



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 670**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 5/09** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 38/06** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04748784 .8**  
96 Fecha de presentación : **07.07.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1639004**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Péptidos marcados con fluoresceína.**

30 Prioridad: **08.07.2003 NO 20033115**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.06.2011**

73 Titular/es: **GE Healthcare AS.**  
**Nycoveien 2**  
**0485 Oslo, NO**

72 Inventor/es: **Cuthbertson, Alan;**  
**Indrevoll, Bard y**  
**Solbakken, Magne**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 670 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

Péptidos marcados con fluoresceína

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos basados en péptidos y a su uso en la formación de imágenes ópticas de diagnóstico para el tratamiento de enfermedades. Más específicamente, la invención se refiere al uso de dichos compuestos basados en péptidos como vectores de dirección que se unen a receptores asociados con la angiogénesis. Los compuestos pueden usarse como agentes de contraste en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la angiogénesis.

**Antecedentes de la invención**

10 Generalmente, pueden formarse nuevos vasos sanguíneos mediante dos mecanismos diferentes: vasculogénesis o angiogénesis. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos por ramificación de los vasos existentes. El estímulo primario para este procedimiento puede ser el suministro inadecuado de nutrientes y oxígeno (hipoxia) a células en un tejido. Las células pueden responder secretando factores angiogénicos, de los muchos que existen; un ejemplo, al que se hace referencia frecuentemente, es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Estos factores inician la secreción de enzimas proteolíticas que degradan las proteínas de la membrana basal, así como inhibidores que limitan la acción de estas enzimas potencialmente dañinas. El otro efecto marcado de los factores angiogénicos es causar que las células endoteliales migren y se dividan. Las células endoteliales que están unidas a la membrana basal, que forma una lámina continua alrededor de los vasos sanguíneos sobre el lado contraluminal, no experimentan mitosis. El efecto combinado de la pérdida de unión y señales de los receptores para factores angiogénicos es causar que las células endoteliales se muevan, multipliquen y reorganicen por sí mismas y por último sintetizen una membrana basal alrededor de los nuevos vasos. La angiogénesis es importante en el crecimiento y la remodelación de tejidos, incluyendo la cicatrización de heridas y procesos inflamatorios. La inhibición de la angiogénesis también se considera una estrategia prometedora para terapia antitumoral. Las transformaciones que acompañan a la angiogénesis también son muy prometedoras para el diagnóstico, siendo un ejemplo obvio una enfermedad maligna, pero el concepto también es muy prometedor en la inflamación y una diversidad de enfermedades relacionadas con inflamación, incluyendo aterosclerosis, siendo los macrófagos de las lesiones arterioscleróticas tempranas fuentes potenciales de lesiones de factores angiogénicos. Estos factores también están implicados en la revascularización de partes del miocardio con infarto, que sucede si se desata una estenosis en poco tiempo.

30 A continuación se muestran ejemplos adicionales de afecciones no deseadas que están asociadas con neovascularización o angiogénesis, el desarrollo o proliferación de nuevos vasos sanguíneos. También se hace referencia a este respecto al documento WO 98/47541.

Las enfermedades e indicaciones asociadas con angiogénesis son, por ejemplo, diferentes formas de cáncer y metástasis, por ejemplo, cáncer de mama, de piel, colorrectal, pancreático, prostático, pulmonar u ovárico.

35 Otras enfermedades e indicaciones son inflamación (por ejemplo, crónica), aterosclerosis, artritis reumatoide y gingivitis.

40 Son enfermedades e indicaciones adicionales asociadas con la angiogénesis malformaciones arteriovenosas, astrocitomas, coriocarcinomas, glioblastomas, gliomas, hemangiomas (de la infancia, capilares), hepatomas, endometrio hiperplásico, miocardio isquémico, endometriosis, sarcoma de Kaposi, melanoma, neuroblastomas, arteriopatía periférica obstructiva, artrosis, psoriasis, retinopatía (diabética, proliferativa), esclerodermia, seminomas y colitis ulcerosa.

