

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 847**

21 Número de solicitud: 201000930

51 Int. Cl.:

C07K 5/107 (2006.01)

C07K 5/117 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **13.07.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2012**

Fecha de la concesión: **21.11.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **03.12.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
03.12.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE BARCELONA
CENTRE DE PATENTS DE LA UB, BALDIRI
REIXAC, 4
08028 BARCELONA, ES y
INSTITUT DE RECERCA BIOMEDICA DE
BARCELONA**

72 Inventor/es:

**GIRALT LLEDÓ, Ernest;
TEIXIDÓ TURÁ, Meritxell y
MALAKOUTIKHAH, Morteza**

74 Agente/Representante:

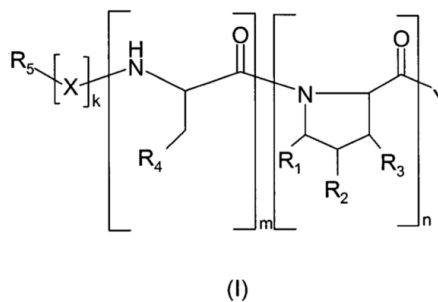
SEGURA CAMARA, Pascual

54 Título: **COMPUESTOS ÚTILES COMO LANZADERAS A TRAVÉS DE LA BARRERA
HEMATOENCEFÁLICA Y CONSTRUCCIONES LANZADERA-CARGO.**

57 Resumen:

Compuestos útiles como lanzaderas a través de la barrera hematoencefálica y construcciones lanzadera-cargo.

Compuestos de fórmula (I), donde, R_1 , R_2 y R_3 son independientemente seleccionados entre: H y un $(CH_2)_q-R_6$, R_4 es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos con 1-4 anillos; R_5 es H o CH_3CO- ; R_6 es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos con 1-2 anillos; X se selecciona entre $-NH-(CH_2)_r-CO-$, $-CO(CH_2)_r-CO-$, $-S-(CH_2)_r-$, $-S-(CH_2)_r-CO-$, $-O-(CH_2)_r-$ y $-O-(CH_2)_r-CO-$; Y es $-NH_2$, $-OH$, $-OR_7$ o $-NHR_7$; k es un entero de 0 a 1; m es un entero de 0 a 1; n es un entero de 2 a 10; q es un entero de 0 a 1; r es un entero de 1 a 3; R_7 es un radical (C_1-C_6) -alquilo; con la condición de que al menos un radical R seleccionado entre R_1 , R_2 y R_3 es $(CH_2)_q-R_6$ y con la condición de que cuando X es $-CO(CH_2)_r-CO-$, R_5 es H, son útiles como lanzaderas a través de la barrera hematoencefálica (BBB). Las construcciones BBB-lanzadera-cargo, son útiles como medicamentos.



ES 2 372 847 B1

DESCRIPCIÓN

Compuestos útiles como lanzaderas a través de la barrera hematoencefálica y construcciones lanzadera-cargo.

Esta invención se refiere a los campos de la medicina, investigación y diagnóstico, y más específicamente a compuestos nuevos que actúan como lanzaderas a través de la barrera hematoencefálica ("blood brain barrier", BBB) para la liberación de sustancias que no pueden atravesar la BBB por sí mismas. También se refiere a construcciones BBB lanzadera-cargo y a su uso como medicamentos.

10 Estado de la técnica

Muchos de los mayores problemas terapéuticos actuales requieren el tratamiento del cerebro. Esto incluye enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, pero también enfermedades del sistema nervioso central como la esquizofrenia, la epilepsia y el desorden bipolar. También el cáncer cerebral, el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y hasta ciertos aspectos de la obesidad pueden ser incluidas como dianas farmacológicas localizadas dentro del cerebro. En muchos casos hay compuestos prometedores para su tratamiento, pero debido a sus problemas de transporte en la BBB más del 98% de estos medicamentos potenciales no llegan a la etapa de desarrollo.

La BBB es un filtro natural dentro del cuerpo que sólo permite que ciertas sustancias pasen de la sangre al cerebro. Es un mecanismo de defensa natural diseñado para mantener las sustancias nocivas fuera del cerebro. Controla la composición del fluido extracelular del cerebro independiente de las fluctuaciones dentro de la sangre. Es también impermeable para muchos compuestos ambientales y medicamentos.

La base anatómica de la BBB es primeramente las uniones herméticas en las células endoteliales de los microvasos cerebrales. Los microvasos cerebrales forman una membrana continua sin fenestraciones y las uniones herméticas entre ellas son responsables de la alta resistencia eléctrica transendotelial. Transportadores específicos median el acceso de ciertas moléculas importantes para el cerebro, como la glucosa, aminoácidos aislados e iones. Otros compuestos o medicamentos son dependientes de la difusión a través de las bicapas lipídicas de las membranas endoteliales lo que requiere un cierto grado de lipofiliidad de estos compuestos.

Hay diferentes campos terapéuticos donde hay la necesidad de encontrar nuevos medicamentos que puedan cruzar la BBB para llegar a su sitio diana. Por ejemplo, el cerebro podría servir de reservorio oculto para la replicación viral del HIV. El HIV en el cerebro y en el líquido cerebro-espinal podría ser particularmente resistente a la quimioterapia debido al fracaso de los medicamentos anti-retrovirales a penetrar la BBB. El virus puede cruzar la BBB durante la infección primaria o en un estadio tardío. La infección resultante lleva a un número de desórdenes del sistema nervioso central como el complejo de demencia relacionado con el SIDA y la encefalopatía por VIH.

El cáncer cerebral puede ser contado entre las enfermedades más mortales e intratables. En la actualidad el tratamiento del cáncer cerebral consiste en cirugía, radioterapia utilizando rayos X de alta energía u otros tipos de radiación y quimioterapia utilizando medicamentos anticancerígenos o citotóxicos. Estos medicamentos anticancerígenos pueden alcanzar las células cancerígenas donde estén en el cuerpo, pero en el caso de los tumores cerebrales no todos los medicamentos quimioterapéuticos son apropiados, porque la mayoría de medicamentos quimioterapéuticos no pueden cruzar la barrera hematoencefálica (cf. D. Fortín *et al.*, "Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood brain barrier disruption in malignant brain tumors", *Cancer* 2005. vol. 103, pp. 2606-15).

Otro campo de interés son las enfermedades psiquiátricas, como la esquizofrenia. La esquizofrenia afecta a casi un 1% de la población. Aunque medicamentos anti-psicóticos se están utilizando, hay la necesidad de encontrar nuevos y mejores medicamentos sin los efectos secundarios no deseados de los existentes. En la búsqueda de estos medicamentos novedosos la BBB es la barrera que el medicamento necesitará cruzar para llegar a su sitio diana.

Otro campo de interés son las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson es uno de los mayores desórdenes neurodegenerativos, afectando a un 3% de la población mayor de 65 años. Actualmente no hay terapia preventiva para la enfermedad de Parkinson. El tratamiento actual consiste en mejorar los síntomas motores por suplementación del neurotransmisor deficiente dopamina. Como la dopamina no cruza la BBB, desde los años 60 se ha utilizado un precursor de la dopamina, la L-dopa, en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, frecuentemente se observan efectos secundarios severos al cabo de unos pocos años de terapia con L-dopa. La L-dopa cruza la BBB utilizando el transportador de aminoácidos y una vez dentro es transformada a dopamina por la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos.

Por último, otro campo de interés es la epilepsia, un síndrome de disfunciones episódicas del cerebro que afecta a casi un 1% de la población general. Alrededor de un 30% de las epilepsias se clasifican como sintomáticas ya que son asociadas a una lesión identificable del sistema nervioso central, mientras que el resto de ellas no tienen causas identificadas. La terapia médica actual para la epilepsia es en gran parte sintomática y esta dirigida a controlar los ataques en individuos afectados. Si los medicamentos antiepilépticos fallan, la lobectomía temporal, una operación que implica extirpar la región del cerebro donde se originan los ataques, proporciona un tratamiento alternativo. Esta operación es muy exitosa en la mayoría de los casos, pero falla en algunos, y además muchos individuos son reacios a someterse a cirugía que implique extirpar partes del cerebro.

En todos estos casos, se conocen muchos compuestos prometedores para su tratamiento, aunque, debido a sus problemas de transporte en la BBB, no se desarrollan más. La investigación en estos campos ha seguido varias aproximaciones.

Algunos métodos de administración de medicamentos al cerebro sea para terapia o diagnosis son técnicas invasivas, como la administración intracraneal, la administración por alteración de la integridad de la BBB o la disrupción osmótica. Estos métodos implican riesgo de infección y toxicidad, y además requieren un personal cualificado.

Otra aproximación es la modificación del medicamento. Estas modificaciones incluyen por ejemplo la reducción del tamaño del medicamento o el incremento de la lipofilicidad del medicamento, pero no es siempre posible introducir estas modificaciones. En el caso de introducir una modificación irreversible es necesario que no altere la actividad del medicamento una vez llegue al sitio diana. En el caso de una modificación bioreversible, es necesario encontrar un enzima o proceso químico que recupere el medicamento activo una vez el profármaco está dentro del sistema nervioso central.

