO:9- G-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	19-29	43%	1133,51/1133,54
SEQ ID NO:10-G-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	20-30	56%	1152,47/1152,63
SEQ ID NO:11-G-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SH	19-27	58%	1161,54/1161,56

3. Síntesis de NT(1-13)-AG mediante conjugación de NT-EMCS a AG tiolados:

25 Los AG que contienen un grupo tiol reactivo se solubilizaron en PBS 1X (1 eq., 0,003 M, pH 7,4) y se añadieron a NTEMCS (1 eq). Las mezclas de reacción se agitaron a TA. Habitualmente, las ondas ultrasónicas ayudaron a la solubilización de NTEMCS. El control de las reacciones se realizó mediante RP-HPLC analítica. Después de que la reacción se completase, los productos brutos se purificaron mediante RP-HPLC preparativa. Las fracciones con purzas mayores que 95% se recogieron y se liofilizaron para obtener polvos blancos puros (pureza final > 95%). A continuación, se proporcionan los gradientes detallados, los rendimientos y el análisis de masas.

Molécula	Compuesto	Gradiente (% de B en 30 min)	Rendimiento	MS (exacto/encontrado)
NT-SEQ ID NO:8	I	18-27	39%	2958,52/2958,45
NT-SEQ ID NO:9	II	21-31	40%	2998,50/2998,57
NT-SEQ ID NO:10	III	20-30	40%	3016,45/3016,62
NT-SEQ ID NO:11	IV	21-32	39%	3026,53/3026,59

30

Ejemplo 2: Afinidad de unión *in vitro* de fármacos de NT activada de la invención

Los efectos hipotérmicos centrales de la neurotensina son mediados a través de la activación del receptor NTR-1. Para suscitar una actividad biológica, tal como una actividad hipotérmica, los conjugados de neurotensina deben unirse al NTR-1 con una afinidad al menos similar a la de la neurotensina nativa, es decir, NT(1-13).

- 5 Se evaluó la afinidad de unión de los conjugados de neurotensina usando un ensayo de unión de competición con el receptor de tipo 1 de neurotensina humano y de rata (hNTR-1, rNTR-1). Las membranas celulares enriquecidas en hNTR-1 se adquirieron en Perkin Elmer. El NTR-1 de rata se obtuvo transfectando células HEK 293 con una construcción de plásmido de NTSR1 de rata (Origene, Rockville, EE. UU.).

- 10 La determinación de la afinidad de unión de los fármacos de NT activada por hNTR-1 se realizó según las instrucciones del fabricante (Perkin Elmer) con ligeras modificaciones. En detalle, la unión de NTR-1 se midió usando homogeneizados de membranas, preparados a partir de células CHO que expresan de modo estable el NTR-1 humano, a una concentración final de 0,5 µg/pocillo y el radioligando [<sup>3</sup>H]-neurotensina (actividad específica, 99,8 Ci.mmol<sup>-1</sup>; Perkin-Elmer) a una concentración de 3 nM. Se determinó la unión específica del radioligando con unos valores de K<sub>D</sub> de 0,81 nM y un B<sub>max</sub> de 34 pmol por mg de proteína de membrana. Se determinó la unión no específica en presencia de neurotensina 5 µM.

Para los ensayos con el receptor de tipo 1 de neurotensina de rata (rNTR1), se usaron los homogeneizados de membranas procedentes de células HEK 293 que expresan rNTR-1 a una concentración final de 0,75 µg/pocillo. Se determinó la unión específica del radioligando en estos homogeneizados a unos valores de K<sub>D</sub> de 0,93 nM y un B<sub>max</sub> de 2,5 pmol por mg de proteína de membrana.

- 20 Cada ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de reacción de 100 µl en tampón de unión (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, BSA al 0,1%). El ensayo después se incubó durante 24 h a temperatura ambiente. El contenido de cada pocillo se filtró rápidamente a través de filtros Unifilter®-96, GF/C® (Perkin-Elmer, preempapados con 25 µl de polietilenimina al 0,5%) usando un MicroBeta FilterMate-96 Harvester (Perkin-Elmer) y después cada pocillo se enjuagó 5 veces con tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 7,2). Se midió la radiactividad (cpm) de cada filtro secado añadiendo 25 µl de MicroScint™-O (Perkin) y se cuantificó usando un contador de luminiscencia y centello de microplacas TopCount NXT™ (Perkin-Elmer). Generalmente, la unión específica fue del 90% o mayor de la unión total. Se construyeron curvas de dosis-respuesta usando KaleidaGraph para determinar los valores de CI50. Los ensayos se realizaron por duplicado. Se determinaron los valores de K<sub>i</sub> a partir del promedio de las CI50 usando la conversión de Cheng-Prusoff.

Compuesto	Fórmula	Afinidad de unión a NTR-1	
		K <sub>i</sub> (nM)	
		NTR-1 humano	NTR-1 de rata
	NT(1-13)	0,82 ± 0,50	0,34 ± 0,08
	NT(8-13)	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,04
IX	SEQ ID NO: 9-NT(8-13)	0,09 ± 0,04	0,03 ± 0,02

30

X	SEQ ID NO: 9-GGG-NT(8-13)	0,13 ± 0,07	ND
XIV	SEQ ID NO: 9-PEG6-NT(8-13)	0,22 ± 0,06	1,06 ± 0,47
XV	[Tle12]NT(8-13)	0,20 ± 0,10	0,43 ± 0,12
	SEQ ID NO: 9-[Tle12]NT(8-13)	0,40 ± 0,20	0,06 ± 0,02
XVI	[Lys8, Tle12]NT(8-13)	0,22 ± 0,05	0,68 ± 0,59
	SEQ ID NO: 9-[Lys8, Tle12]NT(8-13)	0,15 ± 0,06	0,12 ± 0,06
XVII	[Lys9, Tle12]NT(8-13)	1,70 ± 0,40	4,20 ± 1,60
	SEQ ID NO: 9-[Lys9, Tle12]NT(8-13)	0,47 ± 0,19	0,19 ± 0,07
XVIII	[Trp11, Tle12]NT(8-13)	3,10 ± 1,50	0,85 ± 0,29
	SEQ ID NO: 9-[Trp11, Tle12]NT(8-13)	2,98 ± 1,08	0,02 ± 0,01
XIX	[Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13)	13,80 ± 2,90	3,31 ± 1,26
	SEQ ID NO: 9-[Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13)	6,34 ± 2,25	0,03 ± 0,02
XX	SEQ ID NO: 11-[Lys8, Tle12]NT(8-13)	0,11 ± 0,03	0,08 ± 0,06

ND: no determinado

Estos resultados demuestran que las moléculas activadas de la invención conservan una afinidad muy alta por NTR-1, en el intervalo nanomolar o incluso menor. De hecho, en la mayoría de los casos, el AG aumentó significativamente la afinidad de los diferentes fármacos de NT por NTR-1. Estos resultados son notables e inesperados, puesto que se esperaría que la conjugación interfiriese de modo negativo con la unión al receptor.

Ejemplo 3: Evaluación *in vivo* de fármacos de NT activada de la invención

Se investigó el efecto beneficioso de los fármacos de NT activada de la invención sobre la actividad farmacológica central de la neurotensina mediante el control de la respuesta hipotérmica en ratones Swiss (CD-1) (figura 1). Tras la administración intravenosa (en embolada) de NT a 8 mg/kg, los ratones mostraron una disminución pequeña, pero significativa, en la temperatura corporal rectal, con un efecto máximo de -1 °C desde la línea de base a los 15 min después de la inyección. Este efecto aumentó a 24 mg/kg, alcanzando un efecto máximo de -2,6 °C a los 30 min después de la inyección. Por contraste, la administración intravenosa del compuesto I, un fármaco de NT activada de la invención que comprende SEQ ID NO:8 como grupo activador, a la dosis molar equivalente de 8 mg/kg (8 mg/kg de eq. de NT) indujo una disminución rápida y más fuerte de la temperatura corporal, que es significativa a los 15 min después de la inyección y que alcanza un efecto máximo de -3,7 °C entre 30 y 60 min después de la inyección. Después esta hipotermia farmacológica disminuye progresivamente hasta que vuelve a la temperatura de la línea de base dentro de 3 horas después de la inyección. No se observaron temblores en estos ratones durante el desarrollo del experimento.

La evaluación de unos niveles de dosis menores del compuesto I mostró un efecto hipotérmico dependiente de la dosis, con una dosis eficaz mínima (MED) de 0,5 mg/kg de eq. de NT, una DE<sub>50</sub> de 1,21 mg/kg de eq. de NT y un efecto máximo de aproximadamente -4 °C observado en 4 mg/kg de eq. de NT sin un efecto más fuerte a 8 mg/kg de eq. de NT (figura 2). El tiempo hasta alcanzar el efecto máximo aumentó con niveles de dosis mayores, desde 15 min después de la inyección a unos niveles de dosis bajos, hasta 30-60 min después de la inyección a unos niveles de dosis altos. Cuando se compara con NT por sí sola, que muestra una MED de 8 mg/kg, este fármaco de NT activada muestra un aumento en 16 veces en el efecto hipotérmico central.

Después se ensayaron grupos activadores (AG) alternativos según la invención. Cuando se comparan con el compuesto I al mismo nivel de dosis de 0,5 mg/kg de eq. de NT, los fármacos de NT activada que comprenden, por ejemplo, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11 como grupos activadores, concretamente el compuesto II (NT-SEQ ID NO:9) y el compuesto IV (NT-SEQ ID NO:11), indujeron una respuesta hipotérmica aún mayor en ratones, con un efecto máximo de -4,1 °C y -3,4 °C, respectivamente, a los 30 min después de la inyección (figura 3). El compuesto II se seleccionó para la posterior investigación.

La evaluación de la relación de dosis-respuesta del compuesto II mostró una MED de 0,1 mg/kg de eq. de NT, que es 80 veces menor que la NT por sí sola, y una DE<sub>50</sub> de 1,25 mg/kg de eq. de NT (figura 4). A niveles de dosis altos, el compuesto II indujo una hipotermia aún mayor, alcanzando un efecto máximo de -7 °C a los 60 min después de la

inyección a 10 mg/kg de eq. de NT. A este nivel de dosis alto, los ratones mostraron una actividad locomotora reducida que se desarrolló en paralelo exactamente con el efecto hipotérmico, pero siguieron respondiendo totalmente a diferentes tipos de estímulos. De nuevo, no se observaron temblores, incluso en ratones que presentaban una temperatura corporal de aproximadamente 30 °C.

5 Ejemplo 4: Transporte a través de la BBB de los fármacos de NT activada de la invención

Se evaluó la permeabilidad de la BBB y la estabilidad en sangre *in vitro* de los fármacos de neurotensina activada de la invención.

10 Se evaluó la cinética de transporte en la BBB y la barrera hematorretiniana (BRB) de los conjugados de la invención usando una técnica de perfusión cerebral *in situ* en ratones C57Bl/6 macho adultos. Se obtuvieron compuestos de NT activada radiomarcados acoplando [3H]Tyr3-NT con el AG o mediante acoplamiento de un AG tritiado a moléculas de NT. La NT se radiomarcó mediante deshalogenación catalítica de yodoTyr3-NT usando tritio gaseoso, mientras que el AG se radiomarcó mediante el acoplamiento de un éster de propionil succinimida tritiado a su región N-terminal. La radiactividad específica ("specific radioactivity", SRA) fue, en general, en el intervalo de 50 Ci/mmol. La cantidad total de radiactividad preparada para cada síntesis fue, en general, entre 100 y 1000 µCi.

15 La técnica de perfusión cerebral *in situ* permite el control total de la composición del perfusionado artificial para mantener las células y la vascularización del cerebro en condiciones fisiológicas y anatómicas normales dentro del animal, sin el factor alterante de la distribución sistémica. La perfusión cerebral *in situ* fue desarrollada inicialmente en la rata y fue adaptada para el ratón por Dagenais *et al.* (Dagenais *et al.*, 2000, J. Cereb. Blood Flow Metab., 20(2), 381-386). Esto permite la evaluación de la cinética de transporte de compuestos a través de la BBB y la BRB en ratones transgénicos y mutantes KO para receptores de interés, enzimas o diferentes tipos de transportadores de flujo o eflujo.

20 La perfusión cerebral *in situ* de los compuestos radiomarcados de la invención se realizó durante 120 s con un caudal de perfusionado de 2 ml/min. El transporte inicial se expresó como el coeficiente de transferencia  $K_{in}$  (relación entre el volumen de distribución del compuesto de ensayo, corregido para el volumen vascular y el tiempo de perfusión cerebral). La coperfusión de sacarosa radiomarcada, un compuesto que normalmente no atraviesa la BBB, también permite la evaluación de la integridad física de la BBB y, por tanto, la ausencia de toxicidad aguda del compuesto de ensayo.

25 En coherencia con los datos que se encuentran en la bibliografía, la NT mostró un transporte inicial muy bajo en el cerebro, con un valor de  $K_{in}$  de aproximadamente  $0,4 \times 10^{-4}$  ml/s/g de tejido cerebral. El transporte de NT en el ojo fue aún menor (figura 5, barras blancas). De manera importante, los resultados obtenidos con los fármacos de NT activada radiomarcados de la invención mostraron, de modo coherente, una cinética de transporte significativamente mayor hacia el cerebro y el ojo, demostrando que la activación de NT con un grupo activador de la invención potencia específicamente su transporte hacia estos órganos, que de otro modo no son permeables. En particular, el compuesto XIV muestra un valor de  $K_{in}$  en el cerebro de aproximadamente  $3,65 \times 10^{-4}$  ml/s/g, que constituye un aumento en 9 veces cuando se compara con la NT libre, y de aproximadamente  $32,0 \times 10^{-4}$  ml/s/g en el ojo (figura 5, barras negras). Además, el compuesto I no alteró la integridad de la BBB, puesto que el volumen de distribución cerebral de la sacarosa fue similar a los valores control.

Ejemplo 5: Estabilidad *in vitro* de fármacos de NT activada de la invención

30 Se evaluó la estabilidad en sangre *in vitro* (semivida o  $t_{1/2}$ ) de los fármacos de la invención y se comparó con la de la NT por sí sola. Brevemente, cada péptido se incubó a la concentración nominal de 2 µM hasta 3 horas a 37 °C en sangre de ratón Swiss (CD-1) recién recolectada. 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). Se calculó la semivida *in vitro* ( $t_{1/2}$ ) a partir de la regresión logarítmica de cada perfil cinético (cinética de reacción de primer orden:  $C(t) = C_0 \cdot e^{-kt}$ ) y se indica como  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .

45 Los resultados confirmaron la resistencia muy baja de la NT nativa a la degradación en plasma, con una semivida *in vitro* de solo 7 min (figura 6). Esto resulta coherente con la rápida proteólisis enzimática de los péptidos endógenos y, en general, de péptidos lineales pequeños que solo contienen aminoácidos naturales (Foltz *et al.*, 2010, J. Nutr., enero, 140(1):117-118). En fuerte contraste, todos los fármacos de NT activada de la invención mostraron una  $t_{1/2}$  altamente potenciada en sangre de ratón, generalmente de más 1 hora.

Moléculas de ensayo	Compuesto	Constante de velocidad de reacción k (h <sup>-1</sup> )	Semivida <i>in vitro</i> (min)
NT	-	5,779	7
NT-SEQ ID NO:8	I	0,813	51
NT-SEQ ID NO:11	IV	0,419	100

Tomados conjuntamente, la cinética del transporte a través de la BBB, la estabilidad *in vitro* en sangre, y el efecto hipotérmico central potenciado, demuestran los efectos beneficiosos notables e inesperados de los fármacos de NT activada de la invención.

#### 5 Ejemplo 6: Síntesis de moléculas de neurotensina activada basadas en NT(x-13)

Los ejemplos 1-5 demuestran que SEQ ID NO:9 fue particularmente eficaz para activar la NT de tamaño completo. En este ejemplo y en los siguientes, se ensayó SEQ ID NO:9 para su capacidad para generar moléculas de neurotensina activadas potentes basadas en fragmentos de NT.

10 En la bibliografía se ha indicado que algunos análogos de neurotensina truncada son tan potentes como el neuropéptido endógeno de longitud completa, en especial cuando está presente la secuencia mínima que se corresponde con los aminoácidos 8-13. Sobre esta base se prepararon nuevos fármacos de NT activada usando análogos de NT que tienen un tamaño reducido con el objetivo de generar fármacos más potentes, al mismo tiempo que se minimizan los costes de producción y de permitir la conjugación en tándem en la parte N-terminal de NT.