45 La angiogénesis implica receptores que son únicos para las células endoteliales y tejidos circundantes. Estos marcadores incluyen receptores del factor de crecimiento tales como VEGF y la familia de receptores de Integrina. Los estudios inmunohistoquímicos han demostrado que una diversidad de integrinas, quizás de forma más importante la clase  $\alpha_v$ , se expresan en la superficie apical de los vasos sanguíneos [Conforti, G., y col. (1992) Blood 80: 37-446] y están disponibles para direccionamiento por ligandos circulantes [Pasqualini, R., y col. (1997) Nature Biotechnology 15: 542-546]. El  $\alpha_5\beta_1$  también es una integrina importante para promover el ensamblaje de la matriz de fibronectina e iniciar la unión de células a fibronectina. También desempeña un papel crucial en la migración celular.

50 La integrina  $\alpha_v\beta_3$  es uno de los receptores que se sabe que están asociados con la angiogénesis. Las células endoteliales estimuladas parecen depender de este receptor para su supervivencia durante un periodo crítico del proceso angiogénico, ya que antagonistas de la interacción del receptor de integrina  $\alpha_v\beta_3$ /ligando inducen apoptosis e inhiben el crecimiento de vasos sanguíneos.

55 Las integrinas son moléculas heterodiméricas en las que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  penetran la bicapa lipídica de membrana celular. La subunidad  $\alpha$  tiene cuatro dominios de unión a  $Ca^{2+}$  en su cadena extracelular y la subunidad  $\beta$  tiene varios dominios ricos en cisteína extracelular.

5 Muchos ligandos (por ejemplo, fibronectina) implicados en la adhesión celular contienen la secuencia tripeptídica de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). La secuencia RGD parece actuar como un sitio de reconocimiento primario entre los ligandos que presentan esta secuencia y receptores en la superficie de las células. Generalmente se cree que las interacciones secundarias entre el ligando y el receptor aumentan la especificidad de la interacción. Estas interacciones secundarias podrían tener lugar entre restos del ligando y receptor que sean inmediatamente adyacentes a la secuencia RGD o en sitios que sean distantes de la secuencia RGD.

10 Se sabe que los péptidos RGD se unen a una variedad de receptores de integrina y tienen el potencial de regular varios acontecimientos celulares de aplicación significativa en el entorno clínico. Quizás el efecto más ampliamente estudiado de los péptidos RGD y miméticos de los mismos se refiere a su uso como agentes antitrombóticos que se dirigen a la integrina de plaquetas GpIIb/IIIa.

La inhibición de la angiogénesis en tejidos por administración de un antagonista de  $\alpha v \beta 3$  o  $\alpha v \beta 5$  se ha descrito por ejemplo en los documentos WO97/06791 y WO95/25543 usando anticuerpos o péptidos que contienen RGD. El documento EP 578083 describe una serie de péptidos que contienen RGD monocíclicos.

15 Los péptidos RGD cíclicos contienen múltiples puentes que también se han descrito en los documentos WO98/54347 y WO95/14714.

Se encuentran ejemplos adicionales de compuestos basados en péptidos que comprenden RGD en los documentos WO01/77145, WO02/26776 y WO03/006491.

20 Existe la necesidad clínica de desarrollar técnicas de formación de imagen no invasivas más específicas para enfermedades relacionadas con angiogénesis. Dichas técnicas de formación de imágenes tendrán un papel central en la evaluación de nuevas terapias anti-angiogénicas. Pudiendo evaluar el nivel real de angiogénesis será de beneficio clínico en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con angiogénesis en una fase temprana. Actualmente se ha descubierto sorprendentemente que la formación de imágenes ópticas puede usarse para evaluar el nivel de angiogénesis y la invención proporciona nuevos agentes de contraste de formación de imágenes ópticas para este fin.

## 25 **Sumario de la invención**

En vista de las necesidades de la técnica la presente invención proporciona compuestos basados en péptidos marcados con fluoresceína para su uso como agentes de contraste en la formación de imágenes ópticas o para tratamiento terapéutico. La formación de imágenes y direccionamiento eficaz de receptores de integrina asociados con la angiogénesis *in vivo* demanda un vector basado en RGD selectivo de alta afinidad que sea químicamente robusto y estable. Además, la ruta de excreción es un factor importante cuando se diseñan agentes de formación de imágenes para reducir los problemas con interferencias de fondo. Estas condiciones rigurosas se cumplen por los compuestos peptídicos marcados con fluoresceína descritos en la presente invención.