Otra aproximación es la administración por conjugación a un portador biológico. Estas estrategias usan anticuerpos monoclonales ("Monoclonal anti-bodies", Mab) que se unen al receptor de transferrina y sufren una endocitosis mediada por receptor a modo de caballos de Troya moleculares de los compuestos con un uso terapéutico que no pueden cruzar la BBB por sí mismos.

Finalmente, otra aproximación comprende una estrategia mediada por un vector peptídico en la que fármacos no transportados se unen a péptidos que tienen la capacidad de cruzar la BBB. C. Rousselle *et al.*, en *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005 vol. 313, pp. 712-719, revelan su uso para mejorar la absorción al cerebro de varios fármacos, como la doxorubicina, penicilina, dalargin análogo de encefalina, paclitaxel y morfina-6-glucurónido. En algunos casos, esta conjugación incluso aumentó la solubilidad del fármaco y bordeó la P-glicoproteína, en consecuencia descartando la necesidad de solubilizantes, que pueden causar efectos secundarios, e inhibidores de P-gp, que limitan la aplicación clínica de fármacos.

WO 2008/025867 describe varios compuestos dicetopiperazinas que actúan como vehículos para la entrega de principios activos farmacéuticos a través de la BBB debido a que tienen la capacidad de llevar al cerebro por difusión pasiva fármacos sin la capacidad de pasar la BBB. También describe las construcciones lanzadera para liberación de cargos que transportan por ejemplo fármacos a través de la membrana PAMPA, un modelo *in vitro* de BBB.

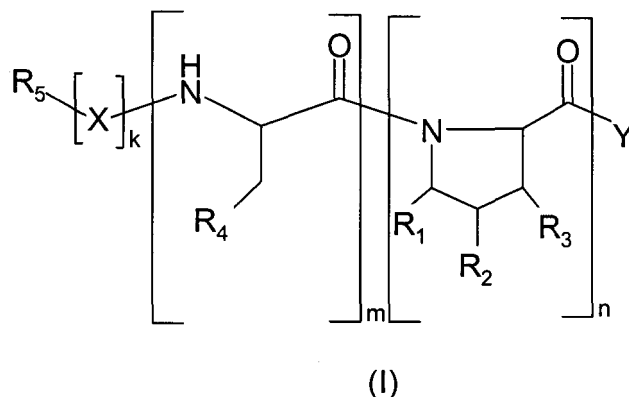
Finalmente, M. Malakoutikhah *et al.*, en *J. Med. Chem.* 2008, vol. 51, pp. 4881-4889, describe el uso de tres péptidos ricos en *N*-MePhe, *N*-MePhe-(*N*-MePhe)₃-CONH₂, Cha-(*N*-MePhe)₃-CONH₂ y 2Nal-(*N*-MePhe)₃-CONH₂ como portadores que pasan a través de un modelo de barrera hematoencefálica por difusión pasiva. Además, M. Malakoutikhah *et al.*, en *J. Med. Chem.* 2010, vol. 53, pp. 2354-2363, describe el uso de los péptidos anteriores para transportar a través de la barrera PAMPA una serie de fármacos no relacionados estructuralmente como el ácido 4-aminobutanoico (GABA), ácido nipecótico (Nip) y el ácido 5-aminolevulínico (ALA). Desafortunadamente, estas BBB-lanzaderas muestran una muy baja solubilidad en agua, una propiedad que influye en las dosis a administrar.

Así, a pesar de todos los esfuerzos en investigación invertidos en el pasado, todavía es deseable encontrar compuestos con utilidad farmacológica o de diagnóstico que puedan atravesar la BBB.

Explicación de la invención

Los inventores han encontrado nuevos compuestos, a los que se hace referencia como compuestos "lanzadera", los cuales tienen la habilidad de atravesar la BBB y son capaces de introducir en el cerebro fármacos u otras sustancias útiles para el diagnóstico, a las que se hace referencia como "cargos", que no pueden atravesar la BBB por sí mismas. Los compuestos lanzadera son biodegradables y biocompatibles, no tienen toxicidad intrínseca ni antigenicidad, ya que están hechos de aminoácidos. También muestran una permeabilidad mejorada y un transporte alto. Además, las lanzaderas de la presente invención muestran una buena solubilidad en agua. Esta propiedad permite mejorar la dosis administrada, ya que será menor la cantidad de solución que contiene la construcción a ser administrada.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a proporcionar compuestos lanzadera de fórmula (I), o sus sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo estereoisómeros o mezclas de estereoisómeros,



donde R_1 , R_2 y R_3 son independientemente seleccionados entre el grupo formado por: H y $(CH_2)_q-R_6$; R_4 es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos con 1-4 anillos; los anillos siendo saturados, parcialmente insaturados o aromáticos; los anillos siendo aislados o parcialmente/totalmente fusionados y teniendo 5-6 miembros; cada miembro siendo independientemente seleccionado entre C, CH, CH_2 , N, NH, O y S; los átomos de hidrógeno de estos miembros estando opcionalmente sustituidos por sustituyentes seleccionados entre (C_1-C_6) -alquilo, (C_1-C_6) -alcoxilo y halógeno; R_5 es H o CH_3CO- ; R_6 es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos con 1-2 anillos; los anillos siendo saturados, parcialmente insaturados o aromáticos; los anillos siendo aislados o parcialmente/totalmente fusionados y teniendo 5-6 miembros; cada miembro siendo independientemente seleccionado entre C, CH, CH_2 , N, NH, O y S; los átomos de hidrógeno de estos miembros estando opcionalmente sustituidos por sustituyentes seleccionados entre (C_1-C_6) -alquilo, (C_1-C_6) -alcoxilo, y halógeno; X es un birradical seleccionado entre el grupo formado por $-NH-(CH_2)_r-CO-$, $-CO(CH_2)_r-CO-$, $-S-(CH_2)_r-$, $-S-(CH_2)_r-CO-$, $-O-(CH_2)_r-$ y $-O-(CH_2)_r-CO-$; Y se selecciona entre el grupo formado por $-NH_2$, $-OH$, $-OR_7$ y $-NHR_7$; k es un entero de 0 a 2; m es un entero de 0 a 1; n es un entero de 2 a 10; q es un entero de 0 a 1; r es un entero de 1 a 3; R_7 es un radical (C_1-C_6) -alquilo; con la condición de que al menos un radical R seleccionado entre R_1 , R_2 , y R_3 es un radical $(CH_2)_q-R_6$.

El birradical X está unido a R_5 y al NH de la manera siguiente: $R_5-NH-(CH_2)_r-CO-NH-$, $R_5-CO(CH_2)_r-CO-NH-$, $R_5-S-(CH_2)_r-NH-$, $R_5-S-(CH_2)_r-CO-NH-$; $R_5-O-(CH_2)_r-NH-$ y $R_5-O-(CH_2)_r-CO-NH-$.

Por "sistema de anillo conocido" se entiende un sistema de anillo descrito en el estado de la técnica, lo que implica que su estructura es químicamente factible.

Los compuestos de fórmula (I) o sus sales pueden existir en forma solvatada, así como en formas no solvatadas, incluyendo formas hidratadas. Así, pueden contener en su estructura cantidades estequiométricas de disolvente en el caso de solvatos, o de agua en el caso de hidratos. Se debe entender que esta invención engloba todas las formas solvatadas, así como las no solvatadas. La obtención de solvatos e hidratos depende del disolvente utilizado y de las condiciones de cristalización que pueden ser determinadas por la persona experta en la materia.

Preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde n es un entero de 2 a 6, más preferiblemente de 2 a 5, y aún más preferiblemente de 2 a 4.

En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde Y es $-NH_2$, $-OH$ o $-NHR_7$. En otra realización más preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde Y es $-NH_2$.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde los miembros de los anillos en R_6 , en R_4 , o tanto en R_6 como en R_4 son seleccionados entre C, CH y CH_2 .

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde R_6 es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos con 1-2 anillos que son aromáticos.

Preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde R_1 , R_2 y R_3 son independientemente seleccionados del grupo que consiste en H, fenilo, ciclohexilo y 2-naftilo.

En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde R_1 y R_2 son H, y R_3 es un radical $(CH_2)_q-R_6$. En una realización más preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde R_3 es fenilo, ciclohexilo o 2-naftilo. En una realización aún más preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde R_3 es fenilo.

Preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde R_4 se selecciona del grupo que consiste en fenilo, ciclohexilo y 2-naftilo. Los compuestos preferidos de fórmula (I) de los mencionados anteriormente son aquéllos donde R_4 es ciclohexilo o 2-naftilo.

En una realización particular, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan entre los mencionados anteriormente donde m es 1. En otra realización particular, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan entre los mencionados anteriormente donde m es 0.

Preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) son aquéllos donde k es 0 o 1.