15 Los conjugados se sintetizaron con el mismo método de conjugación empleado para los que comprenden la neurotensina de tamaño completo (véase el ejemplo 1), enfocándose en tres fragmentos de la neurotensina: NT(2-13), en el que solo falta el ácido pirrolutámico; NT(6-13) y Lys-NT(8-13), que comprenden la secuencia activa mínima y que contienen también al menos la lisina 6 usada para el acoplamiento al AG. Los métodos analíticos y de purificación se realizaron según se describe en el ejemplo 1.

#### 1. Síntesis del péptido NT(x-13):

20 Se sintetizaron análogos de neurotensina truncada mediante el método de síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) en un sintetizador de microondas Liberty™ (CEM) usando una estrategia de Fmoc/tBu. El acoplamiento de los aminoácidos se realizó a partir de Fmoc-Leu-resina de Wang precargada de modo manual (malla 100-200, DVB al 1%). Esta resina permite la síntesis de péptidos completamente desprotegidos en sus cadenas laterales y sus extremos C-terminales.

25 La resina de Wang (carga de 0,2 mmol/g) se adquirió en Iris Biotech. Otras materias primas se describieron anteriormente.

30 Para la precarga de la resina, se añadió una disolución de Fmoc-Leu-OH/HOBt/DIC (6 eq./6 eq./6 eq.) en DMF (0,055 M con respecto al aa) a la resina. Después se añadió DMAP (1 eq.). Después de una agitación mecánica durante la noche, la resina se lavó y se evaluó su carga. Habitualmente, la carga comprendió entre 0,1 y 0,16 mmol/g. El alargamiento del péptido se realizó como se ha descrito anteriormente. Los N-terminales del péptido se acetilaron usando anhídrido acético al 50% en DCM para imitar los enlaces peptídicos que se encuentran en el péptido endógeno y para aumentar la estabilidad metabólica. Los péptidos unidos a la resina se escindieron con el mismo procedimiento que se ha descrito previamente y se purificaron mediante RP-HPLC. Las fracciones con unas puridades mayores que 95% se recogieron y se liofilizaron para obtener polvos blancos puros (pureza final > 95%). A continuación, se proporcionan los gradientes detallados, los rendimientos y el análisis de masas.

Péptido	Gradiente (% de B en 30 min)	Rendimiento	MS (exacto/encontrado)
NT(2-13)	19-29	ND	1603,89/1603,72
NT(6-13)	No purificación	ND	1084,66/1084,44
Lys-NT(8-13)	16-26	27%	987,6/987,635

ND: no determinado

#### 2. Síntesis de NT(x-13)-EMCS

40 Se realizó la funcionalización de NT(x-13) con el mismo procedimiento que para la NT de tamaño completo descrito en el ejemplo 1. Se generaron péptidos como polvos blancos puros, con una pureza de al menos 95%. A continuación, se proporcionan los gradientes detallados, los rendimientos y el análisis de masas.

Péptido	Gradiente (% de B en 30 min)	Rendimiento	MS (exacto/encontrado)
NT(2-13)-EMCS	30-40	51%	1796,96/1796,39
NT(6-13)-EMCS	20-34	24%	1277,51/1277,74
Lys-NT(8-13)-EMCS	17-27	20%	1180,68/1180,67

3. Síntesis de SEQ ID NO:9 tiolado:

Se sintetizó SEQ ID NO:9 tiolado como se describe en el ejemplo 1.

4. Síntesis de conjugados de NT(x-13)-SEQ ID NO:9:

- 5 El procedimiento de acoplamiento de NT(x-13)-EMCS a SEQ ID NO:9 fue el mismo que para la síntesis de NT(1-13)-AG, según se detalle en el ejemplo 1. Se generaron conjugados como polvos blancos puros con una pureza de al menos 95%. A continuación, se proporcionan los gradientes detallados, los rendimientos y el análisis de masas.

<b>Péptido</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Gradiente (% de B en 30 min)</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>MS (exacto/encontrado)</b>
NT(2-13)-SEQ ID NO:9	V	30-40	43%	2929,47/2929,69
NT(6-13)-SEQ ID NO:9	VI	30-40	46%	2410,24/2410,38
Lys-NT(8-13)-SEQ ID NO:9	VII	25-40	42%	2313,19/2313,24

Ejemplo 7: Respuesta hipotérmica de fármacos de NT(x-13) activados de la invención

- 10 La respuesta hipotérmica de los fármacos activados se evaluó mediante una inyección intravenosa (en embolada) en ratones Swiss (CD-1) de cada conjugado al mismo nivel de dosis de 0,5 mg/kg de eq. de NT.

Todos los fármacos basados en NT truncada inducen un grado similar de hipotermia en ratones con una disminución máxima en la temperatura corporal de aproximadamente -2,5 °C a los 30 min después de la inyección (figura 7). Estos resultados demuestran que el fragmento C-terminal más corto NT(8-13) es suficiente para suscitar una potente actividad biológica en el contexto de los fármacos activados de la invención.

- 15

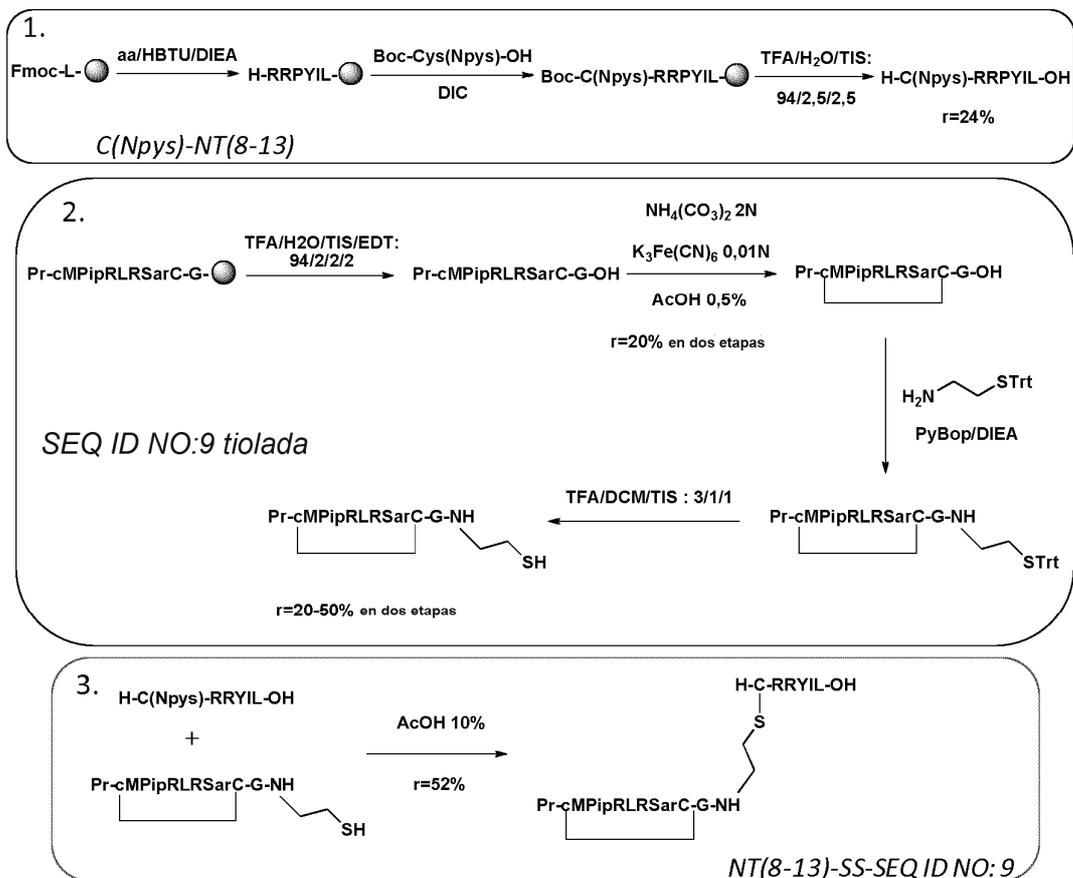
Ejemplo 8: Síntesis de conjugados de fármacos de NT activada usando puentes disulfuro

Se sintetizaron los conjugados de fármacos de NT activada de la invención descritos en los ejemplos 1 y 4 usando un conector EMCS y un resto lisina que se encuentra en la naturaleza o que se introduce en la secuencia de la NT. Para intentar evaluar nuevas estrategias de unión, NT(8-13) y SEQ ID NO:9 se conjugaron a través de un puente disulfuro. Este conector rompible muestra una buena estabilidad en la circulación sistémica, al mismo tiempo que puede romperse en el entorno reductor de algunos compartimentos intracelulares, en particular en las células endoteliales de la BBB, lo cual conduce potencialmente a la liberación de NT(8-13) totalmente activa en el parénquima cerebral. Además, el cambio en el conector produce un fármaco nuevo con propiedades de PK, disposición y metabolismo diferenciadas y potencialmente beneficiosas.

- 20

Los puentes disulfuro se forman a partir de dos grupos tiol presentes en la naturaleza o introducidos en los dos restos que se van a conjugar. En el contexto de la invención, los dos restos que se van a conjugar no presentan cisteínas libres y, por tanto, se introdujeron de modo químico dos funciones tiol en el AG y la NT. Para este fin, se introdujo un resto cisteína protegido por Npys, activador de tiol, en la región N-terminal de NT(8-13). La Cys derivatizada con Npys es específicamente reactiva hacia tioles libres y, por tanto, favorece la formación del puente heterodisulfuro. La SEQ ID NO:9 tiolada se generó mediante funcionalización C-terminal con cisteamina de la misma manera que para la conjugación con NT-EMCS. Ambos restos se produjeron independientemente y después se conjugaron entre sí en una etapa final. Las etapas de acoplamiento se representan esquemáticamente a continuación:

- 25
- 30



Los métodos analíticos y de purificación son como se describió en el ejemplo 1.

1. Síntesis del péptido C(Npys)-NT(8-13)

Se adquirieron Boc-Cys(Npys)-OH y DIC (diisopropilcarbodiimida) en Iris Biotech.

- 5 Se preparó H-NT(8-13) como se describió en el ejemplo 6, excepto que el N-terminal no se bloqueó. Se preactivó una disolución de Boc-Cys(Npys)-OH (5 eq.) y DIC (5 eq.) en DMF anhidra (0,33 M) durante 10 min a TA y se añadió a la resina. Después de una agitación mecánica durante la noche, la resina se lavó con DMF y DCM, y el péptido unido a la resina se escindió y se trató usando el mismo procedimiento descrito en los ejemplos previos. La purificación del péptido bruto con un gradiente de B al 17-26% en 30 min conduce a un polvo de color amarillo pálido puro (m = 25,9 mg, rendimiento = 24%, pureza > 95%). La masa se confirmó mediante análisis de MS MALDI-TOF: m/z [M+H]<sup>+</sup>, calculado, 1074,49; encontrado, 1074,47. Puesto que la protección de Npys se escinde en MALDI-TOF durante el análisis, también se observó el producto sin este grupo: [M -Npys+H+]<sup>+</sup>, calculado, 920,51; encontrado, 920,475.

2. Síntesis de SEQ ID NO:9 tiolada

- 15 Se produjo la SEQ ID NO:9 tiolada como se describe en el ejemplo 1.

3. Síntesis del conjugado de NT activada NT(8-13)-SS-SEQ ID NO:9 (compuesto VIII)

- 20 Se disolvió C(Npys)-NT(8-13) (1,3 eq.) en una disolución de ácido acético al 10% desgasificada bajo una atmósfera inerte (0,02 M). La SEQ ID NO:9 tiolada (1 eq.) se disolvió en una disolución de ácido acético al 10% desgasificada bajo una atmósfera inerte (0,015 M) y se añadió inmediatamente a la disolución de C(Npys)-NT(8-13). La mezcla de reacción se agitó a TA bajo una atmósfera inerte. El control de las reacciones se realizó mediante RP-HPLC analítica. Después de 48 horas de agitación, se añadió de nuevo C(Npys)-NT(8-13) (0,45 eq.) a la mezcla de reacción. Después de completar la reacción, se realizó la purificación de la mezcla mediante RP-HPLC preparativa con un gradiente de B al 17-27% en 30 min. Se obtuvo un polvo blanco puro (m = 7,8 mg, rendimiento = 52%, pureza > 95%). La masa se confirmó mediante análisis de MS MALDI-TOF: m/z [M+H]<sup>+</sup>, calculado, 2050,00; encontrado, 2051,08.
- 25

## Ejemplo 9: Respuesta hipotérmica del conjugado de fármaco activado NT(8-13)-SS-SEQ ID NO:9

Se evaluó la respuesta hipotérmica de NT(8-13)-SS-SEQ ID NO:9 (compuesto VIII) mediante una inyección intravenosa (en embolada) en ratones Swiss (CD-1) al nivel de dosis de 10 mg/kg de eq. de NT y se comparó a la del fármaco obtenido usando cisteamina-conector EMCS, concretamente el compuesto II.

- 5 El compuesto VIII indujo una potente hipotermia en ratones, en un grado similar al del compuesto II. Ambos compuestos indujeron una disminución máxima en la temperatura corporal de -5,8 °C a los 45 min después de la inyección, y de -6,7 °C a 1 hora, respectivamente (figura 8). Por tanto, el acoplamiento de NT(8-13) usando un conector disulfuro parece ser una estrategia adecuada para activar la NT, al mismo tiempo que, probablemente, permite la liberación de NT en entornos reductores, tales como las células endoteliales capilares cerebrales.

## 10 Ejemplo 10: Síntesis de fármacos de AG-NT activada en tándem

Los fármacos de NT activada descritos en los ejemplos previos se sintetizaron mediante la preparación y funcionalización independiente de los restos NT y AG, seguido de su acoplamiento. En este ejemplo, se produjo una nueva serie de fármacos de NT activada usando la síntesis en tándem y espaciadores compatibles con SPPS. Como alternativa, los restos NT y AG se acoplan directamente por medio de un enlace peptídico. La síntesis de estos fármacos puede realizarse en tándem con tan solo dos etapas: el alargamiento del péptido sobre un soporte y la formación de enlaces disulfuro en AG. Usando esta estrategia, se prepararon fármacos de NT activada basándose en el fragmento NT(8-13) más preferido, con un rendimiento global de hasta 35%. Además, la síntesis en tándem permite el uso de muchos conectores como espaciadores entre el resto AG y el polipéptido de NT. De forma importante, el polipéptido de NT se introdujo en el C-terminal del conjugado, puesto que un terminal carboxilo libre es fundamental para la unión a los receptores de NT. Entre estos conectores comunes se encuentran conectores basados en aminoácidos, tales como triglicina. También se escogió el ácido aminohaxanoico. Este aminoácido no natural es un conector hidrófobo habitual usado para aumentar la distancia entre un péptido y otro resto. Por último, también se evaluaron dos espaciadores de PEG para hacer que el conjugado sea más hidrófilo y, por tanto, más soluble en agua y biológicamente tolerante. Se ensayaron dos moléculas de PEG para evaluar el impacto de la distancia entre el AG y el polipéptido de NT sobre su actividad biológica. Todos los conectores/espaciadores introducidos en los conjugados de fármaco proporcionaron flexibilidad al fármaco, lo cual es importante para el reconocimiento óptimo del receptor diana por el polipéptido de NT. Los métodos analíticos y de purificación se realizaron según se describe en el ejemplo 1.

## 30 1. Síntesis de SEQ ID NO:9-NT(8-13), SEQ ID NO:9-GGG-NT(6-13), SEQ ID NO:9-Ahx-NT(6-13) y SEQ ID NO:9-Ahx-NT(8-13)

El compuesto IX (SEQ ID NO:9-NT(8-13)), el compuesto X (SEQ ID NO:9-GGG-NT(6-13)), el compuesto XI (SEQ ID NO:9-Ahx-NT(6-13)) y el compuesto XII (SEQ ID NO:9-Ahx-NT(8-13)) se sintetizaron mediante el método de síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) en un sintetizador de microondas Liberty™ (CEM), usando una estrategia de Fmoc/tBu y Fmoc-Leu-resina de Wang (malla 100-200, DVB al 1%, carga 0,09 mmol/g) cargada de modo manual como se describió anteriormente.

El Fmoc-Ahx-OH se adquirió en Iris Biotech. Otras materias primas se describieron anteriormente.