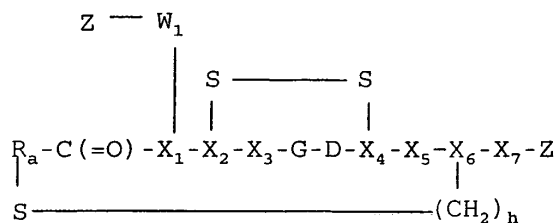
## **Descripción detallada de la invención**

35 Visto desde un aspecto la invención proporciona nuevos compuestos basados en péptidos como se define en las reivindicaciones. Estos compuestos tienen afinidad por receptores de integrina, por ejemplo, afinidad por la integrina  $\alpha v \beta 3$  y están marcados con un indicador colorante de fluoresceína.

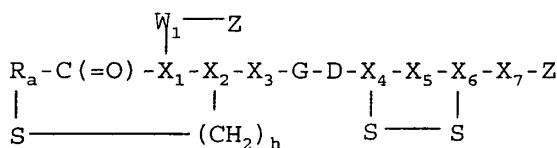
Los compuestos o sales fisiológicamente aceptables de los mismos, comprenden un vector peptídico y al menos un colorante de fluoresceína. El vector peptídico tiene afinidad por receptores de integrina, tales como los receptores de  $\alpha v \beta 3$ .

40 El compuesto de la invención está limitado por formación de puentes de ciclación en la parte del vector peptídico. Un compuesto basado en péptidos que incluye un puente de ciclación es más específico hacia  $\alpha v \beta 3$ , y se prefiere más que un péptido lineal. Los compuestos de la invención comprenden dos puentes de ciclación entre aminoácidos diferentes de los compuestos. La expresión "puentes de ciclación" se refiere a cualquier combinación de aminoácidos o con aminoácidos y grupos  $(CH_2)_n$ - o  $-(CH_2)_n-C_6-H_4$  con grupos funcionales que permiten la introducción de un puente. La letra n representa un número entero positivo de 1 a 10. Algunos ejemplos preferidos son disulfuros, miméticos de disulfuro tales como el puente  $-(CH_2)_4$  - carba, tioacetal, puentes de tioéter (cistationa o lantionina) y puentes que contienen ésteres y éteres.

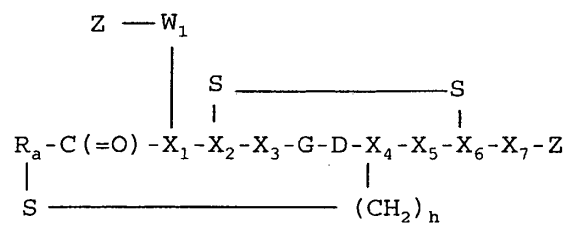
45 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un vector peptídico y al menos un colorante de fluoresceína, en el que dicho compuesto se selecciona de una de las fórmulas



(III)



(IV)



(V)

en las que:

$X_3$  representa arginina,

G representa glicina,

D representa ácido aspártico

$R_a$  representa  $-(\text{CH}_2)_n - \text{o} - (\text{CH}_2)_n - \text{C}_6\text{H}_4 -$  que forman un puente con  $X_2$ ,  $X_4$  o  $X_6$ , en las que

$n$  representa un número entero positivo de 1 a 10; y

$X_1$  representa un enlace ó 1, 2, 3, 4 ó 5 restos aminoácidos, en el que un resto aminoácido está opcionalmente funcionalizado con un resto espaciador o dicho resto aminoácido posee un cadena lateral funcional, tal como un grupo ácido o amina; y

$X_5$  representa un aminoácido hidrófobo; y

$X_6$  representa un resto aminoácido que puede formar un puente de ciclación; y

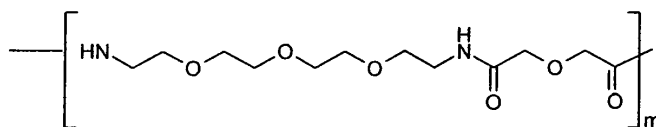
$X_7$  representa un espaciador o resto biomodificador o está ausente.  $X_7$  se basa preferentemente en un componente básico de polietilenglicol (PEG) monodisperso que comprende de 1 a 10 unidades de dicho

componente básico, teniendo dicho biomodificador la función de modificar la farmacocinética y las tasas de eliminación sanguínea de dichos agentes. Además  $X_7$  también puede representar de 1 a 10 restos

aminoácidos que comprenden preferentemente glicina, lisina, ácido aspártico o serina. Más preferentemente,  $X_7$  representa un espaciador o biomodificador que comprende ambos restos aminoácido y una estructura de

tipo PEG, tal como 1-10 restos aminoácidos en combinación con una estructura de tipo PEG, preferentemente una combinación de bis aminoetil etilenglicol glicina. En una realización preferida,  $X_7$  representa una unidad

compuesta por la estructura de tipo PEG monodisperso, ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de fórmula (II),