Los compuestos más preferidos de fórmula (I) son aquéllos que son seleccionados de la lista siguiente:

Ac-PhPro-(PhPro)₃-CONH₂;

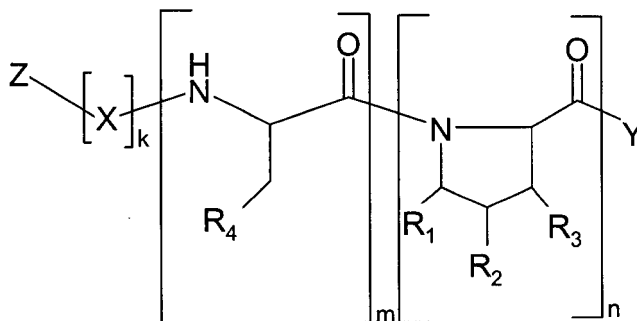
Ac-Cha-(PhPro)₃-CONH₂; y

Ac-2Nal-(PhPro)₃-CONH₂.

Los compuestos de fórmula (I) tienen la capacidad de transportar al cerebro sustancias, a las que se hace referencia como cargos, que no pueden atravesar la BBB por sí mismas. Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso de estos compuestos de fórmula (I) como BBB-lanzaderas. El uso de estos compuestos hace posible por ejemplo que la investigación de nuevos fármacos no esté limitada sólo a compuestos que pueden atravesar la BBB por sí mismos. Tal como se ilustra mediante ejemplos comparativos, los compuestos de fórmula (I) son mejores lanzaderas BBB que los compuestos más próximos del estado de la técnica.

El mecanismo de transporte a través de la BBB de los compuestos de fórmula (I) es por difusión pasiva, y este mecanismo es independiente de la configuración L o D de los aminoácidos. Así, una de las principales ventajas de los compuestos de fórmula (I) es que se pueden preparar a partir de L o D aminoácidos o incluso de mezclas racémicas. Esto aumenta la vida media de las construcciones en el cuerpo, evitando la degradación por diferentes peptidasas en la sangre o asociadas con los microvasos cerebrales.

Los compuestos de fórmula (I) tienen grupos funcionales apropiados para la unión covalente de cargos manteniendo la actividad original del cargo, hasta que alcanza el lugar de acción. Así, otro aspecto de la presente invención es proporcionar construcciones de fórmula (II), o sus sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo cualquier estereoisómero o mezclas de estereoisómeros, a las que se hace referencia como construcciones BBB lanzadera-cargo,



(II)

donde: R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X , Y , k , m , y n son como se definen anteriormente; y Z es un radical derivado de una sustancia susceptible de formar un enlace amida o un enlace éster o un enlace disulfuro con X , dicha sustancia siendo incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) por sí misma.

Los valores preferidos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X , Y , k , m , y n para el compuesto de fórmula (I) son también valores preferidos para la construcción de fórmula (II).

Las sustancias de las que deriva el radical Z incluyen una gran variedad de sustancias que tienen utilidad farmacológica o de diagnóstico. Estas sustancias puede ser principios activos farmacéuticos, en particular agentes antiretrovirales, agentes anticancerígenos, agentes anti-psicóticos, agentes antineurodegenerativos o agentes antiepilépticos. Ejemplos de principios activos farmacéuticos son ácido nipecótico y dopamina. La dopamina es un neurotransmisor clave en el sistema nervioso central, en particular, la disminución de la dopamina estriatal se asocia con condiciones clínicas del parkinsonismo. El ácido nipecótico es uno de los más potentes inhibidores de la recaptación de GABA y también un agonista del receptor de GABA. Sin embargo, no penetra la BBB.

Ambos compuestos muestran propiedades interesantes pero no pueden atravesar la barrera hematoencefálica. En particular, como se ilustra en los ejemplos, las construcciones de fórmula (II) permiten que tanto la dopamina como el ácido nípecóico puedan ser útiles como fármacos evitando los efectos secundarios de la terapia actual, y siendo una técnica sencilla y no invasiva comparada con las existentes.

Las sustancias de las que deriva Z también incluyen otras sustancias que sería interesante transportar al cerebro pero que no lo hacen de manera adecuada solas, por ejemplo agentes de contraste para resonancia magnética nuclear ("Magnetic Resonance Imaging", MRI). Entre los aparatos clínicos utilizados para diagnosticar cáncer, MRI destaca como una potente modalidad de obtención de imágenes no invasiva ni destructiva que proporciona imágenes internas de organismos vivos sin límite de profundidad del análisis y con una resolución de 10-100 μm . Es una técnica muy valiosa ampliamente utilizada en investigación y diagnóstico de cáncer. Para llevar a cabo la MRI se necesitan agentes de contraste. Los agentes de contraste se pueden utilizar como métodos de diagnóstico para enfermedades del sistema nervioso central tales como la enfermedad de Alzheimer, el cáncer cerebral, o como herramienta para una exploración pre-operativa con MRI que guiará al cirujano. En todos estos casos el agente de contraste utilizado necesita atravesar la BBB. Ejemplos de agentes de contraste incluyen nanopartículas magnéticas tales como nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético. Otros agentes de diagnóstico incluyen colorantes o sondas fluorescentes tales como la carboxifluoresceína y derivados, el amarillo lucifer, la rodamina o el rojo Texas.

Los compuestos lanzadera de fórmula (I) pueden estar formados por aminoácidos naturales y no-naturales y/o sus derivados. Los compuestos de fórmula (I) y las construcciones lanzadera-cargo de fórmula (II) se pueden generar total o parcialmente por síntesis química. Aminoácidos apropiados para la preparación de compuestos de fórmula (I) son disponibles comercialmente. Los compuestos de fórmula (I) y las construcciones de fórmula (II) se pueden preparar fácilmente, por ejemplo, según síntesis en fase líquida o, preferiblemente, métodos de síntesis de péptidos en fase sólida, de los cuales descripciones generales son ampliamente disponibles (cf. p. ej. M. Amblard, *et al.*, "Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis". *Molecular Biotechnology* 2006, vol. 33, pp. 239-254); o se pueden preparar en solución por métodos de fase líquida o por cualquier combinación de fase sólida, fase líquida y química en solución. Por ejemplo, primero completando la porción BBB-lanzadera y entonces después de eliminar cualquiera de los grupos protectores si están presente, por introducción del cargo en solución.

Otro aspecto de la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de las construcciones lanzadera-cargo de fórmula (II) junto con cantidades apropiadas de excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. La persona experta en la materia escogerá la vía de administración adecuada mediante métodos usuales. La cantidad de la construcción a ser administrada, la velocidad y el tiempo de administración, dependerá de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando. La naturaleza precisa del portador u otros excipientes dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral, nasal o por inyección, p. ej. cutánea, subcutánea o intravenosa.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa aquí, se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar en cierto grado, uno o más de los síntomas de la enfermedad a la que se dirige. La dosis particular de compuesto administrado según esta invención será por supuesto determinada por las condiciones particulares que rodean el caso, incluyendo el compuesto administrado, la ruta de administración, la condición particular que se está tratando, y las consideraciones similares.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto descrito aquí con otros componentes químicos, como diluyentes o portadores. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo.

Los términos "excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables" se refieren a material farmacéuticamente aceptable, composición o vehículo. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. Debe ser también apto para el uso en contacto con tejidos o órganos de humanos y animales sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Una composición que comprende una construcción según la presente invención se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, tanto simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la condición a tratar.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a las construcciones de la presente invención para uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención refiere a las construcciones de fórmula (II) donde Z es un radical de dopamina para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Este aspecto también puede ser formulado como el uso de las construcciones de fórmula (II) donde Z es un radical de dopamina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto, este aspecto también está relacionado con un método de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero, incluyendo un humano, que padece o es susceptible de padecer la enfermedad Parkinson, dicho método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (II) con Z derivado de dopamina, junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la invención refiere a las construcciones de fórmula (II) donde Z es un radical del ácido nipecótico para el uso como anticonvulsivo.