El alargamiento del péptido, la escisión y el tratamiento se realizaron usando el mismo procedimiento que se ha descrito en ejemplos previos. Se realizó un acoplamiento doble para los aminoácidos D-Cys, Met, y NT-Arg9. Los N-terminales de los péptidos se propionilaron usando anhídrido propiónico al 50% en DCM. El péptido bruto SEQ ID NO:9-GGG-NT(6-13) se purificó mediante RP-HPLC preparativa con un gradiente de B al 15-25% en 30 min. Los péptidos brutos que no comprenden espaciador (solo un enlace peptídico) o un espaciador Ahx se usaron sin más purificación en la siguiente etapa de ciclación.

Los puentes disulfuro se obtuvieron mediante ciclación intramolecular a partir de las dos cisteínas contenidas en el AG (posiciones 1 y 8) usando el mismo protocolo que el detallado en el ejemplo 1. Los fármacos puros se obtuvieron como polvos blancos (pureza final > 95%). A continuación, se proporcionan los gradientes detallados, los rendimientos y el análisis de masas.

Péptido	Compuesto	Gradiente (% de B en 30 min)	Rendimiento	MS (exacto/encontrado)
SEQ ID NO:9-NT(8-13)	IX	18-28	7%	1815,96/1815,92
SEQ ID NO:9-GGG-NT(6-13)	X	17-25	4%	2212,17/2212,10
SEQ ID NO:9-Ahx-NT(6-13)	XI	19-28	4%	2154,19/2154,11
SEQ ID NO:9-Ahx-NT(8-13)	XII	17-27	21%	1929,04/1929,00

## 2. Síntesis de SEQ ID NO:9-PEG2-NT(8-13) y SEQ ID NO:9-PEG6- NT(8-13)

El compuesto XIII (SEQ ID NO:9-PEG2-NT(8-13)) y el compuesto XIV (SEQ ID NO:9-PEG6-NT(8-13)) se sintetizaron mediante el método de síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) en un sintetizador de microondas Liberty™ (CEM), excepto para el espaciador de PEG, que se introdujo de modo manual. Se usó la estrategia de Fmoc/tBu y Fmoc-Leu-resina de Wang (malla 100-200, DVB al 1%, carga 0,09 mmol/g) cargada de modo manual como se describió anteriormente.

El ácido Fmoc-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico (Fmoc-PEG2-OH) y el ácido Fmoc-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaioxaheneicosanoico (Fmoc-PEG6-OH) se adquirieron en PolyPeptide Laboratories. Otras materias primas se describieron anteriormente.

El alargamiento del péptido se realizó como se ha descrito previamente con el sintetizador de microondas Liberty™ hasta la introducción de PEG y después de su introducción manual. Se realizó un acoplamiento doble para los aminoácidos D-Cys, Met, y NT-Arg9. Para el acoplamiento manual, los aminoácidos de PEG (2 eq.) se preactivaron con COMU (2 eq.) y DIEA (4 eq.) en DMF anhidra (0,2 M con respecto al PEG) durante 5 min. Después se añadieron los PEG activados a la resina y se agitó la mezcla de modo mecánico durante la noche a TA. Los N-terminales de los péptidos se propionilaron usando anhídrido propiónico al 50% en DCM. Después de la escisión y el tratamiento habitual, los péptidos brutos se usaron sin más purificación en la siguiente etapa de ciclación.

Los puentes disulfuro se obtuvieron mediante ciclación intramolecular a partir de las dos cisteínas contenidas en el AG en la posición 1 y 8 con el mismo protocolo descrito en el ejemplo 1. Los conjugados puros se obtuvieron como polvos blancos (pureza final > 95%). A continuación, se proporcionan los gradientes detallados, los rendimientos y el análisis de masas.

Péptido	Compuesto	Gradiente (% de B en 30 min)	Rendimiento	MS (exacto/encontrado)
SEQ ID NO:9-PEG2-NT(8-13)	XIII	21-31	35%	1962,03/1961,25
SEQ ID NO:9-PEG6--NT(8-13)	XIV	22-32	17%	2151,15/2151,50

## 3. Síntesis de SEQ ID NO:9-[Tle12]NT(8-13), SEQ ID NO:9-[Lys8, Tle12]NT(8-13), SEQ ID NO:9-[Lys9, Tle12]NT(8-13), SEQ ID NO:9-[Trp11, Tle12]NT(8-13), SEQ ID NO:9-[Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13) y SEQ ID NO:11-[Lys8, Tle12]NT(8-13)

El compuesto XV (SEQ ID NO:9-[Tle12]NT(8-13)), el compuesto XVI (SEQ ID NO:9-[Lys8, Tle12]NT(8-13)), el compuesto XVII (SEQ ID NO:9-[Lys9, Tle12]NT(8-13)), el compuesto XVIII (SEQ ID NO:9-[Trp11, Tle12]NT(8-13)), el compuesto XIX (SEQ ID NO:9-[Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13)) y el compuesto XX (SEQ ID NO:11-[Lys8, Tle12]NT(8-13)) se sintetizaron como se describió para el compuesto IX (SEQ ID NO:9-NT(8-13)) se sintetizaron mediante el método de síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) en un sintetizador de microondas Liberty™ (CEM), usando una estrategia de Fmoc/tBu y Fmoc-Leu-resina de Wang (malla 100-200, DVB al 1%, carga 0,09 mmol/g) precargada de modo manual como se describió anteriormente.

Fmoc-Lys-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Tle-OH se adquirieron en Iris Biotech. Otras materias primas se describieron anteriormente.

El alargamiento del péptido, la escisión y el tratamiento se realizaron usando el mismo procedimiento que se ha descrito en ejemplos previos. Se realizó un acoplamiento doble para los aminoácidos D-Cys, Met, y NT-Arg9. Los N-terminales de los péptidos se propionilaron usando anhídrido propiónico al 50% en DCM. Después de la escisión y el tratamiento habitual, los péptidos brutos se usaron sin más purificación en la siguiente etapa de ciclación.

Péptido	Compuesto	Gradiente (% de B en 30 min)	Rendimiento	MS (exacto/encontrado)
SEQ ID NO: 9-[Tle12]NT(8-13)	XV	20-30	6%	1815,96/1816,0 3
SEQ ID NO: 9-[Lys8, Tle12]NT(8-13)	XVI	20-30	26%	1787,95/1787,9 6
SEQ ID NO: 9-[Lys9, Tle12]NT(8-13)	XVII	20-30	19%	1787,95/1787,9 1

SEQ ID NO: 9-[Trp11, Tle12]NT(8-13)	XVIII	23-33	5%	1838,97/1838,9 4
SEQ ID NO: 9-[Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13)	XIX	24-34	10%	1810,97/1811,0 3
SEQ ID NO: 11-[Lys8, Tle12]NT(8-13)	XX	20-30	22%	1788,27/1786,9 5

Ejemplo 11: Respuesta hipotérmica de fármacos de AG-NT activada en tándem

5 Para determinar el efecto hipotérmico de los fármacos de NT activada obtenidos usando un procedimiento de síntesis en tándem, cada fármaco, así como el compuesto II, se inyectaron por vía intravenosa (en embolada) en ratones Swiss (CD-1) a 10 mg/kg de eq. de NT y se controló la temperatura corporal rectal a lo largo de 3 horas después de la inyección.

Todos los fármacos ensayados indujeron una respuesta hipotérmica potente y similar en ratones, con una disminución máxima comparable en la cinética y la temperatura corporal, que alcanzó aproximadamente -6/-7 °C a los 60 min después de la inyección (figura 9).

10 El compuesto XIV mostró el mejor perfil de tolerancia, al mismo tiempo que muestra un fuerte efecto hipotérmico a este nivel de dosis, alcanzando -6,7 °C a los 60 min después de la inyección. La DE<sub>50</sub> del compuesto XIV fue de 1,53 mg/kg de eq. de NT, que es similar a la medida para el compuesto I y el compuesto II. Cuando se compara con el compuesto I, el compuesto XIV muestra un mayor Kin en el cerebro y en el ojo, alcanzando 3,65 x 10<sup>-4</sup> ml/s/g y 3,30 x 10<sup>-4</sup> ml/s/g, respectivamente (figura 5, barras negras) y una mayor estabilidad en sangre, con una semivida calculada de 96 min (figura 6). Cuando se inyectó a 20 mg/kg de eq. de NT en ratones, el compuesto XIV siguió siendo bien tolerado sin más problemas de seguridad. No se observó una mayor disminución en la temperatura corporal a este nivel de dosis, lo cual indica que la respuesta hipotérmica farmacológica se satura a 10 mg/kg de eq. de NT. La dosis máxima tolerada (MTD) fue de 40 mg/kg de eq. de NT, y no se alcanzó la DL<sub>50</sub> (dosis letal, 50%) (> 40 mg/kg de eq. de NT). Puesto que la MED fue de aproximadamente 0,1 mg/kg de eq. de NT, este perfil de toxicidad/farmacodinámico constituye un excelente prerrequisito de seguridad, puesto que: i) evita una sobredosis potencialmente mortal debida a una hipotermia farmacológica exacerbada, y ii) mediante el uso de la vía de administración intravenosa (en embolada), la ventana terapéutica, que se expresa como el aumento en número de veces entre la MED y la MTD, es de aproximadamente 400 con una seguridad 4 veces mayor entre el nivel de dosis que suscita una respuesta hipotérmica máxima y el que induce una toxicidad suave/no mortal.

25 Ejemplo 12: Respuesta hipotérmica de fármacos activados en tándem que comprenden NT sustituida

Para determinar el efecto hipotérmico de fármacos de NT activada que contienen versiones sustituidas de NT(8-13), obtenidos usando un procedimiento de síntesis en tándem, cada fármaco, así como el compuesto IX no sustituido, se inyectaron por vía intravenosa (en embolada) en ratas Sprague-Dawley a 5 mg/kg de eq. de NT y se controló la temperatura corporal rectal a lo largo de 3 horas después de la inyección.

30 Todos los fármacos que comprenden sustituciones estabilizantes en la secuencia NT(8-13) indujeron una respuesta hipotérmica mayor en ratas, cuando se compara con el compuesto IX no sustituido (figura 10). La disminución máxima en la temperatura corporal a 5 mg/kg de eq. de NT fue de -1,2 °C a los 30 min después de la inyección para el compuesto IX, de aproximadamente -2 °C a los 60 a 90 min después de la inyección para los compuestos XV, XVI, XVII y XX, y de aproximadamente -2,8 °C a los 90 min después de la inyección para los compuestos XVIII y XIX.

35 Ejemplo 13: Administración repetida de fármacos de NT activada de la invención

Para determinar la capacidad de respuesta hipotérmica de ratones tras administraciones repetidas de NT activada de la invención, ratones Swiss (CD-1) recibieron cuatro administraciones intravenosas (en embolada) diarias del compuesto XIV a 4 mg/kg de eq. de NT. Se controló la temperatura corporal rectal a diario durante 3 horas después de la inyección.

40 En el día 1, los ratones generalmente mostraron una disminución máxima en la temperatura corporal de -5,5 °C a los 45 min después de la inyección (figura 11). Aunque la respuesta hipotérmica fue ligeramente inferior en el día 2, después el efecto permaneció significativo y estable (desde el día 2 al día 4), con una disminución promedio en la temperatura corporal de -3 °C a los 30 min después de la inyección.

45 Al contrario de los análogos de NT estables, que no muestran efectos tras 3 días de administración repetida (Boules *et al.*, 2003, Brain Res., 987(1):39-48), estos resultados demuestran que los fármacos de NT activada de la invención muestran propiedades farmacodinámicas exclusivas con tolerancia limitada, lo cual permite

administraciones repetidas o subcrónicas a niveles de dosis eficaces y seguros.

Ejemplo 14: Efectos antipiréticos de los fármacos de NT activada de la invención

Además de suscitar un fuerte efecto hipotérmico cuando se inyectan por vía intravenosa en ratones no expuestos, se ensayó el efecto antipirético de los fármacos de NT activada de la invención en ratones con una hipertermia inducida por levaduras. Brevemente, primero se midió la temperatura rectal de ratones NMRI macho 14 horas antes del ensayo usando una sonda rectal (línea de base 1, dos mediciones independientes con un intervalo mínimo de 5 min). Después los ratones recibieron por vía subcutánea una inyección con una suspensión de levaduras (512 mg/kg), para inducir una respuesta hipertérmica, o con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en disolución salina al 0,9%. Catorce horas después, se midió de nuevo la temperatura rectal de los ratones (línea de base 2, dos mediciones independientes con un intervalo mínimo de 5 min) para evaluar el efecto de la inyección de levaduras o de HPMC sobre la temperatura de la línea de base. Después los ratones se aleatorizaron y recibieron una inyección intravenosa con la molécula de neurotensina activada (compuesto XIV) o control (disolución salina al 0,9%), y se volvió a medir la temperatura rectal 15, 30, 45, 60, 120 y 180 minutos después.

Los ratones control que recibieron una inyección con la suspensión de levaduras y que recibieron disolución salina mostraron una hipertermia típica de 0,6-1 °C. El efecto antipirético de las moléculas de NT activadas de la invención se clasificó según su capacidad para revertir la hipertermia inducida. Los resultados demostraron que el compuesto XIV revierte significativamente la hipertermia en ratones a 2 mg/kg de eq. de NT y con una aparición rápida, con un efecto máximo de -2,2 °C, cuando se compara con la línea de base 2 de los mismos animales a los 15 min después de la inyección o con animales tratados con disolución salina en los mismos momentos (figura 12). El efecto antipirético del compuesto XIV muestra una relación de dosis-respuesta, con la posibilidad de disminuir aún más la temperatura corporal hasta 4,7 °C al nivel de dosis de 6 mg/kg de eq. de NT. Este notable resultado demuestra que la normotermia controlada o incluso una hipotermia terapéutica moderada inducida por las moléculas de NT activada de la invención puede usarse para la neuroprotección en trastornos agudos asociados con una hipertermia, tales como isquemia cerebral focal, lesiones cerebrales traumáticas graves, ICH, infecciones víricas, bacterianas o parasitarias, y cualquier trastorno agudo en el que una respuesta inflamatoria local puede inducir hipertermia.

Ejemplo 15: Efectos anticonvulsivos, neuroprotectores y antineuroinflamatorios de los fármacos de NT activada en un modelo de epilepsia en ratón y muerte neuronal excitotóxica

En este ejemplo, se evaluó el potencial de los fármacos de NT activada de la invención para estimular la neuroprotección tras una excitotoxicidad asociada con convulsiones y ataques. Más que cualquier otra célula, las neuronas son particularmente sensibles a la carencia de oxígeno y glucosa, una situación que induce una liberación masiva de glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio de las neuronas. Una liberación excesiva de glutamato por las neuronas induce, a su vez, una actividad neuronal excesiva, que provoca la muerte neuronal rápida y una neuroinflamación perjudicial. Este proceso de excitotoxicidad es habitual en todas las formas de isquemia cerebral, es decir, después de una parada cardíaca repentina (isquemia cerebral global), después de un ictus (isquemia focal) e isquemia neonatal. La excitotoxicidad también aparece durante los ataques y en la epilepsia y después de traumatismos cerebrales y de la médula ósea. En todos los casos, la muerte neuronal rápida observada en áreas del sistema nervioso cuyas neuronas son particularmente sensibles a la excitotoxicidad, tales como el hipocampo, conduce a daños neuronales irreversibles que a menudo producen minusvalías graves o muerte. Los ataques también pueden asociarse con una germinación axonal aberrante, en particular de las fibras musgosas del hipocampo en la semana después de la aparición de los ataques.

En el presente caso, la excitotoxicidad se indujo mediante una inyección subcutánea (s.c.) de ácido kaínico (KA), un agente proconvulsivo conocido por inducir un estado epiléptico (SE) con excitotoxicidad, neuroinflamación y graves daños neuronales en el hipocampo que pueden observarse de 3 a 7 días después de la administración de KA, y con germinación axonal aberrante de fibras musgosas del giro dentado que pueden observarse a las 7-8 semanas después de la administración de KA. Se ensayó el efecto del compuesto XIV sobre i) la actividad epiléptica (persistencia de ataques recurrentes), ii) neurodegeneración, neuroinflamación y los daños en el tejido cerebral resultantes, y iii) germinación axonal aberrante de fibras musgosas del giro dentado.