(II)

30

5 en la que  $m$  equivale a un número entero de 1 a 10 y en la que el extremo C-terminal es una amida o resto ácido. Se encuentra que el biomodificador  $X_7$  modifica la farmacocinética y las tasas de eliminación sanguínea de los compuestos. El biomodificador logra menor captación de los compuestos en tejido, es decir, músculo, hígado, etc. proporcionando de este modo una mejor imagen de diagnóstico debido a una menor interferencia de fondo. La secreción es principalmente a través de los riñones debido a una ventaja adicional del biomodificador; y

Dependiendo de la colocación de los puentes de ciclación los compuestos comprenderán configuraciones "separadas", "anidadas" o "entrelazadas". Los dos puentes en cada compuesto son:

10 Entre  $R_a$  y  $X_6$  y entre  $X_2$  y  $X_4$  (formando una configuración anidada);  
 Entre  $R_a$  y  $X_2$  y  $X_4$  y  $X_6$  (configuración separada); Entre  $R_a$  y  $X_4$ , y  $X_2$  y  $X_6$  (formando una configuración entrelazada).  
 $X_2$ ,  $X_4$  y  $X_6$  representan restos de aminoácido que pueden formar un enlace disulfuro o tioéter, tal como cisteínas u homocisteínas;  
 15  $W_1$  es un resto espaciador o está ausente.  $W_1$  deriva preferentemente de ácido glutámico y/o succínico y/o de una unidad basada en polietilenglicol, por ejemplo, incluyendo un resto como se proporciona por la fórmula II que une el colorante de fluoresceína al péptido. Otros elementos espaciadores representativos ( $W_1$ ) incluyen polisacáridos de tipo estructural, polisacáridos de tipo almacenamiento, poliaminoácidos y ésteres metílicos y etílicos de los mismos, y polipéptidos, oligosacáridos y oligonucleótidos, que puedan o no contener sitios de escisión enzimática. El papel del resto espaciador  $W_1$  es distanciar el colorante relativamente voluminoso del dominio de unión a receptor del componente peptídico;  
 20  $h$  es un número entero positivo 1 ó 2;  
 y en el que al menos uno de los grupos  $Z$  que está presente representa un colorante de fluoresceína.

Los compuestos incluyen preferentemente sólo un grupo  $Z$ .

25 El colorante de fluoresceína representado por  $Z$  puede unirse a  $X_1$ ,  $W_1$ ,  $X_6$  o  $X_7$ , preferentemente por formación de un enlace amida.

En un aspecto preferido los compuestos de fórmula III-V o las sales fisiológicamente aceptables de los mismos tienen las características siguientes:

$R_a$  representa preferentemente  $-(CH_2)-$

30 Además,  $X_1$  representa un resto aminoacídico con una cadena lateral funcional tal como un grupo ácido o amina, seleccionándose preferentemente el aminoácido de ácido aspártico o glutámico, lisina, homolisina, ácido diaminoalíclico o ácido diaminopropionico, más preferentemente ácido aspártico o lisina.

$X_2$ ,  $X_4$  y  $X_6$  representan preferentemente de forma independiente un resto de cisteína u homocisteína.

$X_5$  representa preferentemente tirosina, fenilalanina, 3-yodo-tirosina o naftilalanina y más preferentemente fenilalanina o 3-yodo-tirosina.

35  $X_7$  y  $W_1$  se definen como en la fórmula I y II-V respectivamente. Preferentemente  $X_7$  comprende 1-10 unidades de un componente básico de PEG monodisperso o está ausente, y preferentemente  $W_1$  está ausente.

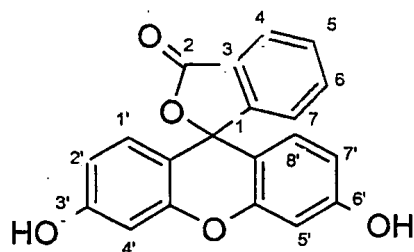
$Z$  representa un colorante de fluoresceína o está ausente, de modo que el compuesto comprende al menos un colorante de fluoresceína.