Los anticonvulsivos son fármacos usados en el tratamiento de las convulsiones epilépticas, o el desorden bipolar. Este aspecto también puede ser formulado como el uso de las construcciones de fórmula (II) donde Z es un radical del ácido nipecótico para la preparación de un medicamento para el tratamiento de convulsiones o enfermedades que producen convulsiones. Por lo tanto, este aspecto también está relacionado con un método de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero, incluyendo un humano, que padece o es susceptible de padecer convulsiones, dicho método comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (II) con Z derivado del ácido nipecótico, junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

20 Exposición detallada de modos de realización

Los aminoácidos protegidos, espaciadores bifuncionales y resinas fueron suministrados por: Luxembourg Industries (Tel-Aviv, Israel), Neosystem (Strasbourg, Francia), Calbiochem-Novabiochem AG (Laüfelfingen, Suiza), Bachem AG (Bubendorf, Suiza) o Iris Biotech (Marktredwitz, Alemania). Otros reactivos y solventes utilizados se resumen en la Tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Suministradores comerciales y reactivos utilizados. El DCM fue pasado por una columna de Al_2O_3 . La DMF se guardó sobre tamiz molecular de 4Å y nitrógeno se burbujeó para eliminar los agentes volátiles

Suministrador Comercial	Reactivos y disolventes
Albatros Chem. Inc.	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol (HOBt)
Aldrich	dopamina, L-dopa, piperidina, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACH), DOWEX MR-3 Mixed Bed, rojo disperso I, etil diazoacetato, 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-ene (DBU), propranolol, carbamazepina
Applied Biosystems	hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi) tris(pirrolidin) fosfonio (PyAOP)
Applied GL Biochem Shanghai	1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt)
Avantis	Extracto polar de lípidos de cerebro porcino (PBLEP)
Fluka	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina (DIEA), ninhidrina, 1-propanol, Fmoc-L-Nip-COOH, ácido nipecótico
Jescuder	NaOH
KaliChemie	ácido trifluoroacético (TFA)
Merck	tamiz Molecular 4Å, láminas para cromatografía en capa fina (TLC)
Millipore	Filtros de polivinilidina difluoruro (PVDF) 0.45 μ m
Novabiochem	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tris(pirrolidin) fosfonio (PyBOP)
pION	placas de PAMPA, solución sistema para PAMPA
Scharlau	diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), MeOH, tert-butilmetiléter (TBME), <i>N</i> -metil pirrolidona (NMP),
SDS	Acetona, MeCN, tolueno

Consideraciones generales sobre la síntesis. La elongación del péptido en fase sólida y otras manipulaciones en fase sólida se realizaron manualmente en jeringas de polipropileno provistas de un disco poroso de polietileno. Los disolventes y reactivos solubles se eliminaron por succión. Los lavados entre las diferentes etapas sintéticas se realizaron con dimetilformamida (DMF) (5×0.5 min) y diclorometano (DCM) (5×0.5 min) utilizando 10 mL de disolvente/g de resina cada vez.

Tests identificativos. Los tests utilizados para la identificación y control de las síntesis fueron los siguientes: A) Ensayo colorimétrico de Kaiser para la detección en fase sólida de aminas primarias unidas (cf: E. Kaiser *et al.*, “Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides”; *Anal. Biochem.* 1970. vol. 34, pp. 595-598); B) Test de De Clercq para aminas secundarias unidas a fase sólida (cf. A. Madder *et al.*, “A novel sensitive colorimetric assay for visual detection of solid-phase bound amines”. *Eur. J. Org. Chem.* 1999. pp. 2787-2791). El ensayo de De Clercq se realiza lavando primero una pequeña muestra de la resina (aprox. 1 mg) con DMF (4x1 minutos) y DCM (4x1 minutos). A la resina se le añaden diez gotas de solución del reactivo (0.002 M *p*-nitrofenil éster de rojo disperso 1 en MeCN) y la mezcla resultante se calienta a 70°C durante 10 minutos. La solución es entonces decantada y la resina lavada con DMF hasta que se obtiene un sobrenadante transparente. La presencia de aminas secundarias es indicada por bolas de resina de color rojo.

Protocolos utilizados durante la síntesis de las construcciones de fórmula (II); Fueron sintetizadas en una escala de 100 μ moles utilizando los siguientes métodos y protocolos;

Condicionado inicial de la resina. La resina Sieber se condicionó por lavado con DCM (5 $\times$ 30 s) y DMF (5 $\times$ 30 s) seguida por una solución 20% piperidina en DMF (2 $\times$ 1 min y 1 $\times$ 10 min) para eliminar el grupo Fmoc. Finalmente, la resina se lavó con DMF (5 $\times$ 30 s).

Eliminación del grupo Fmoc. La eliminación del grupo protector 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) se hizo con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

Métodos de acoplamiento

Acoplamiento del primer aminoácido a la resina Sieber: Se añadieron secuencialmente el aminoácido N-prottegido (4 eq), PyBOP (4 eq) y HOAt (12 eq) a la resina en DMF seguidos de DIEA (12 eq). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión; la resina se lavó con DMF (5 $\times$ 30 s) y DCM (5 $\times$ 30 s). La extensión del acoplamiento fue comprobada por el ensayo colorimétrico de ninhidrina.

Acoplamiento del segundo aminoácido y los siguientes aminoácidos a la resina Sieber: El procedimiento fue el mismo que para el primero, excepto que el acoplamiento se repitió dos veces más y la extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq.

Acoplamiento del cargo. Dependiendo de la naturaleza del cargo, estará unido a la BBB lanzadera a través de diferentes tipos de enlaces químicos.

Para cargos con un grupo COOH (p. ej. ácido nipecótico, L-dopa): Se utilizó la correspondiente BBB lanzadera provista con un grupo NH₂ y se hizo reaccionar con 5 equiv. de Cargo-COOH, utilizando 5 equiv. hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-*N*-oxi-tris(pirrolidin)fosfonio (PyBOP) y 15 equiv. 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) como reactivos de acoplamiento y 15 equiv. de *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) como base en DMF durante 2 h. La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó con DMF (5 $\times$ 30 s) y DCM (5 $\times$ 30 s). El acoplamiento se repitió 2 veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq o el ensayo colorimétrico de ninhidrina.

Acetilación del aminoácido N-terminal: En algunos casos la acetilación se realizó en fase sólida utilizando un protocolo estándar de Ac₂O (50 equiv) y DIEA (50 equiv) durante 20 min.

Etapas de escisión: Se realizó por tratamiento de la resina con TFA 2% en DCM (6 $\times$ 3 min). El filtrado se colectó y el DCM se evaporó bajo N₂. El residuo se disolvió en H₂O: MeCN (1:1) y se liofilizó.

La identidad de los diferentes compuestos sintetizados se confirmó utilizando la espectrometría de masas “Matrix Assisted Láser Desorption/Ionization” (MALDI) (Instrumento: MALDI Voyager DE RP time-of-flight (TOF) PE Biosystem) o HPLC-MS (Instrumento: Waters modelo Alliance 2796, bomba cuaternaria, detector UV/Vis modelo 2487, ESI-MS modelo Micromass ZQ y software Masslynx versión 4.0) utilizando una columna Symmetry 300 C₁₈ (150 $\times$ 3.9 mm $\times$ 5 μ m), 300 Å. 1 mL/min flujo, solventes: A: H₂O con 0.1% ácido fórmico; B: MeCN con 0.07% ácido fórmico. Su pureza se controló por HPLC de fase inversa utilizando una columna Symmetry C₁₈ (150 $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m, 100 Å, Waters) y una columna Sunfire C18 (100 $\times$ 4.6 mm $\times$ 3.5 μ m, 100 Å, Waters), 1 mL/min flujo, solventes: A: H₂O con 0.045% TFA; B: MeCN con 0.036% TFA. Instrumento: Waters modelo Alliance 2695 formado por una bomba cuaternaria, un detector diodo array modelo 966, controlado por el software Millenium versión 3.5.

Los compuestos se purificaron si fue necesario por HPLC fase inversa utilizando una columna Symmetry C₁₈ (100 $\times$ 30 mm $\times$ 5 μ m, 100 Å, Waters), 10 mL/min flujo, disolventes: A: H₂O con 0.1% TFA; B: MeCN con 0.1% TFA, Instrumento: Waters system con una bomba cuaternaria, autoinjector Simple Manager 2700, detector UV/Vis modelo 2487 y un Fraction collector II, controlado por el software Masslynx versión 3.5.

Ejemplos

En los ejemplos siguientes se han utilizado L-aminoácidos excepto para Fmoc-PhPro-COOH que se ha usado como mezcla racémica.

Ejemplo 1

Preparación de compuestos de fórmula (I): Ac-PhPro-(PhPro)₃-CONH₂ (Ia); Ac-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ (Ib), y Ac-2Nal-(PhPro)₃-CONH₂ (Ic)

La síntesis se realizó en una escala 100 μ moles. Para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina Sieber se utilizó el siguiente protocolo: Derivado de aminoácido del primer aminoácido (Fmoc-PhPro-OH, 4 equiv., 400 μ moles, 165 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) se añadieron secuencialmente a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo. La extensión del acoplamiento se comprobó por el ensayo colorimétrico de ninhidrina. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-PhPro-OH, 4 equiv., 400 μ moles, 165 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. Se eliminó el disolvente por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias. El mismo protocolo se utilizó para acoplar el tercer derivado de aminoácido.

Para el acoplamiento del cuarto derivado de aminoácido se utilizó el siguiente protocolo: se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido 4 equiv., 400 μ moles (Fmoc-PhPro-OH, 165 mg) (Fmoc-Cha-OH, 157 mg) o (Fmoc-2Nal-OH, 175 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. En el caso de PhPro, se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

La acetilación se realizó en fase sólida utilizando un protocolo estándar de Ac₂O (50 equiv., 5 mmols, 471 μ L) y DIEA (50 equiv., 5 mmols, 850 μ L) durante 20 min. La etapa de escisión se realizó por tratamiento de la resina con TFA 2% en DCM (6 $\times$ 3 min). El filtrado se colectó y el DCM se evaporó bajo N₂. El residuo se disolvió en H₂O: MeCN (1:1) y se liofilizó. Para eliminar las sales se realizó un paso de desalado utilizando la resina DOWEX MR-3 Mixed Bed toda la noche.