Ratones adultos FVB/N recibieron una inyección con una única dosis de KA (40-45 mg/kg s.c.) para generar ratones con ataques recurrentes espontáneos como marca característica del SE. A un grupo de ratones de control negativo se les administró disolución salina al 0,9% en lugar de KA y ningún tratamiento posterior ("SHAM", n = 5). Treinta minutos después de la aparición del SE, los ratones recibieron una inyección intravenosa en embolada (vena de la cola) del compuesto XIV a la dosis de 4 mg/kg de eq. de NT (grupo de tratamiento "SE + HT", n = 5) o disolución salina al 0,9% (grupo "SE", n = 5), o una dosis alta de diazepam (DZP) a 15 mg/kg, un potente fármaco anticonvulsivo y antiépiléptico (grupo de control positivo "SE + DZP"). Se controló la temperatura corporal antes de la inyección de KA y después cada 15 min durante 6 horas, usando una sonda rectal. Durante este periodo, los ratones se evaluaron para la aparición y la gravedad de ataques motores. Una semana después, los animales se sacrificaron para la evaluación histológica de la muerte de células neuronales en secciones coronales, siendo la formación del hipocampo la principal estructura en el cerebro que muestra daños tisulares en este modelo de excitotoxicidad. Otro grupo de animales con los mismos tratamientos se sacrificaron a las 8 semanas para la evaluación histológica de la germinación axonal aberrante de fibras musgosas del giro dentado.

1) Efectos del fármaco de NT activada sobre la temperatura corporal y la intensidad de los ataques en el estado epiléptico: el compuesto XIV tiene propiedades anticonvulsivas

La administración de KA (40-45 mg/kg; s.c.) provocó cambios en el comportamiento secuenciales característicos. Inmediatamente después de ser inyectados, todos los animales desarrollaron inmovilidad (estadio 1). Dentro de 30 minutos después de la inyección de KA, se observaron automatismos con cabeceo, clonus de las extremidades anteriores y comportamiento de movimiento en círculos (estadios 2-3). Después, la mayoría de los animales avanzaron hasta levantarse sobre dos partes de modo intermitente (estadio 4), y después continuo (estadio 5) con clonus de las extremidades anteriores y comportamiento de caídas. Algunos ratones mostraron ataques tónico-clónicos generalizados graves (estadio 6). Solo los animales que llegaron a unos ataques de al menos estadio 5 de Racine fueron incluidos en el estudio. El SE se produjo aproximadamente 2 horas después de la inyección de KA, y se caracteriza por ataques de estadio 5-6 que a menudo están asociados con hipertermia (figura 13A). El compuesto XIV administrado 30 min después de la aparición de SE (SE30) invariablemente condujo a una hipotermia transitoria (figura 13A), que persistió al menos 2 hr. Se registraron unas disminuciones promedio en la temperatura corporal ("body temperature", BT) de -2,5 °C y -3,6 °C, respectivamente, para los animales SE30+compuesto XIV, comparado con animales SE ( $F = 52,34$ ;  $***P < 0,001$ ). Esta hipotermia se asoció con una disminución significativa de los ataques en el grupo de SE30+compuesto XIV, comparado con el grupo SE ( $F = 823,96$ ;  $***P < 0,001$ ; figura 13B). Los animales SE30+compuesto XIV presentaron un promedio de ataques de estadio 2 o menor durante el resto del experimento. Un subconjunto de animales fueron administrados i.p. con una dosis alta de diazepam (DZP). Al igual que los animales SE30+compuesto XIV, los animales tratados con DZP mostraron ataques de estadio 1-2 durante el resto del experimento, y también se observó hipotermia en estos animales ( $F = 823,96$ ;  $***P < 0,001$ ; figura 13A, B). No se observaron variaciones significativas en la BT o la intensidad de los ataques cuando se administró la neurotensina NT(8-13) 30 min después de la aparición de SE, comparado con animales SE. Así, la administración del compuesto XIV a la dosis de 4 mg/kg de eq. de NT en animales SE (grupo SE + HT) indujo una reducción evidente o incluso la supresión de los ataques motores, lo cual demuestra el potente efecto anticonvulsivo del fármaco. Este efecto se correlaciona con una disminución de -3 a -6 °C en la temperatura corporal durante aproximadamente 2,5 horas.

2) El fármaco de NT activada estimula la neuroprotección en el hipocampo después de un estado epiléptico

Usando el anticuerpo anti-NeuN y Fluoro-jade C que marcan, respectivamente, una proteína nuclear específica neuronal y la muerte neuronal, se observó una amplia pérdida de células piramidales CA1 y CA3, así como algunas neuronas hilares del giro dentado en el hipocampo de animales SE control (figura 14A-panel B), comparado con animales SHAM (figura 14A-panel A). La neurodegeneración observada en animales SE disminuyó significativamente cuando se administra el compuesto XIV o DZP 30 min después de la aparición de SE (figura 14A, B), pero no se observaron cambios cuando se administra NT(8-13). Los resultados obtenidos para los animales SE30+compuesto XIV fueron significativamente diferentes de los observados en los grupos SE30+NT(8-13), pero no fueron diferentes de los observados en los ratones SE30+DZP.

3) El fármaco de NT activada atenúa la respuesta inflamatoria mediada por la glía en el hipocampo después de un estado epiléptico

La gliosis inducida por SE implica a los tipos celulares microgliales y astrogliales. Se usó inmunotinción con GFAP e Iba1 para calcular el efecto del compuesto XIV sobre la neuroinflamación. En los animales SHAM se detectó un marcaje basal de GFAP e Iba1 en el HF (figura 14A, panel D). En los animales SE se produjo una activación muy fuerte de las células gliales en todas las capas del hipocampo (figura 14, paneles E, H). Esta respuesta inflamatoria disminuyó significativamente cuando se administra el compuesto XIV o DZP 30 min después de la aparición de SE (figura 14, paneles F, I), pero no se observaron cambios cuando se administra NT(8-13). Los resultados obtenidos para los animales SE30+compuesto XIV fueron significativamente diferentes de los observados en los grupos SE30+NT(8-13), pero no fueron diferentes de los observados en los ratones SE30+DZP.

4) El fármaco de NT activada atenúa la germinación de fibras musgosas en el hipocampo después de un estado epiléptico

La germinación de fibras musgosas, los axones de células granulares del giro dentado, está bien establecida en ratones tratados con KA y en la epilepsia en general. Se ha propuesto que esta germinación aberrante aparece en la capa molecular interna (IML) en respuesta a la pérdida de células hilares. Para investigar más a fondo el efecto neuroprotector del compuesto XIV, se evaluó el grado de germinación de fibras musgosas 8 semanas después de SE. Los terminales de las fibras musgosas están muy enriquecidos en iones cinc y se empleó una tinción inmunohistoquímica para el transportador vesicular de cinc 3 (ZnT3) para detectar la germinación de fibras musgosas, según se ilustra en la figura 15. En todos los animales SHAM, están presentes terminales de fibras musgosas en el hilo y el estrato lúcido de la región CA3 y no se observaron terminales en la IML del DG (figura 15A, paneles A, B, figura 15B). En los animales SE, no solo se observaron terminales de fibras musgosas en las regiones hilar y CA3, como en los ratones SHAM, sino también dentro de la IML (figura 15A paneles C, D, figura 15B). En comparación con animales SE, el número de terminales que inervan la IML se redujo considerablemente en animales administrados con el compuesto XIV (figura 15A, paneles E, F, figura 15B) o DZP 30 min después de la aparición de SE, pero no cambió significativamente cuando se administra NT(8-13) (figura 15B).

Todos estos resultados demuestran claramente que las moléculas de NT activada de la invención no solo representan una estrategia atractiva para prevenir los daños en tejidos cerebrales que resultan de la muerte neuronal excitotóxica y la neuroinflamación, sino que también tienen el potencial de inhibir los ataques motores, probablemente reduciendo la actividad neuronal a través de una hipotermia.

5 Ejemplo 16: Efecto antinociceptivo de los fármacos de NT activada en tándem

Para evaluar el efecto antinociceptivo de los fármacos de NT activada, se ensayó el compuesto XIV en un modelo de dolor experimental en ratones. Se usó el ensayo de contorsión como modelo de dolor visceral agudo para evaluar el efecto del compuesto XIV después de la administración intravenosa. Puesto que el tiempo hasta la máxima disminución en la temperatura corporal en ratones que reciben el compuesto XIV es de aproximadamente 45 min después de la inyección, se supuso una cinética farmacodinámica similar en este modelo de dolor. En primer lugar, los ratones recibieron una inyección intravenosa (en embolada) del compuesto XIV a niveles de dosis crecientes, seguido 30 min después de una inyección intraperitoneal de ácido acético al 0,7% (10 ml/kg). En los ratones control, la inyección intraperitoneal de ácido acético produce unos estiramientos abdominales característicos y cuantificables (alargamiento del cuerpo y extensión de las extremidades anteriores) tan pronto como 2-3 minutos después de la inyección y que alcanzan un pico entre 5 y 15 min después de la inyección. Por tanto, se usó esta ventana de tiempo para evaluar el número de estiramientos abdominales (recuento de contorsiones a lo largo de 10 min de observación) en ratones administrados con disolución salina o compuesto XIV a 0,5, 1 o 5 mg/kg de eq. de NT.

El compuesto XIV produjo un efecto antinociceptivo significativo y dependiente de la dosis en este modelo, sin efecto a 0,5 mg/kg de eq. de NT, y una reducción del 50% y 64% del recuento de contorsiones a 1 y 5 mg/kg de eq. de NT, respectivamente (figura 16).

20

LISTA DE SECUENCIAS

<110> VECT-HORUS  
CNRS

5 <120> MOLÉCULAS DE NEUROTENSINA ACTIVADAS Y SUS USOS

<130> B1754

<160> 11

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 13

15 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> NT

20 <220>  
<221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
<222> (1)..(1)  
<223> el aminoácido es pE

25 <400> 1  
Glu Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu  
1 5 10

<210> 2  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> NT(8-13)

35 <400> 2  
Arg Arg Pro Tyr Ile Leu  
1 5

40 <210> 3  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> NT(6-13)

<400> 3  
Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu  
1 5

50 <210> 4  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> NT(2-13)

<400> 4  
Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu  
1 5 10

60

<210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> grupo activador  
  
 10 <400> 5  
 Met Pro Arg Leu Arg  
 1 5  
  
 <210> 6  
 <211> 5  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> grupo activador  
 20  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X es Pip  
 25  
 <400> 6  
 Met Xaa Arg Leu Arg  
 1 5  
  
 <210> 7  
 30 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 35 <223> grupo activador  
  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 <222> (2)..(2)  
 40 <223> X es Thz  
  
 <400> 7  
 Met Xaa Arg Leu Arg  
 45 1 5  
  
 <210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> grupo activador  
  
 55 <220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 <222> (1)..(1)  
 <223> C es una D-Cys  
  
 60 <400> 8  
 Cys Met Pro Arg Leu Arg Gly Cys  
 1 5  
  
 <210> 9

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

5 <220>  
 <223> grupo activador

<220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 10 <222> (1)..(1)  
 <223> C es una D-Cys

<220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 15 <222> (3)..(3)  
 <223> X es Pip

<220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 20 <222> (7)..(7)  
 <223> X es Sar

<400> 9  
 Cys Met Xaa Arg Leu Arg Xaa Cys  
 1 5

25 <210> 10  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> grupo activador

<220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 35 <222> (1)..(1)  
 <223> C es una D-Cys

<220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 40 <222> (3)..(3)  
 <223> X es Thz

<220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 45 <222> (8)..(8)  
 <223> X es Pen

<400> 10  
 Cys Met Xaa Arg Leu Arg Gly Xaa  
 50 1 5

<210> 11  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 55 <213> Artificial

<220>  
 <223> grupo activador

<220>  
 <221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
 60 <222> (1)..(1)  
 <223> C es una D-Cys

<220>  
<221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
<222> (3)..(3)  
<223> X es Pip

5

<220>  
<221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
<222> (7)..(7)  
<223> X es Sar

10

<220>  
<221> CARACTERISTICA MISCELANEA  
<222> (8)..(8)  
<223> X es Pen

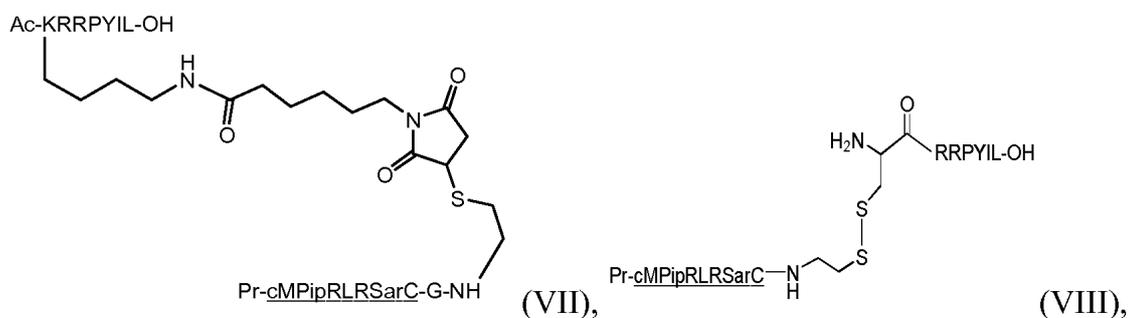
15

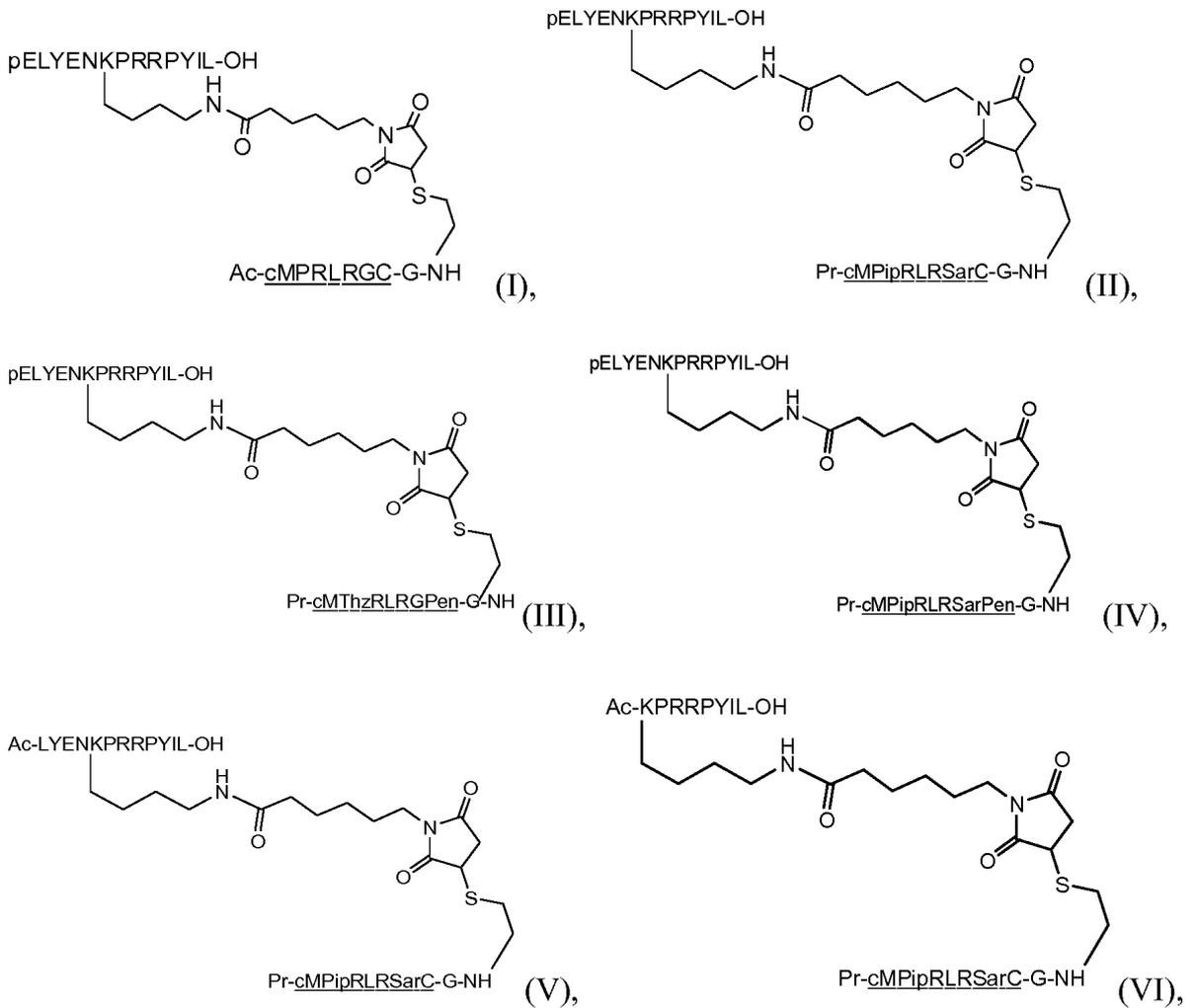
<400> 11  
Cys Met Xaa Arg Leu Arg Xaa Xaa  
1 5