40 En un aspecto preferido, los compuestos son de fórmula III (anidada) o sales fisiológicamente aceptables de los mismos y más preferentemente tienen las características proporcionadas en el aspecto preferido descrito anteriormente.

45 Los compuestos de fórmula III-V comprenden al menos dos puentes, en los que un puente forma un enlace disulfuro y el segundo puente comprende un enlace tioéter (sulfuro). Los compuestos preferidos de fórmula III, tienen los puentes colocados de modo que los puentes pliegan el resto peptídico en una configuración "anidada". Los compuestos de esta realización de la invención tienen por tanto un máximo de un puente disulfuro por resto molecular. Los compuestos definidos por la presente invención son sorprendentemente estables *in vivo* y en las condiciones empleadas durante el marcaje con fluoresceína.

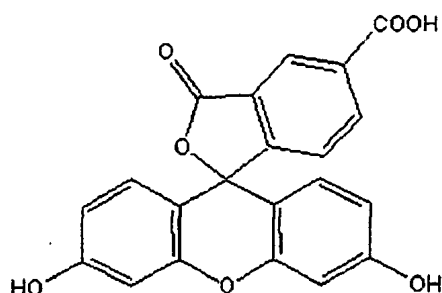
50 El indicador  $Z$  comprende un colorante de fluoresceína, es decir, fluoresceína o derivados de fluoresceína. La fluoresceína es un colorante amarillo que brilla en luz visible. La fluoresceína se excita típicamente por la línea de 488 nm de un láser de argón y la emisión se recoge a 530 nm. La fluoresceína y sus derivados tienen un coeficiente de absorción relativamente alto, un rendimiento cuántico de fluorescencia excelente y buena solubilidad en agua. El amplio uso en el paso hace que estén muy bien caracterizados, que su disponibilidad sea muy buena y que tengan un coste por mg reducido en general.

La fórmula (VI) proporciona fluoresceína, que muestra la numeración de las diferentes posiciones.



(VI) Fluoresceína

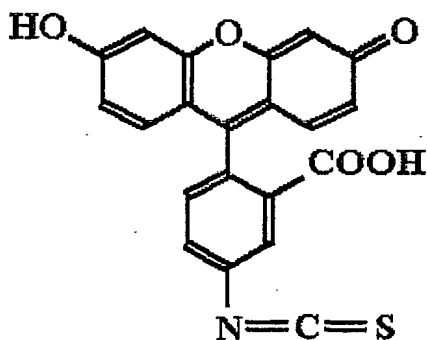
Son derivados importantes de la fluoresceína, por ejemplo, las carboxifluoresceínas, tales como la 5-carboxifluoresceína, mostrada por la fórmula VII o la 6-carboxifluoresceína.



5

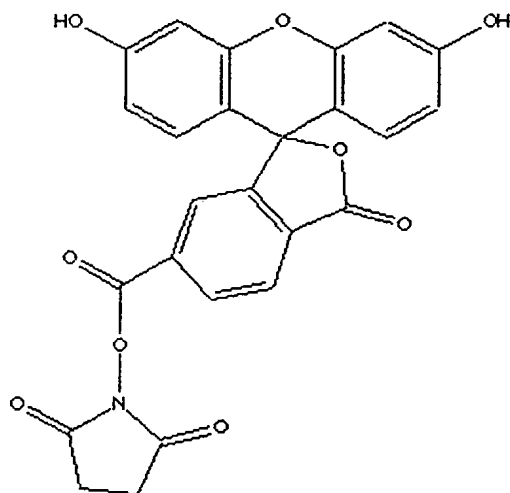
(VII) 5-carboxifluoresceína

Otro derivado de fluoresceína importante es el isotiocianato de fluoresceína proporcionado mediante la fórmula VIII:



(VIII) isotiocianato de fluoresceína

- 10 Se prefiere aún más usar un carboxilato activado de fluoresceína, tal como un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), denominado éster de NHS fluoresceína, mostrado en la fórmula IX. Los ésteres de succinimidilo son reactivos excelentes puesto que los productos de amida formados son muy estables.