Caracterización del producto: HPLC de fase inversa: gradiente lineal de 50 a 80% MeCN en 15 minutos utilizando una columna Symmetry C₁₈ (150 $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m, 100 Å, Waters), Compuesto (Ia): Ac-PhPro-(PhPro)₃-CONH₂ tr: 3-9 min (diastereómeros); Compuesto (Ib): Ac-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ tr: 4-10.1 min (diastereómeros); Compuesto (Ic): Ac-2Nal-(PhPro)₃-CONH₂ 6.5-13.3 min (diastereómeros). Espectrometría de masas (MALDI-TOF): Compuesto (Ia): Ac-PhPro-(PhPro)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 774.3; Compuesto (Ib): Ac-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 754.4; Compuesto (Ic): Ac-2Nal-(PhPro)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 798.3. Rendimiento: Compuesto (Ia): Ac-PhPro-(PhPro)₃-CONH₂ 65%; Compuesto (Ib): Ac-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ 63.7%; Compuesto (Ic): Ac-2Nal-(PhPro)₃-CONH₂ 49.8%.

Ejemplo 2

Preparación del compuesto de fórmula (II) con Z derivado de ácido nipecótico: Nip-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ (IIa)

La síntesis se realizó en una escala 100 μ moles. Para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina Sieber se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el derivado de aminoácido del primer aminoácido (Fmoc-PhPro-OH, 4 equiv., 400 μ moles, 165 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo. La extensión del acoplamiento se comprobó por el ensayo colorimétrico de ninhidrina. El grupo

Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 × 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-PhPro-OH, 4 equiv., 400 μ mol, 165 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmol, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmol, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 × 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias. El mismo protocolo se utilizó para acoplar el tercer derivado de aminoácido.

Para el acoplamiento del cuarto derivado de aminoácido se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-Cha-OH, 4 equiv., 400 μ mol, 157 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmol, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmol, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina lavada a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno.

Para el acoplamiento del cargo (ácido nipecótico) a la BBB-lanzadera anclada a la resina se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el Cargo-COOH (Fmoc-L-Nip-OH) (4 equiv., 400 μ mol, 140 mg) en DMF (1-3 ml/g resina), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmol, 163 mg) a la resina seguido de 12 equiv. DIEA (1.2 mmol, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 2 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió una vez. La extensión del acoplamiento se controló por el test de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno.

La etapa de escisión se realizó por tratamiento de la resina con TFA 2% en DCM (6 × 3 min). El filtrado se colectó y el DCM se evaporó bajo N_2 . El residuo se disolvió en H_2O : MeCN (1:1) y se liofilizó.

Caracterización del producto: HPLC de fase inversa: gradiente lineal de 30 a 60% MeCN en 8 minutos utilizando una columna Sunfire C_{18} (100 × 4.6 mm × 3.5 μ m, 100 Å, Waters), Nip-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ tr: 3.9-7.3 min (diastereómeros). Espectrometría de masas (MALDI-TOF): Nip-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ (M+H)⁺: 801.5. Rendimiento: Nip-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ 65%.

Ejemplo 3

Preparación del compuesto de fórmula (II) con Z derivado de Levodopa: L-Dopa-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ (IIb)

La síntesis se realizó en una escala 100 μ moles. Para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina Sieber se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el derivado de aminoácido del primer aminoácido (Fmoc-PhPro-OH, 4 equiv., 400 μ mol, 165 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmol, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmol, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo. La extensión del acoplamiento se comprobó por el ensayo colorimétrico de ninhidrina. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 × 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-PhPro-OH, 4 equiv., 400 μ mol, 165 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmol, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmol, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El solvente fue entonces eliminado por succión, la resina lavada a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 × 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias. El mismo protocolo se utilizó para acoplar el tercer derivado de aminoácido.

Para el acoplamiento del cuarto derivado de aminoácido se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-Cha-OH, 4 equiv., 400 μ mol, 157 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg)

y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno.

Para el acoplamiento del cargo (levodopa) a la BBB-lanzadera anclada a la resina se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el Cargo-COOH (Fmoc-L-Dopa-OH) (4 equiv., 400 μ mol, 167 mg) en DMF (1-3 mL/g resina), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) a la resina seguido de 12 equiv. DIEA (1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 2 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió una vez. La extensión del acoplamiento se controló por el test de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno.

La etapa de escisión se realizó por tratamiento de la resina con TFA 2% en DCM (6 $\times$ 3 min). El filtrado se colectó y el DCM se evaporó bajo N₂. El residuo se disolvió en H₂O: MeCN (1:1) y se liofilizó.

Caracterización del producto: HPLC de fase inversa: gradiente lineal de 30 a 60% MeCN en 8 minutos utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 $\times$ 4.6 mm $\times$ 3.5 μ m, 100 Å, Waters), L-Dopa-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ tr: 3.8-7.5 min (diastereómeros). Espectrometría de masas (MALDI-TOF): L-Dopa-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 891.5. Rendimiento: L-Dopa-Cha-(PhPro)₃-CONH₂ 63.7%.

Ejemplo Comparativo 1

Preparación de Ac-(N-Me-Phe)₄-CONH₂

La síntesis se realizó en una escala 100 μ moles. Para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina Sieber se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el derivado de aminoácido del primer aminoácido (Fmoc-N-Me-Phe-OH, 4 equiv., 400 μ mol, 161 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo. La extensión del acoplamiento se comprobó por el ensayo colorimétrico de ninhidrina. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-N-Me-Phe-OH, 4 equiv., 400 μ mol, 161 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias. El mismo protocolo se utilizó para acoplar el tercer y cuarto derivado de aminoácido.

La acetilación se realizó en fase sólida utilizando un protocolo estándar de Ac₂O (50 equiv., 5 mmols, 471 μ L) y DIEA (50 equiv., 5 mmols, 850 μ L) durante 20 min. La etapa de escisión se realizó por tratamiento de la resina con TFA 2% en DCM (6 $\times$ 3 min). El filtrado se colectó y el DCM se evaporó bajo N₂. El residuo se disolvió en H₂O: MeCN (1:1) y se liofilizó. Para eliminar las sales se realizó un paso de desalado utilizando la resina DOWEX MR-3 Mixed Bed toda la noche.

Caracterización del producto: HPLC de fase inversa: gradiente lineal de 0 a 100% MeCN en 15 minutos utilizando una columna Symmetry C₁₈ (150 $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m, 100 Å, Waters), Ac-(N-Me-Phe)₄-CONH₂ tr: 12.2 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): Ac-(N-Me-Phe)₄-CONH₂ (M+Na)⁺: 726.9. Rendimiento: Ac-(N-Me-Phe)₄-CONH₂ 32.8%.

Ejemplo Comparativo 2

Preparación de Ac-(Pro)₄-CONH₂

La síntesis se realizó en una escala 100 μ moles. Para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina sieber se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el derivado de aminoácido del primer aminoácido (Fmoc-Pro-OH, 4 equiv., 400 μ mol, 135 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mol, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163

mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo. La extensión del acoplamiento se comprobó por el ensayo colorimétrico de ninhidrina. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-Pro-OH, 4 equiv., 400 μ mols, 135 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mols, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias. El mismo protocolo se utilizó para acoplar el tercer y cuarto derivado de aminoácido.

La acetilación se realizó en fase sólida utilizando un protocolo estándar de Ac₂O (50 equiv., 5 mmols, 471 μ L) y DIEA (50 equiv., 5 mmols, 850 μ L) durante 20 min. La etapa de escisión se realizó por tratamiento de la resina con TFA 2% en DCM (6 $\times$ 3 min). El filtrado se colectó y el DCM se evaporó bajo N₂. El residuo se disolvió en H₂O: MeCN (1:1) y se liofilizó. Para eliminar las sales se realizó un paso de desalado utilizando la resina DOWEX MR-3 Mixed Bed toda la noche.

Caracterización del producto: HPLC de fase inversa: gradiente lineal de 0 a 100% MeCN en 15 minutos utilizando una columna Symmetry C₁₈ (150 $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m, 100 Å, Waters), Ac-(Pro)₄-CONH₂ tr: 5.4 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): Ac-(Pro)₄-CONH₂ (M+Na)⁺: 470.2. Rendimiento: Ac-(Pro)₄-CONH₂ 15.2%.