20

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un compuesto que comprende un polipéptido de neurotensina acoplado covalentemente a un grupo activador, en el que el polipéptido de neurotensina comprende SEQ ID NO:2, o uno de sus análogos, que comprende una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos y que tiene una actividad biológica de la neurotensina, y en el que el grupo activador comprende la secuencia de aminoácidos M-aa1-R-L-R, en la que aa1 es prolina, o uno de sus análogos seleccionado de ácido piperídico (Pip) y ácido tiazolidin-4-carboxílico (Thz).
- 2.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de neurotensina comprende SEQ ID NO:1, o uno de sus análogos que comprende una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos y que tiene una actividad biológica de la neurotensina.
- 3.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el polipéptido de neurotensina se selecciona de NT, NT(2-13), NT(6-13), y NT(8-13).
- 4.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido de neurotensina comprende una sustitución o una modificación de 1, 2, 3 o 4 restos aminoácidos.
- 5.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido de neurotensina se selecciona de [Lys8]NT(8-13), [Lys9]NT(8-13), [(D)-Lys8]NT(8-13), [(D)-Orn9]NT(8-13), [Lys8-Lys9]NT(8-13), [(D)-Lys8-Lys9]NT(8-13), [Trp11]NT(8-13), [neoTrp11]NT(8-13), [Tle12]NT(8-13), [Trp11,Tle12]NT(8-13), [neoTrp11,Tle12]NT(8-13), [Lys8, Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8,Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8,Trp11]NT(8-13), [(D)-Lys8,neoTrp11]NT(8-13), [Lys8, Trp11, Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8,Trp11,Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8,neoTrp11,Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8,Lys9,Trp11,Tle12]NT(8-13), [(D)-Lys8,Lys9,neoTrp11,Tle12]NT(8-13), [Lys9,Tle12]NT(8-13), [Lys9,Trp11]NT(8-13), [Lys9,neoTrp11]NT(8-13), [Lys9,Trp11,Tle12]NT(8-13), [Lys9,neoTrp11,Tle12]NT(8-13), [HLys8,Tle12]NT(8-13), [HLys8,Trp11]NT(8-13), [HLys8,neoTrp11]NT(8-13), [HLys8,Trp11,Tle12]NT(8-13), [HLys8,neoTrp11,Tle12]NT(8-13), [(D)-Orn9,Tle12]NT(8-13), [(D)-Orn9,Trp11]NT(8-13), [(D)-Orn9,neoTrp11]NT(8-13), [(D)-Orn9,Trp11,Tle12]NT(8-13), o [(D)-Orn9,neoTrp11,Tle12]NT(8-13).
- 6.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo activador comprende una cualquiera de SEQ ID NO:5-11, preferiblemente SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.
- 7.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo activador y el polipéptido de neurotensina se conjugan a través de un grupo conector.
- 8.- El compuesto de la reivindicación 7, en el que el grupo conector comprende un polietilenglicol, una poliGli, un grupo espaciador Ahx o un enlace peptídico.
- 9.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un polipéptido de neurotensina que comprende SEQ ID NO:2, o uno de sus análogos que comprende una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos, conjugado a un grupo activador que comprende una cualquiera de SEQ ID NO:5-11, opcionalmente a través de un grupo conector.
- 10.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende un polipéptido de neurotensina que comprende SEQ ID NO:2, o uno de sus análogos que comprende una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos, conjugado a un grupo activador que comprende una cualquiera de SEQ ID NO:5-11, por medio de un enlace peptídico.
- 11.- Un compuesto seleccionado de los siguientes compuestos:





Pr-cMPipRLRSarC-RRPYIL-OH (IX),

Pr-cMPipRLRSarC-GGG-KPRRPYIL-OH (X),

Pr-cMPipRLRSarC-Ahx-KPRRPYIL-OH (XI),

5 Pr-cMPipRLRSarC-Ahx-RRPYIL-OH (XII),

Pr-cMPipRLRSarC-PEG2-RRPYIL-OH (XIII),

Pr-cMPipRLRSarC-PEG6-RRPYIL-OH, (XIV),

Pr-cMPipRLRSarC-RRPYTleL-OH (XV),

Pr-cMPipRLRSarC-KRPYTleL-OH (XVI),

10 Pr-cMPipRLRSarC-RKPYTleL-OH (XVII),

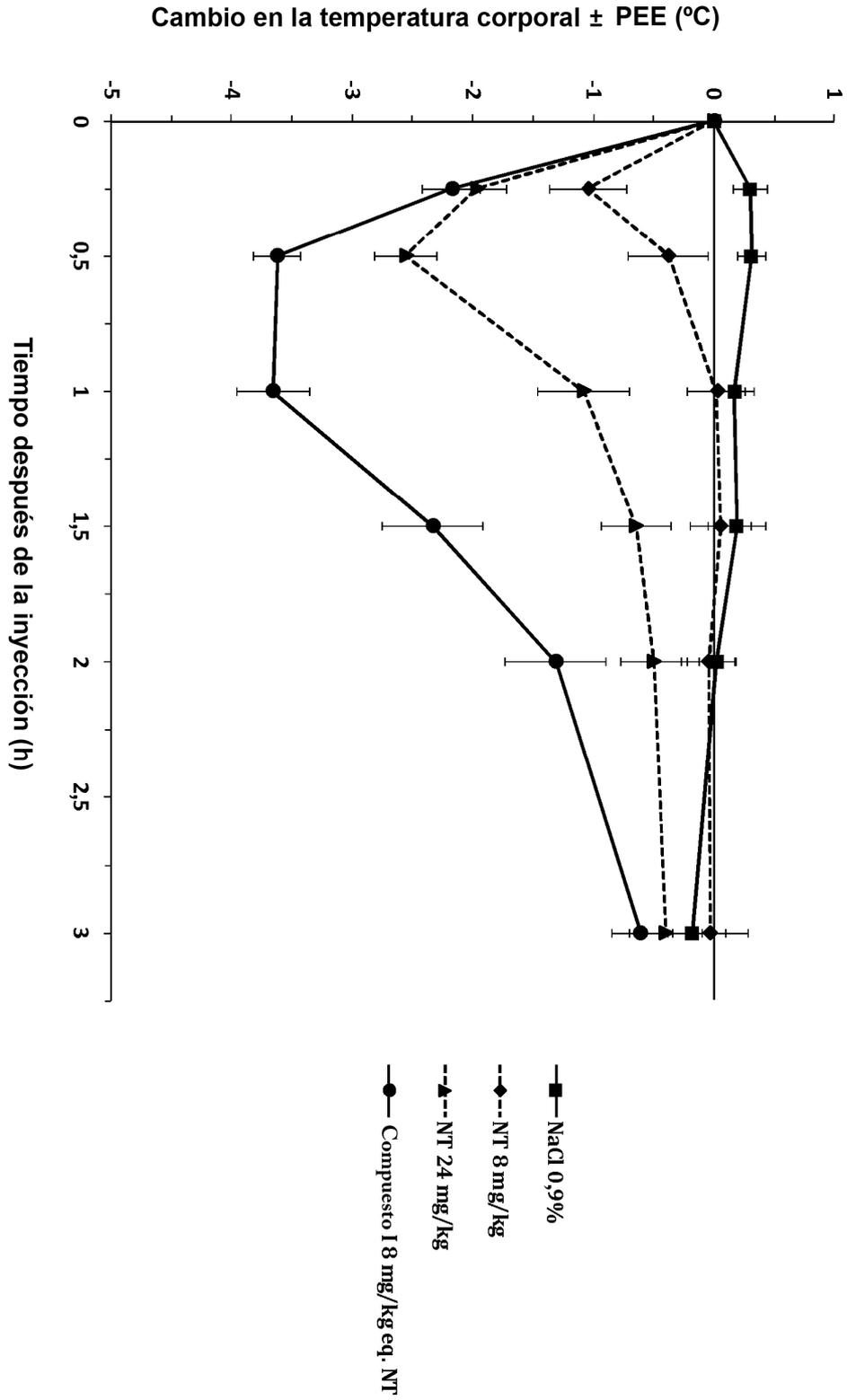
Pr-cMPipRLRSarC-RRPWTeL-OH (XVIII),

Pr-cMPipRLRSarC-KRPWTeL-OH (XIX), y

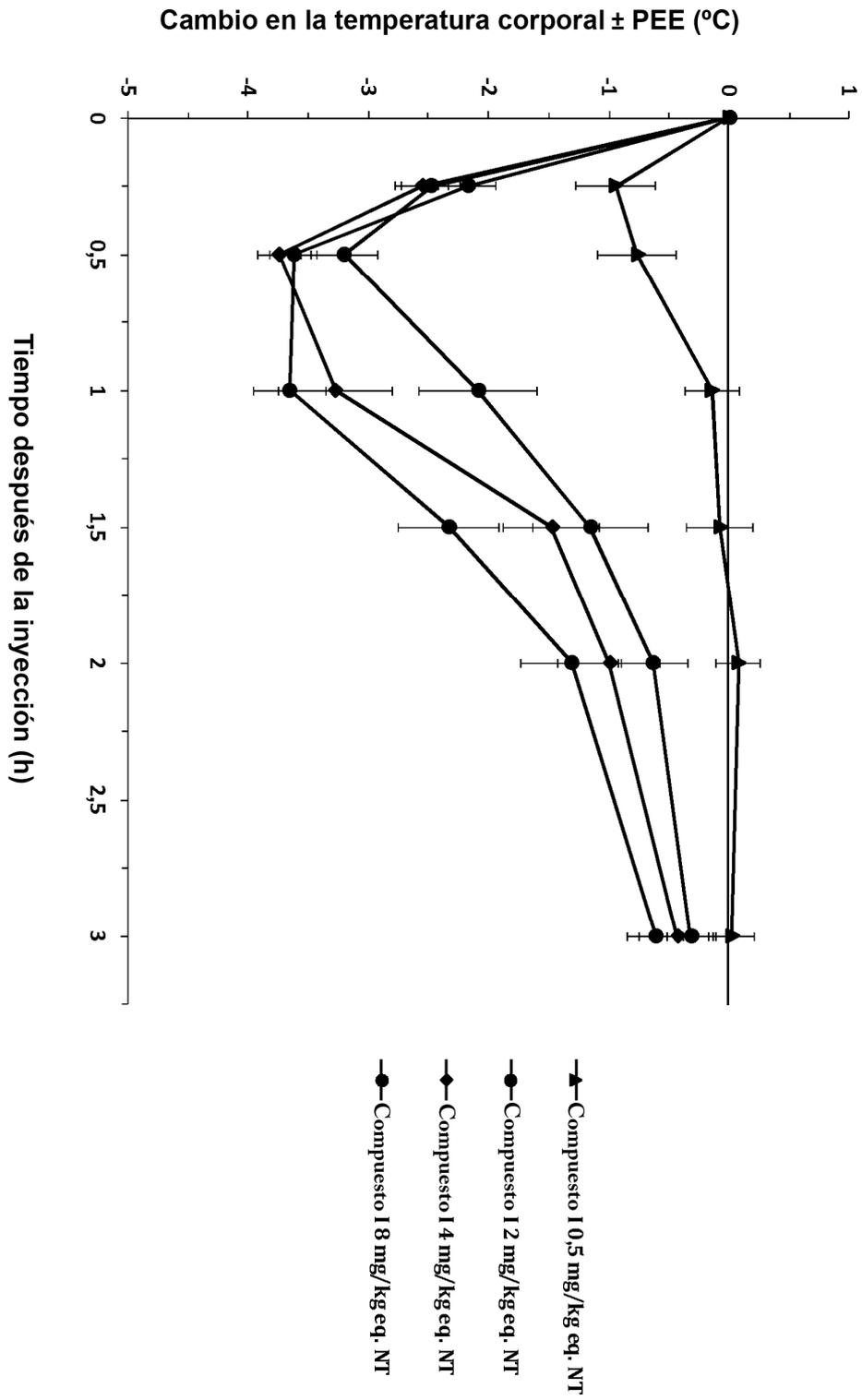
Pr-cMPipRLRSarPen-KRPYTleL-OH (XX).

15 12.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

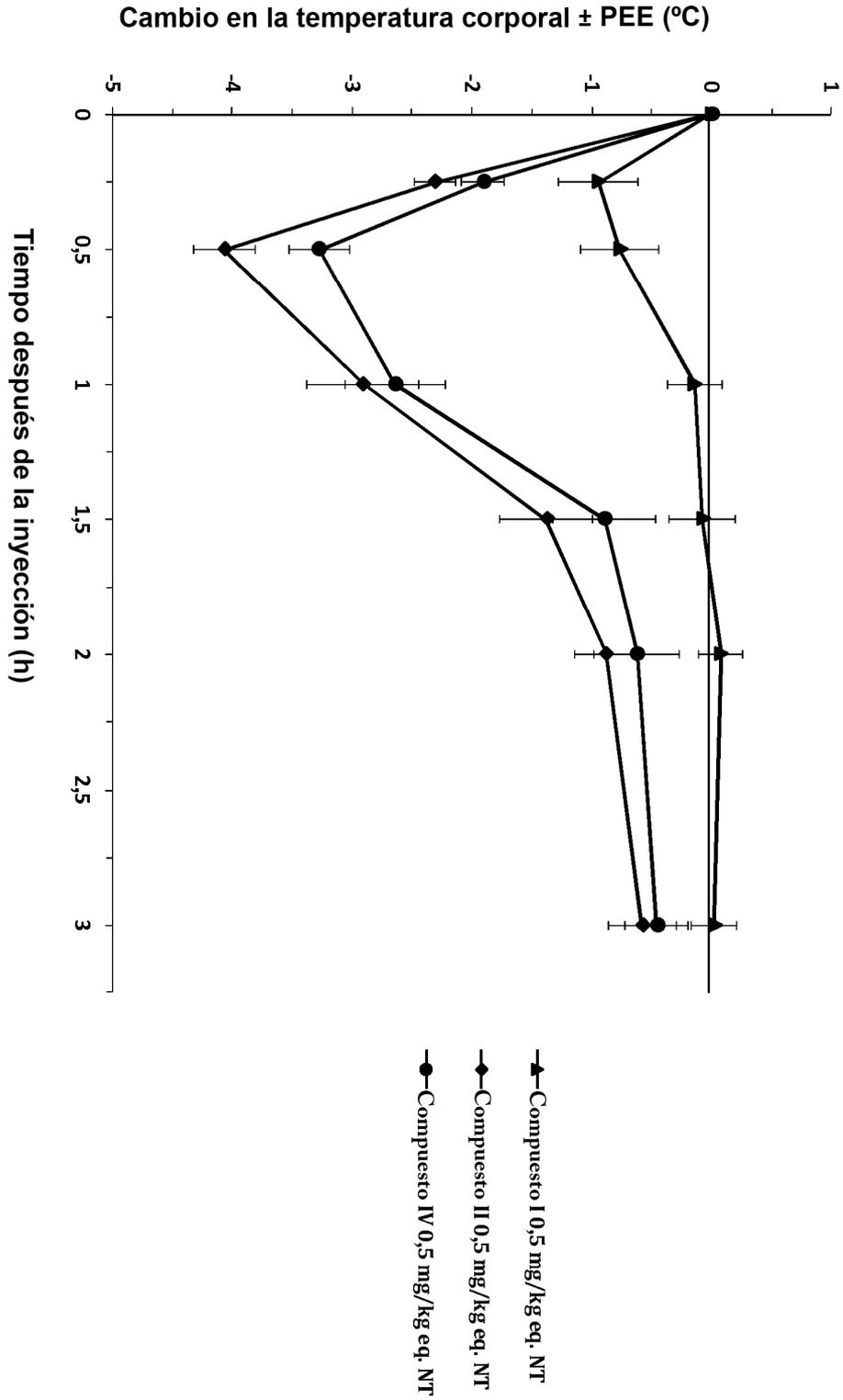
- 13.- Un método para fabricar un compuesto según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende acoplar covalentemente un polipéptido de neurotensina a un grupo activador, según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 5 14.- Un compuesto o una composición según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso para reducir la temperatura corporal en un sujeto mamífero.
- 15.- Un compuesto o una composición según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso para inducir una hipotermia en un sujeto mamífero después de una parada cardíaca repentina, o que presenta un ictus, isquemia neonatal, cirugía cardíaca, lesiones traumáticas de la cabeza y la médula espinal, ataques, dolor o hipertermia.
- 10 16.- Un compuesto o una composición según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso para proteger, prevenir o reducir los daños cerebrales en un sujeto mamífero.
- 17.- Un compuesto o una composición según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso para reducir las convulsiones en un sujeto mamífero.
- 15 18.- Un compuesto o una composición según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso para reducir el dolor en un sujeto mamífero.