Ejemplo Comparativo 3

Preparación de Ac-Cha-(N-Me-Phe)₃-CONH₂

La síntesis se realizó en una escala 100 μ moles. Para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina sieber se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el derivado de aminoácido del primer aminoácido (Fmoc-N-Me-Phe-OH, 4 equiv., 400 μ mols, 161 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mols, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo. La extensión del acoplamiento se comprobó por el ensayo colorimétrico de ninhidrina. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-N-Me-Phe-OH, 4 equiv., 400 μ mols, 161 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mols, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias. El mismo protocolo se utilizó para acoplar el tercer derivado de aminoácido.

Para el acoplamiento del cuarto derivado de aminoácido se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-Cha-OH, 4 equiv., 400 μ mols, 157 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ mols, 208 mg) C y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno.

La acetilación se realizó en fase sólida utilizando un protocolo estándar de Ac₂O (50 equiv., 5 mmols, 471 μ L) y DIEA (50 equiv., 5 mmols, 850 μ L) durante 20 min. La etapa de escisión se realizó por tratamiento de la resina con TFA 2% en DCM (6 $\times$ 3 min). El filtrado se colectó y el DCM se evaporó bajo N₂. El residuo se disolvió en H₂O: MeCN (1:1) y se liofilizó. Para eliminar las sales se realizó un paso de desalado utilizando la resina DOWEX MR-3 Mixed Bed toda la noche.

Caracterización del producto: HPLC de fase inversa: gradiente lineal de 0 a 100% MeCN en 15 minutos utilizando una columna Symmetry C₁₈ (150 × 4.6 mm × 5 μm, 100 Å, Waters), Ac-Cha-(N-Me-Phe)₃-CONH₂ tr: 12.9 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): Ac-Cha-(N-Me-Phe)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 718.4. Rendimiento: Ac-Cha-(N-Me-Phe)₃-CONH₂ 11.8%.

Ejemplo Comparativo 4

Preparación de L-Dopa-P-(N-MePhe)₃-CONH₂ (P= N-MePhe, Cha y 2Nal)

La síntesis se realizó en una escala 100 μmoles. Para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina sieber se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el derivado de aminoácido del primer aminoácido (Fmoc-N-MePhe-OH, 4 equiv., 400 μmoles, 161 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μmoles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μL). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo. La extensión del acoplamiento se comprobó por el ensayo colorimétrico de ninhidrina. El grupo Fmoc fue eliminado con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 × 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-N-MePhe-OH, 4 equiv., 400 μmoles, 161 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μmoles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μL). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 × 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias. El mismo protocolo se utilizó para acoplar el tercer derivado de aminoácido.

Para el acoplamiento del cuarto derivado de aminoácido se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido 4 equiv., 400 μmoles (Fmoc-N-MePhe-OH, 161 mg) (Fmoc-Cha-OH, 157 mg) o (Fmoc-2Nal-OH, 175 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μmoles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μL). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. En el caso de N-MePhe, se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 × 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

Para el acoplamiento del cargo (levodopa) a la resina se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el cargo-COOH (Fmoc-L-Dopa-OH) (4 equiv., 400 μmoles, 167 mg) en DMF (1-3 mL/g resina), PyBOP (4 equiv., 400 μmoles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) a la resina seguido de 12 equiv. DIEA (1.2 mmols, 204 μL). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 2 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió una vez. La extensión del acoplamiento se controló por el test de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno.

La etapa de escisión se realizó por tratamiento de la resina con TFA 2% en DCM (6 × 3 min). El filtrado se colectó y el DCM se evaporó bajo N₂. El residuo se disolvió en H₂O: MeCN (1:1) y liofilizado.

Caracterización del producto: HPLC de fase inversa: gradiente lineal de 0 a 100% MeCN en 15 minutos utilizando una columna Symmetry C₁₈ (150 × 4.6 mm × 5 μm, 100 Å, Waters), Ejemplo Comparativo 4a: L-Dopa-N-MePhe-(N-MePhe)₃-CONH₂ tr: 8.8 min; Ejemplo Comparativo 4b: L-Dopa-Cha-(N-MePhe)₃-CONH₂ tr: 9.5 min; Ejemplo Comparativo 4c: L-Dopa-2Nal-(N-MePhe)₃-CONH₂ tr: 9.3 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): Ejemplo Comparativo 4a: L-Dopa-N-MePhe-(N-MePhe)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 863.5; Ejemplo Comparativo 4b: L-Dopa-Cha-(N-MePhe)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 855.5; Ejemplo Comparativo 4c: L-Dopa-2Nal-(N-MePhe)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 899.6. Rendimiento: Ejemplo Comparativo 4a: L-Dopa-N-MePhe-(N-MePhe)₃-CONH₂ 5.4%; Ejemplo Comparativo 4b: L-Dopa-Cha-(N-MePhe)₃-CONH₂ 10.6%; Ejemplo Comparativo 4c: L-Dopa-2Nal-(N-MePhe)₃-CONH₂ 26%.

Ejemplo Comparativo 5

Preparación de Nip-P-(N-MePhe)₃-CONH₂ (P= N-MePhe, Cha y 2Nal)

5 La síntesis se realizó en una escala 100 μ moles. Para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina sieber se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el derivado de aminoácido del primer aminoácido (Fmoc-N-MePhe-OH, 4 equiv., 400 μ moles, 161 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina lavada a fondo. La extensión del acoplamiento se comprobó por el ensayo colorimétrico de ninhidrina. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

15 El derivado de aminoácido protegido del segundo aminoácido se acopló al primer aminoácido ya anclado a la resina utilizando el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido (Fmoc-N-MePhe-OH, 4 equiv., 400 μ moles, 161 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. Se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias. El mismo protocolo se utilizó para acoplar el tercer derivado de aminoácido.

25 Para el acoplamiento del cuarto derivado de aminoácido se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el aminoácido protegido 4 equiv., 400 μ moles (Fmoc-N-MePhe-OH, 161 mg) (Fmoc-Cha-OH, 157 mg) o (Fmoc-2Nal-OH, 175 mg), PyBOP (4 equiv., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) disueltos en DMF (1-3 ml/g resina) a la resina seguidos de DIEA (12 equiv., 1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 1.5 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió dos veces más. La extensión del acoplamiento se comprobó por el test de De Clercq. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno. En el caso de N-MePhe, se realizaron dos tratamientos adicionales con DBU, tolueno, piperidina, DMF (5%, 5%, 20%, 70%) (2 $\times$ 5 min) para asegurar la eliminación del grupo Fmoc de las aminas secundarias.

35 Para el acoplamiento del cargo (ácido nipecótico) a la resina se utilizó el siguiente protocolo: Se añadieron secuencialmente el cargo-COOH (Fmoc-L-Nip-OH) (4 equiv., 400 μ moles, 140 mg) en DMF (1-3 mL/g resina), PyBOP (4 equiv., 400 μ moles, 208 mg) y HOAt (12 equiv., 1.2 mmols, 163 mg) a la resina seguido de 12 equiv. DIEA (1.2 mmols, 204 μ L). La mezcla se dejó reaccionar con agitación manual intermitente durante 2 h. El disolvente se eliminó por succión, la resina se lavó a fondo y el acoplamiento se repitió una vez. La extensión del acoplamiento se controló por el test de Kaiser. El grupo Fmoc se eliminó con 20% (v/v) piperidina en DMF utilizando 2 tratamientos de 10 minutos cada uno.

45 La etapa de escisión se realizó por tratamiento de la resina con TFA 2% en DCM (6 $\times$ 3 min). El filtrado se colectó y el DCM se evaporó bajo N₂. El residuo se disolvió en H₂O: MeCN (1:1) y liofilizado.

50 Caracterización del producto: HPLC de fase inversa: gradiente lineal de 0 a 100% MeCN en 8 minutos utilizando una columna Sunfire C₁₈ (100 $\times$ 4.6 mm $\times$ 3.5 μ m, 100 Å, Waters), Ejemplo Comparativo 5a: Nip-N-MePhe-(N-MePhe)₃-CONH₂ tr: 5.3 min; Ejemplo Comparativo 5b: Nip-Cha-(N-MePhe)₃-CONH₂ tr: 5.5 min; Ejemplo Comparativo 5c: Nip-2Nal-(N-MePhe)₃-CONH₂ tr: 5.4 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF): Ejemplo Comparativo 5a: Nip-N-MePhe-(N-MePhe)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 795.4; Ejemplo Comparativo 5b: Nip-Cha-(N-MePhe)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 787.4; Ejemplo Comparativo 5c: Nip-2Nal-(N-MePhe)₃-CONH₂ (M+Na)⁺: 831.4. Rendimiento: Ejemplo Comparativo 5a: Nip-N-MePhe-(N-MePhe)₃-CONH₂ 90%; Ejemplo Comparativo 5b: Nip-Cha-(N-MePhe)₃-CONH₂ 91%; Ejemplo Comparativo 5c: Nip-2Nal-(N-MePhe)₃-CONH₂ 75%.