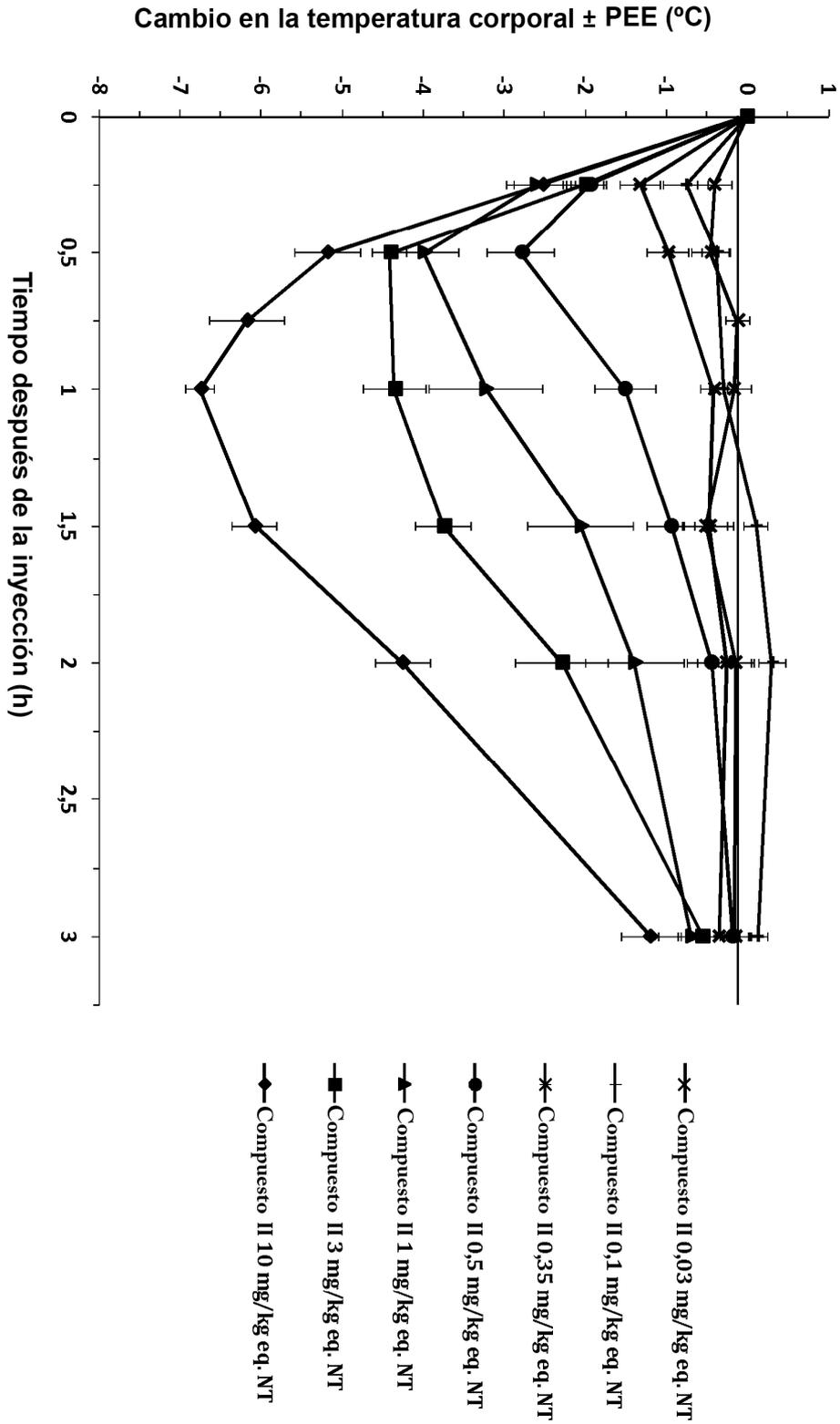
**Figura 1**



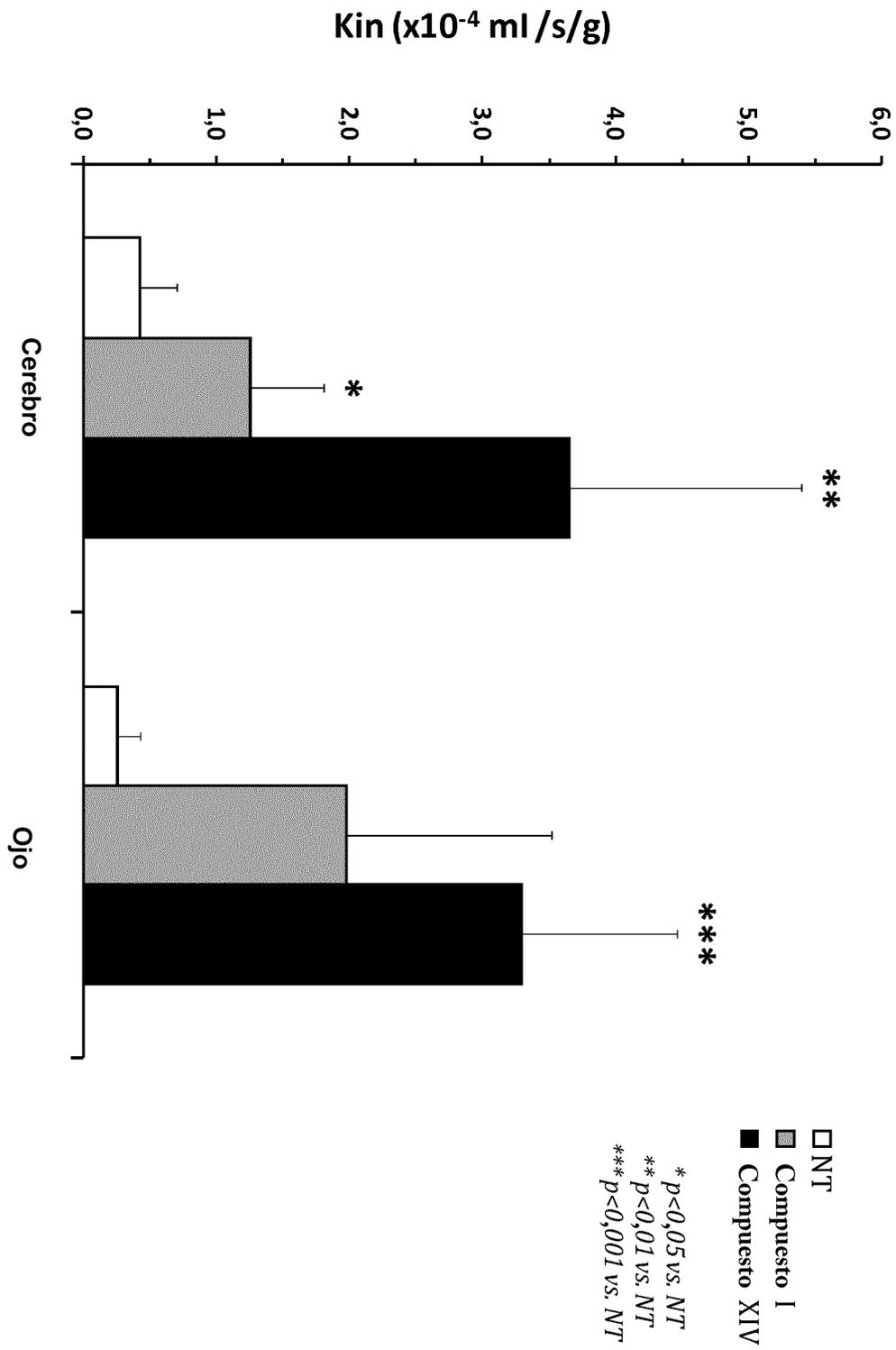
**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