Ejemplo 4

Evaluación del transporte BBB utilizando el ensayo paralelo de permeabilidad en membrana artificial (PAMPA)

60 El método de evaluación escogido para probar que los compuestos de fórmula (I) de la invención son BBB-lanzaderas capaces de cruzar cargos por difusión pasiva es el ensayo paralelo de permeabilidad en membrana artificial (PAMPA), el cual permite predecir o evaluar solo este mecanismo de transporte. En términos generales, este método es simple, automatizable con alta eficacia, tiene un bajo coste y requiere solo una cantidad pequeña de compuesto a testar. El método PAMPA originariamente introducido por Kansy en Roche utiliza una membrana artificial en forma de bicapas de fosfolípidos soportadas en un filtro (cf. M. Kansy *et al.*, "Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeability assay in the description of the absorption processes" *J. Med. Chem.* 1998,

vol. 41, pp. 1007-1010). La membrana de fosfolípidos mimetiza la membrana celular, pero no tiene los medios para el transporte activo o paracelular de las moléculas fármaco. Es una herramienta muy práctica para evaluar el transporte de compuestos por difusión pasiva. Esta técnica permite la evaluación de compuestos puros, crudos e incluso mezclas de compuestos.

El ensayo PAMPA se utiliza para determinar la capacidad de las construcciones BBB lanzadera-cargo para cruzar la BBB por difusión pasiva. La permeabilidad efectiva de los compuestos se midió por triplicado a una concentración inicial de 200 μM . La solución tampón se preparó a partir de la concentrada comercializada por pION siguiendo sus indicaciones. El pH fue ajustado a 7.4 utilizando una solución NaOH 0.5M. El compuesto de interés se disolvió en solución tampón y 2-propanol (20%, cosolvente) a la concentración deseada (200 μM).

El sándwich de PAMPA se separó y el pocillo donador se rellenó con 200 μL de la solución del compuesto a estudiar. La placa aceptora se colocó en la placa donadora asegurándose que la parte inferior de la membrana estuviera en contacto con el tampón. 4 μL de mezcla de fosfolípidos (20 mg/mL) en dodecano se añadieron a cada pocillo y 160 μL de la solución tampón y 40 μL de 1-propanol se añadieron a cada pocillo aceptor. La placa se cubrió e incubó a temperatura ambiente en una atmósfera saturada de humedad durante 4 horas bajo agitación orbital de 100 rpm. Después de 4 horas, 150 μL /pocillo de la placa donadora y 150 μL /pocillo de la placa aceptora se transfirieron a viales de HPLC y 100 μL /cada muestra se inyectaron en una columna de HPLC fase inversa, columna Symmetry C₁₈ (150 $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm , 100 Å, Waters). El transporte también se confirmó por espectrometría MALDI-TOF y HPLC-MS de alícuotas de los pocillos aceptores. La mezcla de fosfolípidos utilizada es un extracto polar de lípidos de cerebro porcino. Composición: fosfatidilcolina (PC) 12.6%, fosfatidiletanolamina (PE) 33.1%, fosfatidilserina (PS) 18.5%, fosfatidilinositol (PI) 4.1%, ácido fosfatídico 0.8% y 30.9% de otros compuestos. La permeabilidad efectiva se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$P_e = \frac{-218.3}{t} \cdot \text{Log} \left[1 - \frac{2 \cdot C_A(t)}{C_D(t_0)} \right] \cdot 10^{-6} \text{ cm / s}$$

donde:

t tiempo (horas)

$C_A(t)$ Concentración de compuesto en el pocillo aceptor a tiempo t

$C_D(t_0)$ Concentración de compuesto en el pocillo donador a 0 h

Como control, se evaluó en paralelo el transporte de propranolol y se calculó el balance de materia para todos los compuestos estudiados para detectar si tenía lugar retención de compuesto en los fosfolípidos.

Los diferentes compuestos se evaluaron por ensayo PAMPA. El ensayo PAMPA solo mide el transporte por difusión pasiva, así el transporte positivo medido para estos compuestos indica que estos compuestos tienen un transporte positivo a través de la BBB *in vivo* por difusión pasiva.

En las Tablas 2, 3 y 4, se puede ver como el uso de la construcción BBB lanzadera-cargo permite que cargos que no cruzan por ellos mismos, como el ácido nítrico y la dopamina, pueden ahora cruzar la membrana por difusión pasiva.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Permeabilidad efectiva (P_e) y porcentaje de transporte después de 4 h encontrada en el ensayo PAMPA para las versiones acetiladas de las BBB-lanzaderas basadas en PhPro. Como controles Ac-(N-MePhe)₄-CONH₂ (Ejemplo Comparativo 1) y Ac-(Pro)₄-CONH₂ (Ejemplo Comparativo 2)

Referencia compuesto	Compuesto	Pe ($\times 10^6$) cm/s	Transporte (%) (4h)
Ejemplo Comparativo 1	Ac-(N-MePhe) ₄ -CONH ₂	6.4	13.4
Ejemplo Comparativo 2	Ac-(Pro) ₄ -CONH ₂	0	0
(Ia)	Ac-PhPro-(PhPro) ₃ -CONH ₂	3.2	6.4
(Ib)	Ac-Cha-(PhPro) ₃ -CONH ₂	10.4	17.8
(Ic)	Ac-2Nal-(PhPro) ₃ -CONH ₂	1.9	3.8

TABLA 3

Permeabilidad efectiva (P_e) y porcentaje de transporte después de 4 h encontrada en el ensayo PAMPA para las construcciones BBB-lanzaderas con ácido nipecótico como cargo. El ácido nipecótico no se detectó en el pocillo aceptor del ensayo PAMPA después de 4 h

Ejemplo Comparativo 5a: Nip-N-MePhe-(N-MePhe)₃-CONH₂ tr: 5.3 min; Ejemplo Comparativo 5b: Nip-Cha-(N-MePhe)₃-CONH₂ tr: 5.5 min; Ejemplo Comparativo 5c: Nip-2Nal-(N-MePhe)₃-CONH₂ tr: 5.4 min. Espectrometría de masas (MALDI-TOF):

Referencia compuesto	Compuesto	Pe ($\times 10^6$) cm/s	Transporte (%) (4h)
(IIa)	Nip-Cha-(PhPro) ₃ -CONH ₂	6.1	11.4
Cargo	Ácido nipecótico	--	--
Ejemplo Comparativo 5a	Nip- N-MePhe-(N-MePhe) ₃ -CONH ₂	1.4	2.8
Ejemplo Comparativo 5b	Nip-Cha-(N-MePhe) ₃ -CONH ₂	1.2	2.5
Ejemplo Comparativo 5c	Nip-2Nal-(N-MePhe) ₃ -CONH ₂	1.1	2.4

TABLA 4

Permeabilidad efectiva (P_e) y porcentaje de transporte después de 4 h encontrada en el ensayo PAMPA para las construcciones BBB-lanzaderas con L-Dopa como cargo. Dopamina y L-Dopa no se detectaron en el pocillo aceptor del ensayo PAMPA después de 4 h

Referencia compuesto	Compuesto	Pe ($\times 10^6$) cm/s	Transporte (%) (4h)
(IIb)	L-Dopa-Cha-(PhPro) ₃ -CONH ₂	1.2	2.4
Ejemplo Comparativo 4b	L-Dopa-Cha-(N-MePhe) ₃ -CONH ₂	0.7	1.4
Ejemplo Comparativo 4c	L-Dopa-2Nal-(N-MePhe) ₃ -CONH ₂	0.3	0.7
Ejemplo Comparativo 4a	L-Dopa- N-MePhe-(N-MePhe) ₃ -CONH ₂	1.1	2.4

Dopamina o L-Dopa y ácido nipecótico son cargos difíciles que no pueden cruzar la BBB por difusión pasiva en absoluto. Las construcciones BBB lanzadera-cargo basadas en PhPro han sido óptimas para hacer cruzar estos cargos. De los resultados comparativos anteriores se puede derivar que los compuestos de la invención son claramente mejores BBB-lanzaderas que los compuestos más próximos del estado de la técnica.

Ejemplo 5

Solubilidad en agua

Para establecer la solubilidad en agua de las BBB-lanzaderas se realizaron los ensayos siguientes. En un vial se pesaron 5 mg de cada versión acetilada de la BBB-lanzadera. Entonces se añadieron 1 mL H₂O y la muestra se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después de este periodo de tiempo, las muestras se filtraron y un volumen conocido del sobrenadante se liofilizó y se redisolvió en el mismo volumen de H₂O: MeCN (1:1) entonces, 50 μ L se inyectaron en el HPLC. Utilizando una curva de calibrado, se cuantificó la concentración de la muestra.

En la Tabla 5, se puede ver como las BBB-lanzaderas basadas en PhPro tienen una mejor solubilidad en agua a temperatura ambiente.