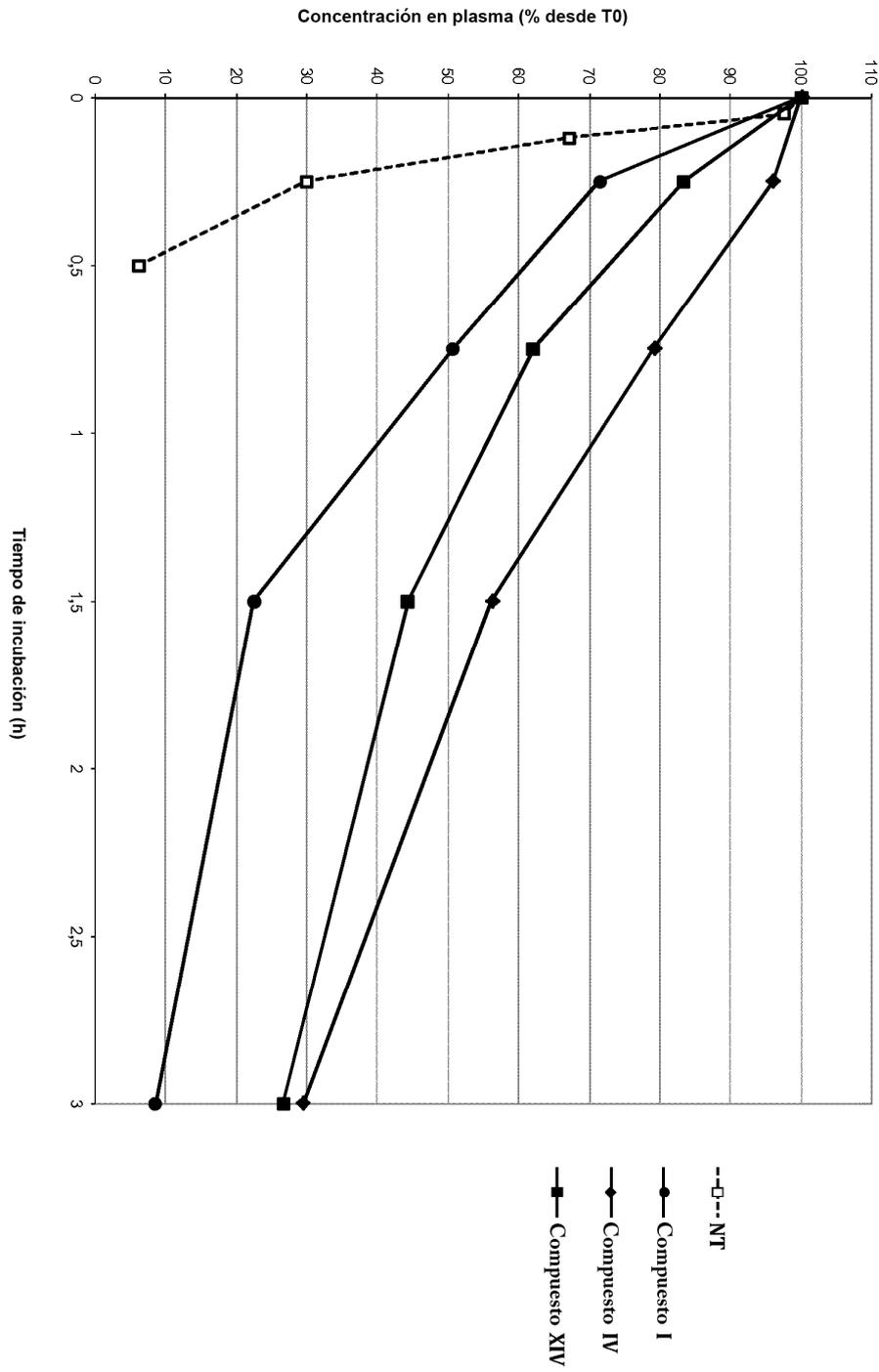


Figura 6

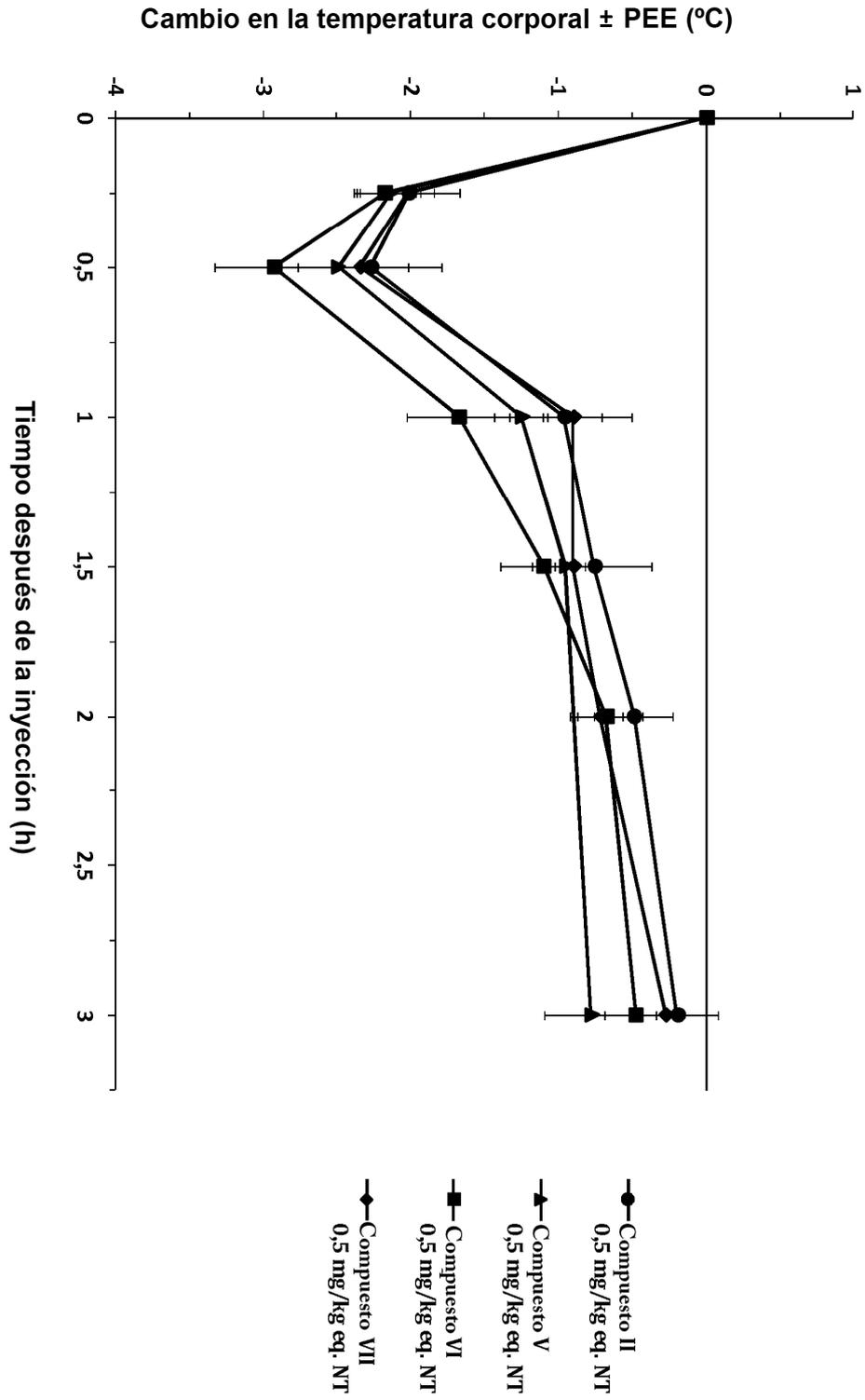
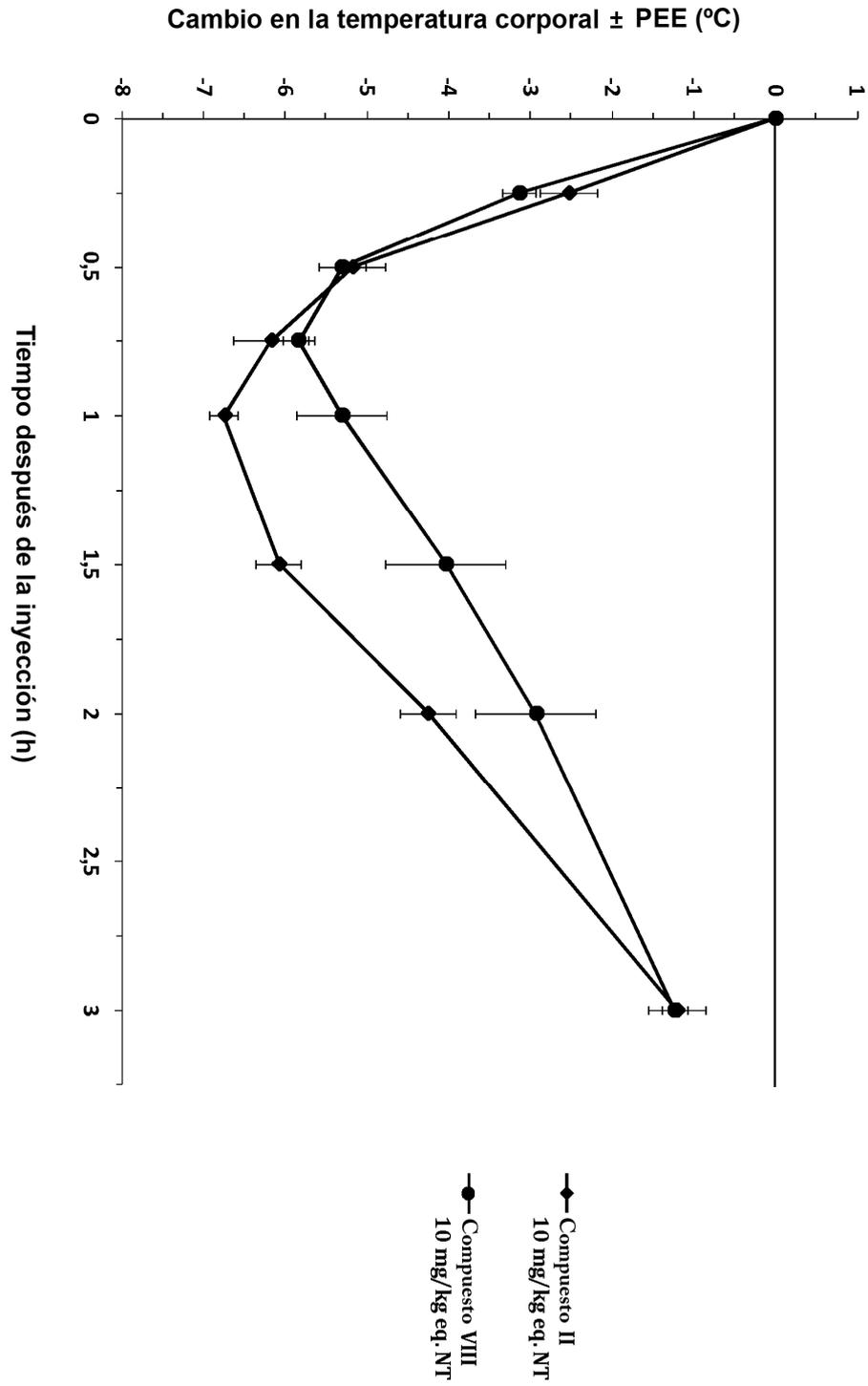
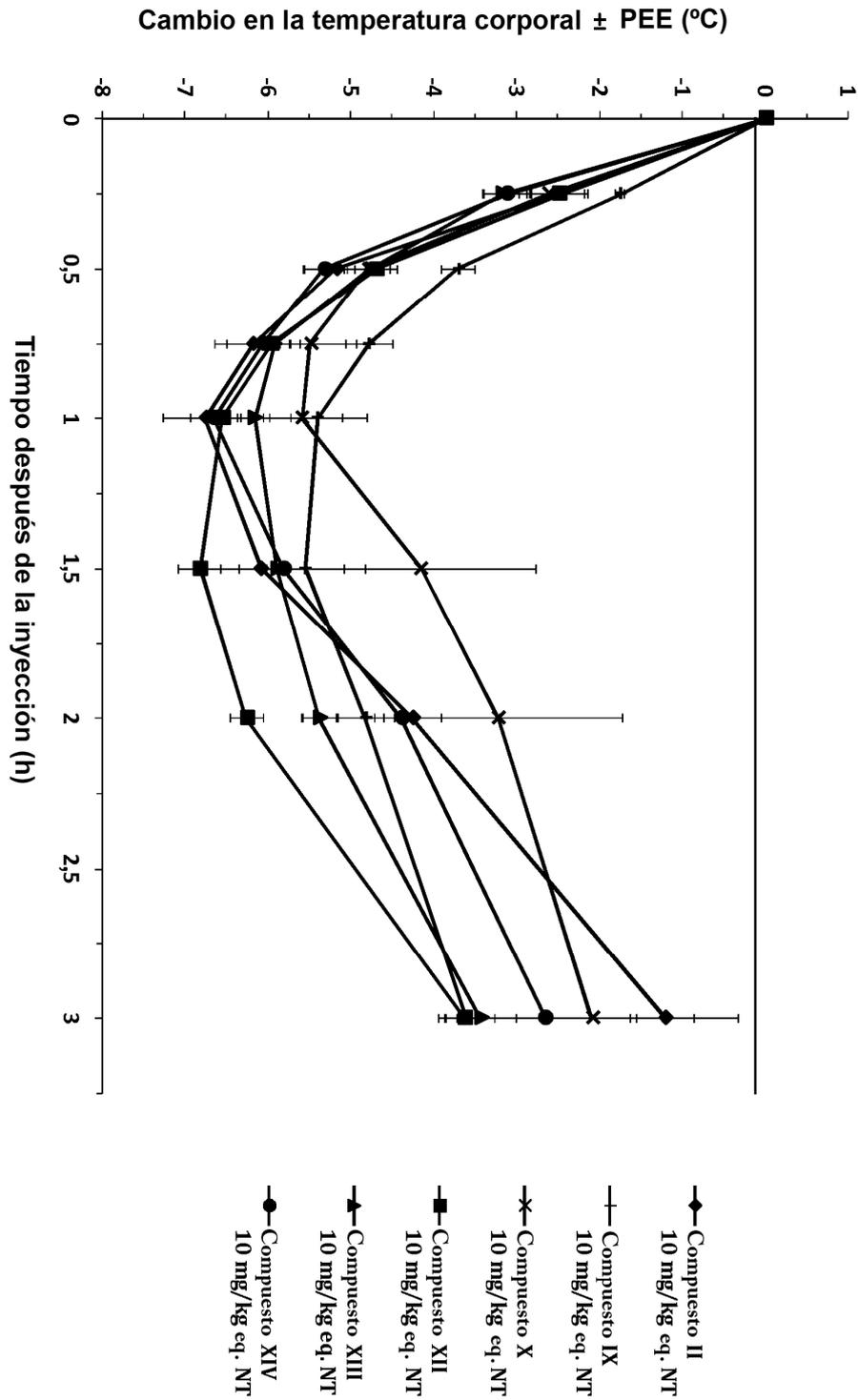


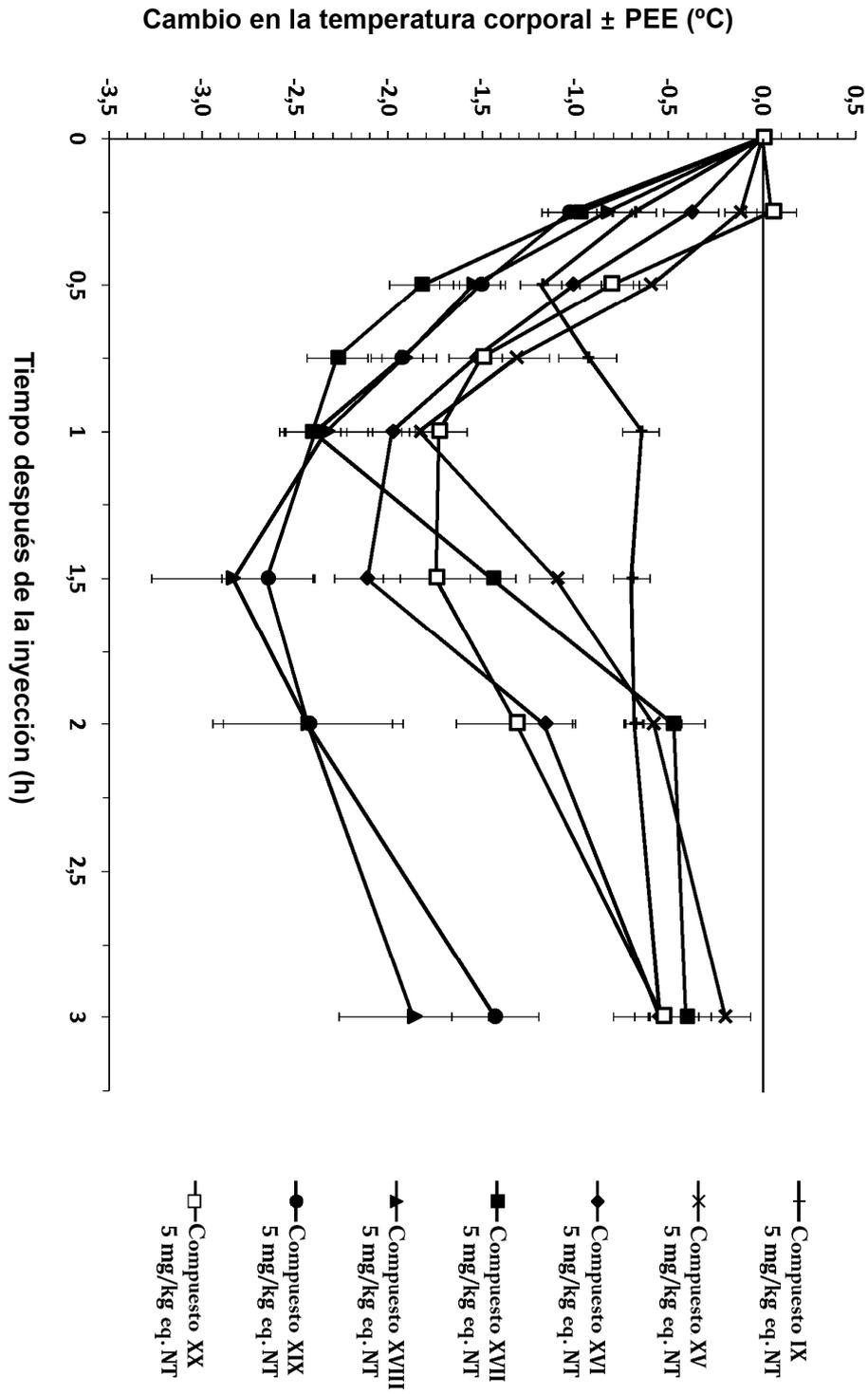
Figura 7



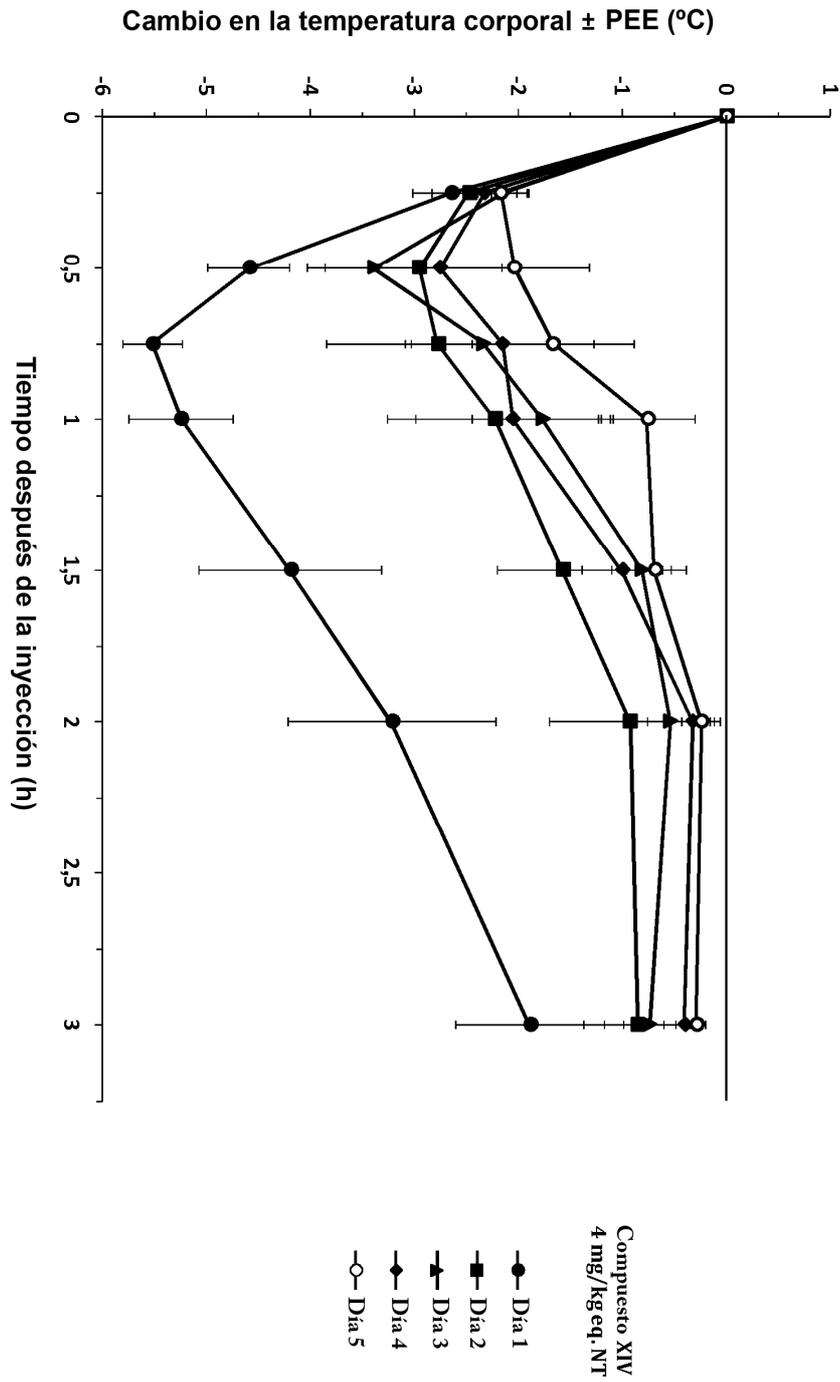
**Figura 8**



**Figura 9**



**Figura 10**



**Figura 11**

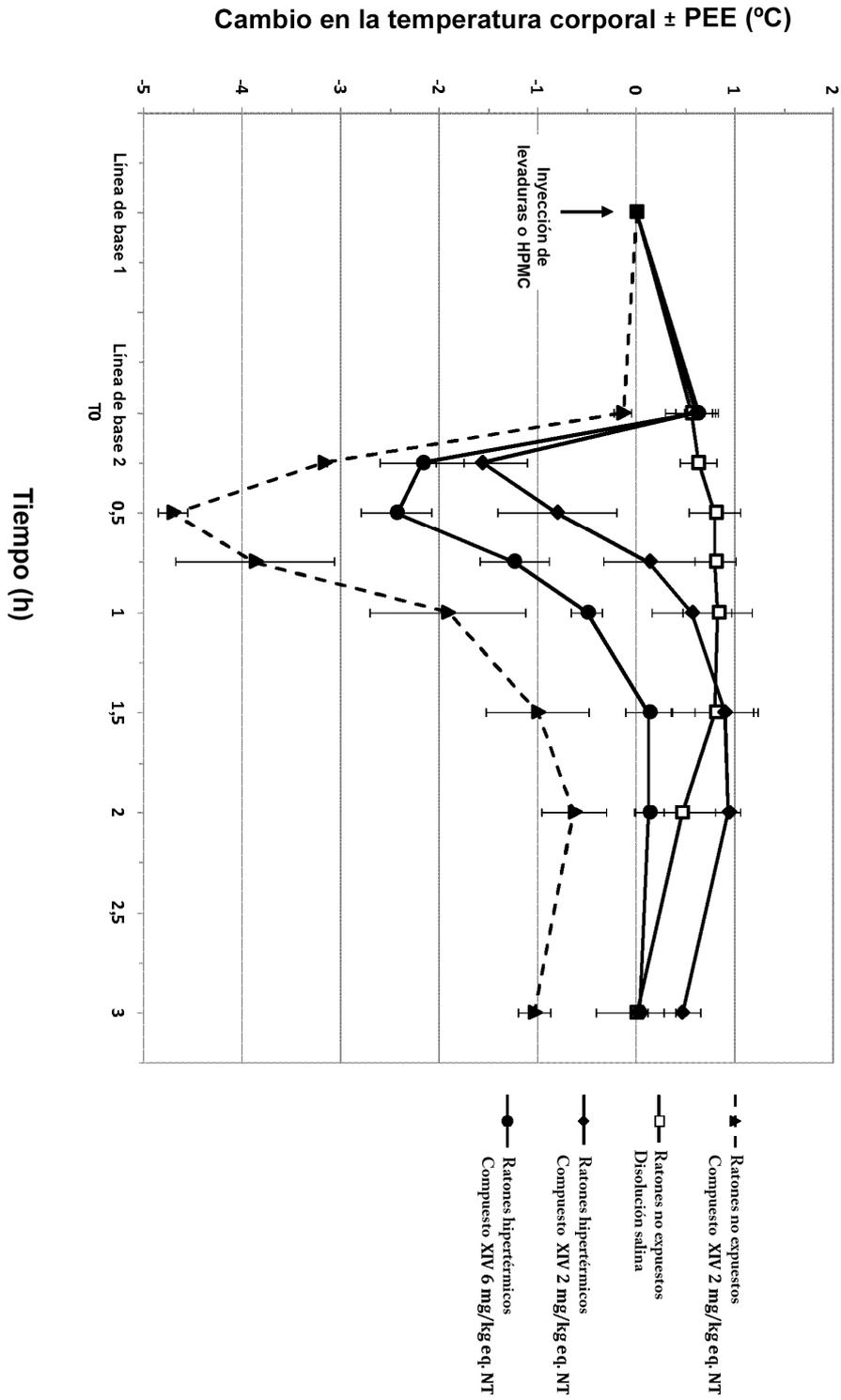
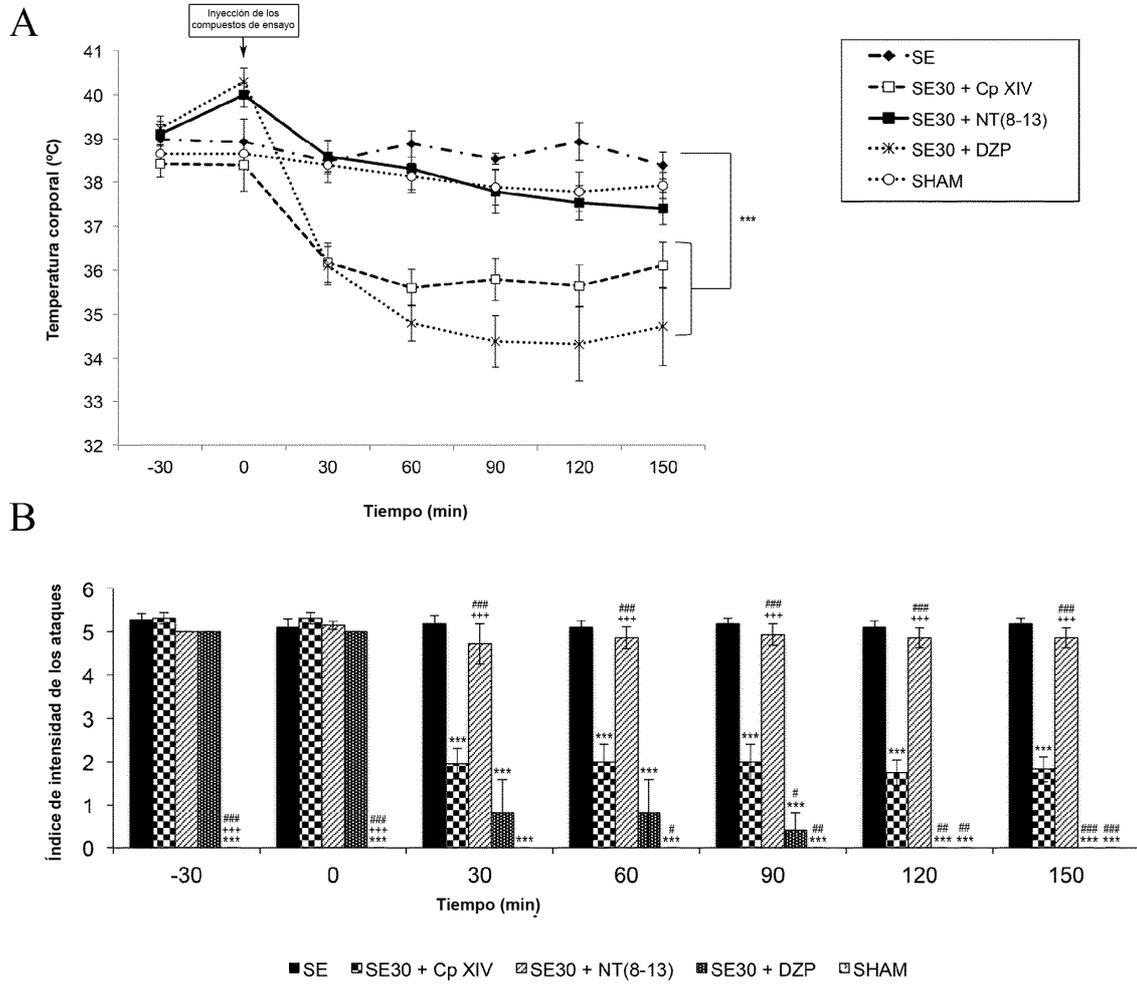


Figura 12

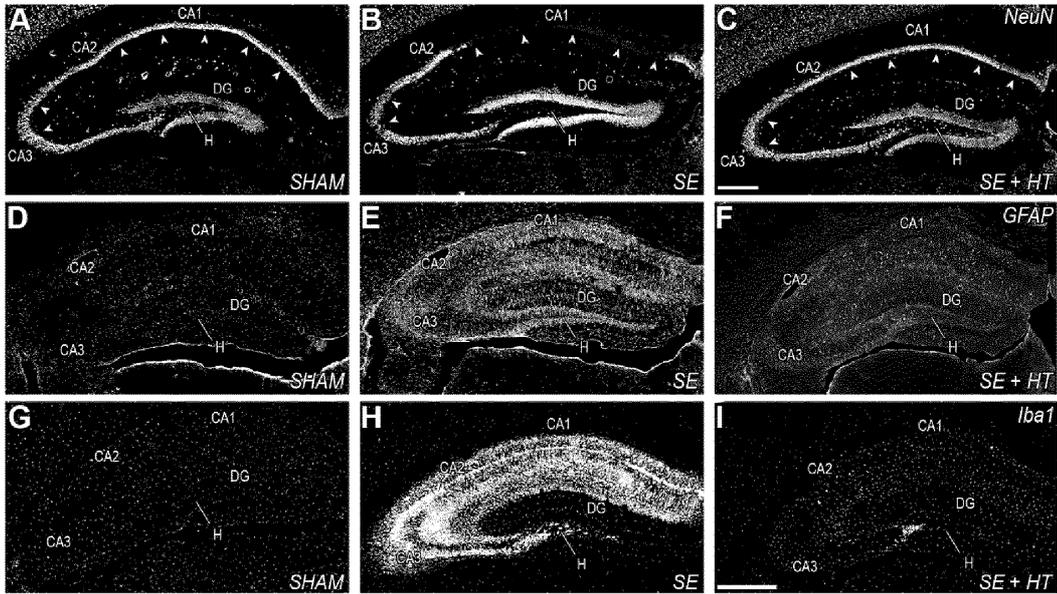


A : ANOVA + ensayo de Dunnett post hoc; \*\*\*P<0,001

B: ANOVA + ensayo de Tukey post hoc; \*comparado con el grupo SE ; #comparado con el grupo SE30 + compuesto XIV; + comparado con el grupo DZP . p<0,05; pp<0,01; pop<0,001

Figura 13

A



B

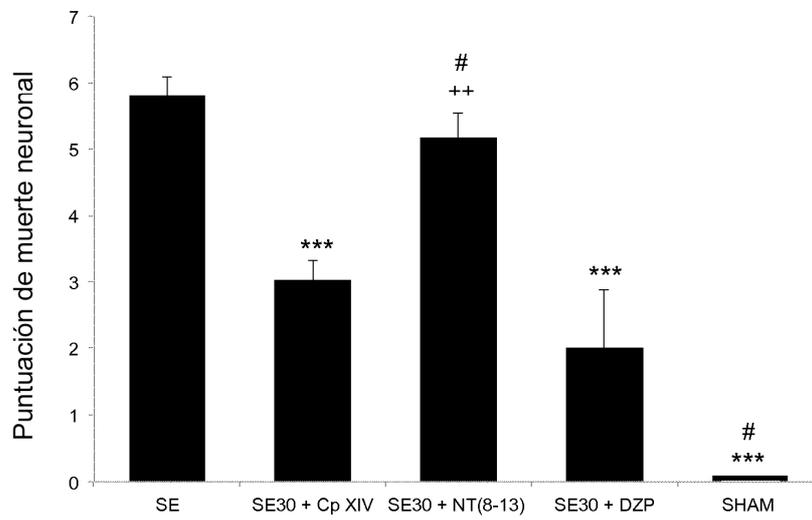
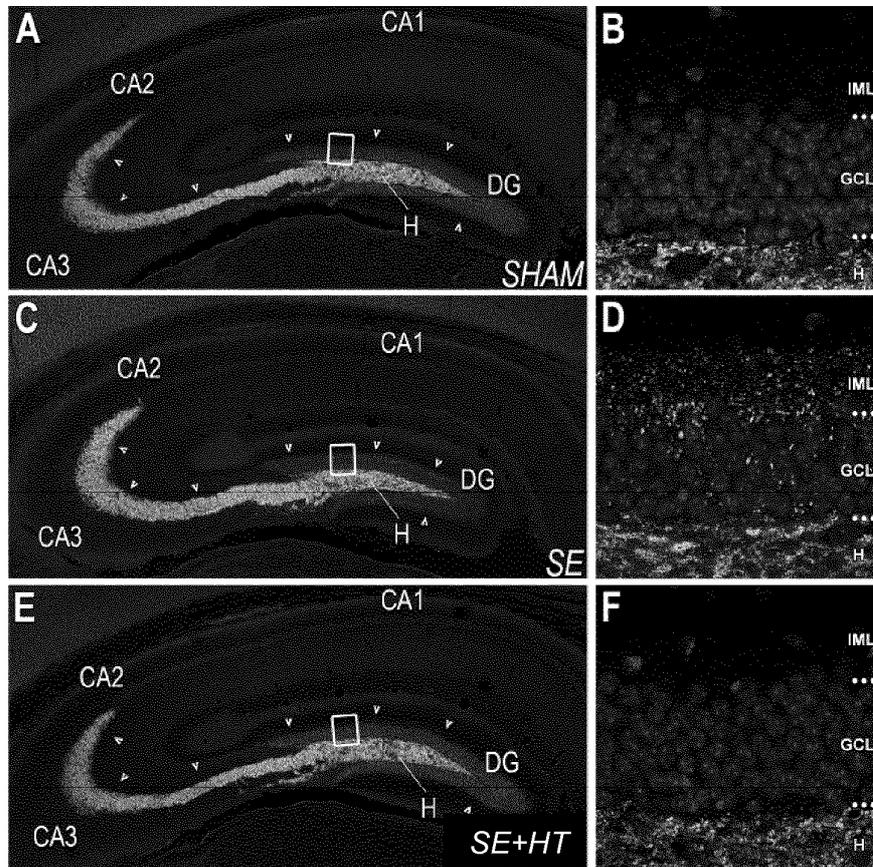


Figura 14

A



B

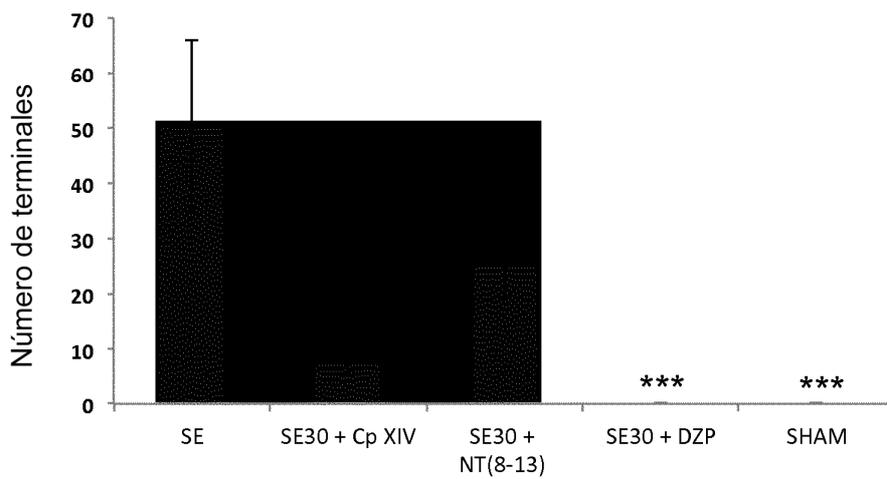


Figura 15

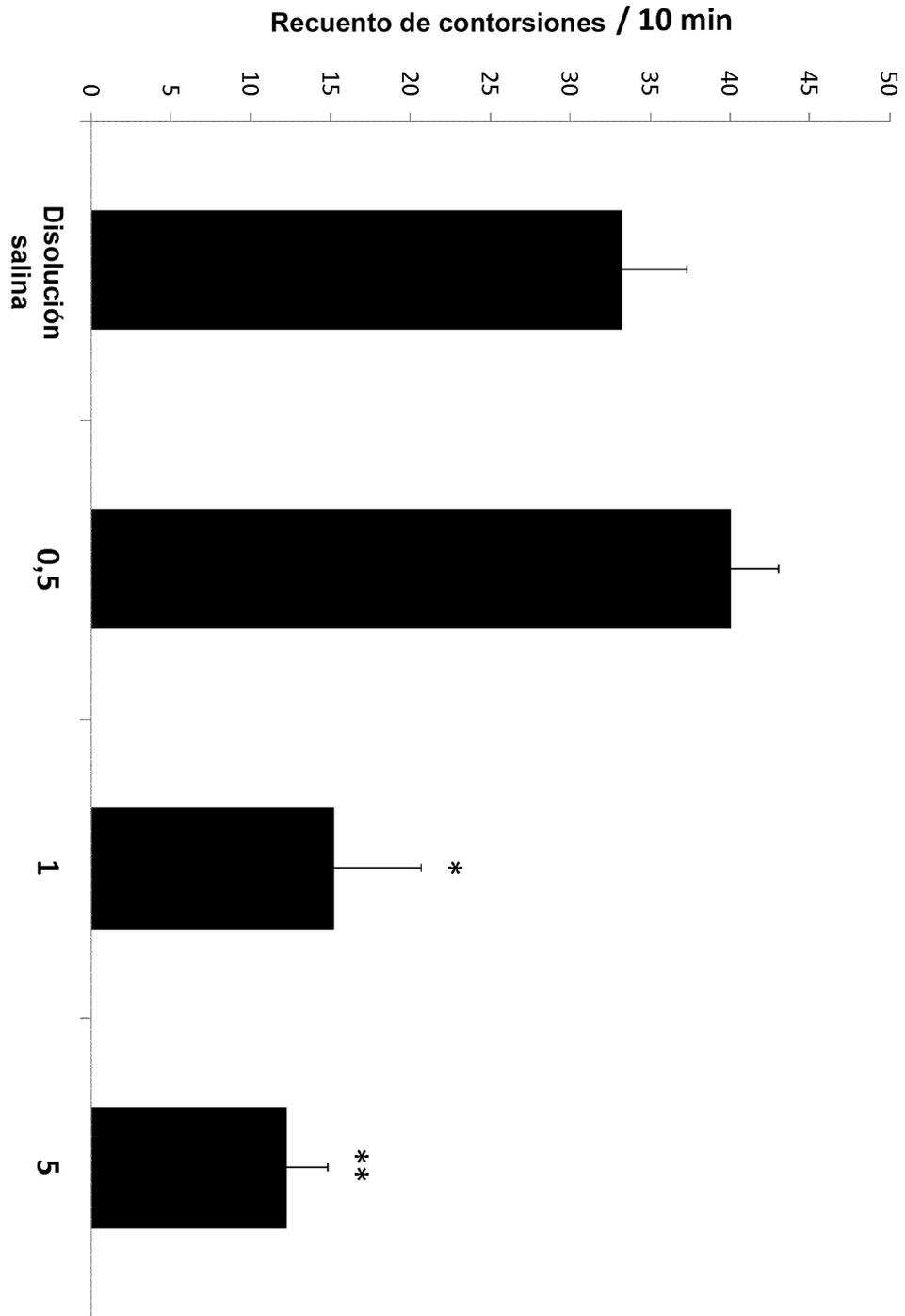


Figura 16