TABLA 5

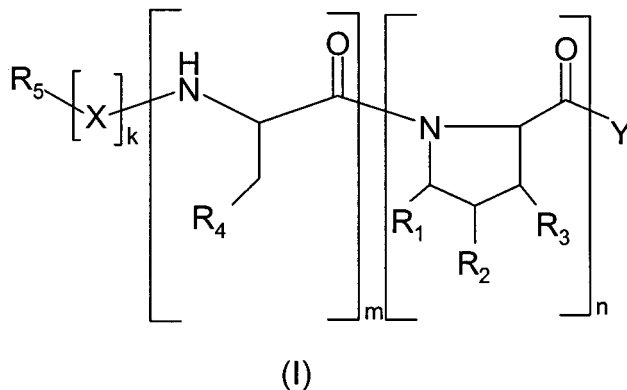
Solubilidad en agua a temperatura ambiente

Referencia compuesto	Compuesto	Máxima Solubilidad en agua
Ejemplo Comparativo 3	Ac-Cha-(N-MePhe) ₃ -CONH ₂	38 μ M
(Ib)	Ac-Cha-(PhPro) ₃ -CONH ₂	239 μ M

Estos resultados muestran que el compuesto (IIb) es seis veces más soluble que el compuesto lanzadera más próximo del estado de la técnica descrito por Morteza *et al.*

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del 3 mismo, incluyendo cualquier estereoisómero o mezclas de estereoisómeros,



donde:

R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan independientemente entre el grupo formado por: H y $(CH_2)_q-R_6$;

R_4 es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos con 1-4 anillos; los anillos siendo saturados, parcialmente insaturados o aromáticos; los anillos siendo aislados o parcialmente/totalmente fusionados y teniendo 5-6 miembros; cada miembro siendo independientemente seleccionado entre C, CH, CH_2 , N, NH, O, y S; los átomos de hidrógeno de estos miembros estando opcionalmente sustituidos por sustituyentes seleccionados entre (C_1-C_6) -alquilo, (C_1-C_6) -alcoxilo y halógeno;

R_5 es H o CH_3CO- ;

R_6 es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos con 1-2 anillos; los anillos siendo saturados, parcialmente insaturados o aromáticos; los anillos siendo aislados o parcialmente/totalmente fusionados y teniendo 5-6 miembros; cada miembro siendo independientemente seleccionado entre C, CH, CH_2 , N, NH, O, y S; los átomos de hidrógeno de estos miembros estando opcionalmente sustituido por sustituyentes seleccionados entre (C_1-C_6) -alquilo, (C_1-C_6) -alcoxilo y halógeno;

X es un birradical seleccionado entre el grupo formado por $-NH-(CH_2)_r-CO-$, $-CO(CH_2)_rCO-$, $-S-(CH_2)_r$, $-S-(CH_2)_r-CO-$, $-O-(CH_2)_r-$ y $-O-(CH_2)_r-CO-$;

Y se selecciona entre el grupo formado por $-NH_2$, $-OH$, $-OR_7$ y $-NHR_7$;

k es un entero de 0 a 2;

m es un entero de 0 a 1;

n es un entero de 2 a 10;

q es un entero de 0 a 1;

r es un entero de 1 a 3;

R_7 es un radical (C_1-C_6) -alquilo;

a condición de que al menos un radical R seleccionado entre R_1 , R_2 y R_3 es un radical $(CH_2)_q-R_6$ y con la condición de que cuando el birradical X es $-CO(CH_2)_rCO-$, entonces R_5 es H.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde n es un entero de 2 a 4.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde Y es $-NH_2$.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde los miembros del anillo en R_6 , en R_4 , o tanto en R_6 como en R_4 se seleccionan entre C, CH, y CH_2 .

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan entre el grupo formado por H, fenilo, ciclohexilo y 2-naftilo.

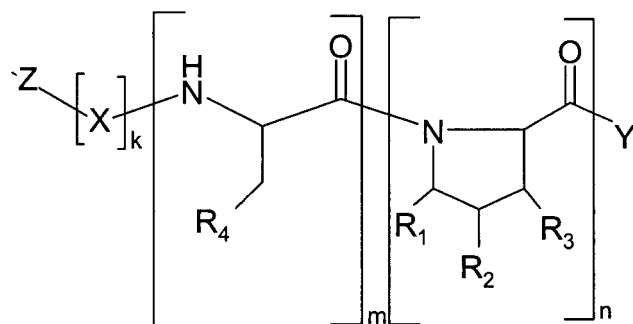
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 ó 5, donde R_1 y R_2 son H.

7. Compuesto según la reivindicación 6, donde R_3 es fenilo.

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde R_4 se selecciona entre el grupo formado por H, fenilo, ciclohexilo y 2-naftilo.

9. Compuesto de fórmula (I) que se selecciona de la siguiente lista: Ac-PhPro-(PhPro)₃-CONH₂; Ac-Cha-(PhPro)₃-CONH₂; y Ac-2Nal-(PhPro)₃-CONH₂.

10. Construcción de fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, incluyendo cualquier estereoisómero o mezclas de estereoisómeros,



(II)

donde:

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X , Y , k , m , y n son como se definen en la reivindicación 1; y Z es un radical derivado de una sustancia susceptible de formar un enlace amida o un enlace éster o un enlace disulfuro con X , dicha sustancia siendo incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) por sí misma.

11. Construcción según la reivindicación 10, donde n es un entero de 2 a 4.

12. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde Y es $-NH_2$.

13. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, donde los miembros del anillo en R_6 , en R_4 , o tanto en R_6 como en R_4 se seleccionan entre C, CH, y CH_2 .

14. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, donde R_1 , R_2 y R_3 , son independientemente seleccionados entre el grupo formado por H, fenilo, ciclohexilo y 2-naftilo.

15. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones 10-12 o 14, donde R_1 y R_2 son H.

16. Construcción según la reivindicación 15, donde R_3 es fenilo.

17. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones 10-16, donde R_4 se selecciona entre el grupo formado por fenilo, ciclohexilo y 2-naftilo.

18. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones 10-17, donde Z es un radical derivado de un principio activo farmacéutico seleccionado entre el grupo formado por agentes antiretrovirales, agentes anticancerígenos, agentes anti-psicóticos, agentes antineurodegenerativos y agentes antiépilépticos.

19. Construcción según la reivindicación 18, donde el principio activo farmacéutico es dopamina.

20. Construcción según la reivindicación 18, donde el principio activo farmacéutico es el ácido nipecótico.

21. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la construcción como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-20, junto con cantidades apropiadas de excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

22. Uso de un compuesto de fórmula (I), tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, como lanzadera a través de la barrera hematoencefálica.

23. Construcción de fórmula (II) tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-20, para su uso como medicamento.

24. Uso de la construcción tal como se define en la reivindicación 19, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

25. Uso de la construcción tal como se define en la reivindicación 20, para la preparación de un medicamento como anticonvulsivo.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000930

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MALAKOUTIKHAH, M. et al.: "N-Methyl phenylalanine rich peptides as highly versatile blood brain barrier shuttles". J. Med. Chem. 2010, vol. 53, páginas 2354-2363, página 2355, figura1, página 2359, columna 1, tabla 3.	1-25
A	MORADI, M.: "A classical molecular dynamics investigation of the free energy and structure of short polyproline conformers". Journal of Chemical Physics, 2010, vol. 133 (12) páginas125104/1-125104/18, figura 1.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.12.2011

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K5/107 (2006.01)**C07K5/117** (2006.01)**A61K38/07** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, EMBASE BIOSIS, MEDLINE, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.12.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-25
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-25
Reivindicaciones

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MALAKOUTIKHAH, M. et al.: "N-Methyl phenylalanine rich peptides as highly versatile blood brain barrier shuttles". J. Med. Chem. 2010, vol.53, páginas 2354-2363, página 2355, figura1, página 2359, column 1, tabla 3.	
D02	MORADI, M.: "A classical molecular dynamics investigation of the free energy and structure of short polyproline conformers". Journal of Chemical Physics, 2010, vol. 133 (12) páginas125104/1-125104/18, figura 1.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere a compuestos de fórmula I que son péptidos formados por derivados de prolina y otros aminoácidos y su uso como lanzadera a través de la barrera hematoencefálica para el transporte de sustancias que por si mismas son incapaces de atravesarla, dichas sustancias se utilizan en el tratamiento de enfermedades como el parkinson.

El documento D1 se refiere a la utilización de péptidos formados por unidades de metil fenilalanina (ver figura 1) o por el aminoácido prolina (ver tabla 3), como lanzaderas a través de la membrana plásmatica. En este documento se constata que la sustitución del aminoácido fenilalanina por la prolina produce una disminución de permeabilidad del péptido ya que la prolina es menos hidrofóbica comparada con la metil fenilalanina de la membrana. Dicha diferencia se atribuye a la presencia del grupo fenilo en la fenilalanina.

La diferencia entre dicho documento y los compuestos de la presente solicitud radica en la presencia de un grupo fenilo en el anillo de prolina. De acuerdo con los experimentos realizados (ver ejemplos 4, tablas 2, 3 y 4 de la solicitud) se observa que los compuestos de la invención son claramente mejores BBB-lanzaderas que los compuestos más próximos del estado de la técnica.

Por lo tanto, a la vista del documento citado, las reivindicaciones 1-25 de la presente solicitud tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P