(IX) Éster de NHS de fluoresceína

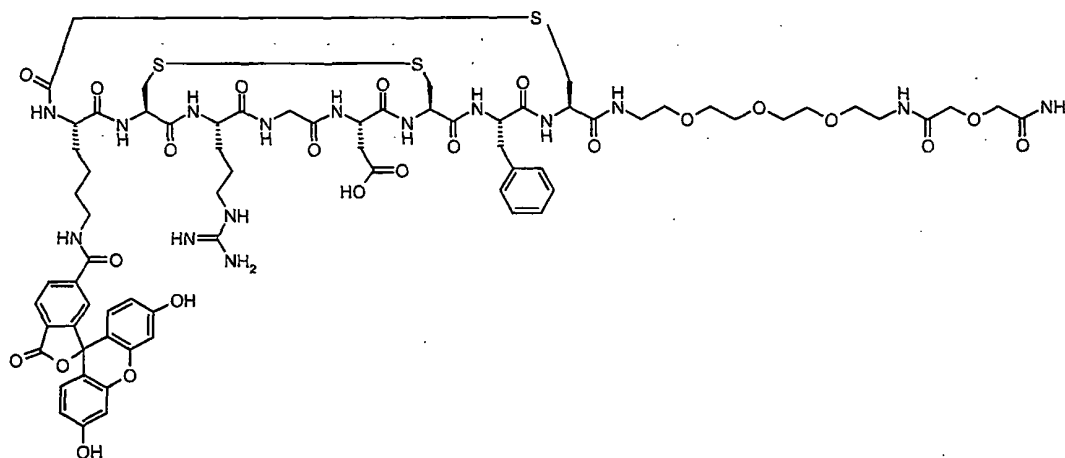
El colorante de fluoresceína representado por Z puede unirse a  $X_7$  u opcionalmente mediante el espaciador  $W_1$  como se proporciona en las fórmulas III-IV. Preferentemente, la fluoresceína se acopla al vector peptídico por formación de enlace amida con un grupo amino adecuado del péptido. Los ésteres activos de fluoresceína tales como el éster de NHS (Pierce Catalogo 46100) se consideran particularmente útiles cuando sintetizan los compuestos. Son sitios de acoplamiento preferidos para la fluoresceína las posiciones 5 y 6.

Los aminoácidos pueden representar preferentemente un aminoácido de origen natural. En la mayoría de los casos, se prefiere que los aminoácidos en el péptido estén todos en forma L. Sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, uno, dos, tres o más de los aminoácidos en el péptido están preferentemente en forma D. La inclusión de dichos aminoácidos en forma D puede tener un efecto significativo sobre la estabilidad del compuesto en suero.

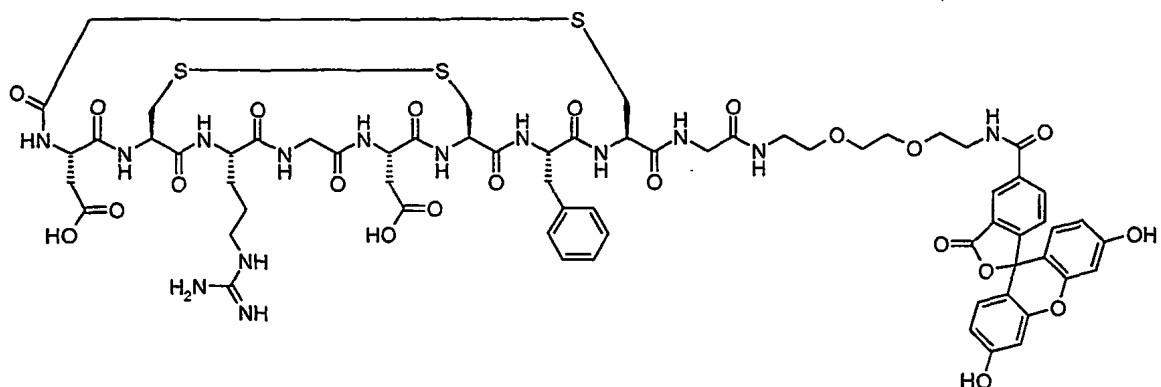
Algunos de los compuestos de la invención son vectores basados en RGD de alta afinidad. Como se usa en el presente documento, la expresión "vector basado en RGD de alta afinidad" se refiere a compuestos que tienen una  $K_i$  de  $< 10$  nM y preferentemente  $< 5$  nM, en un ensayo de unión competitiva para integrina  $\alpha v \beta 3$  y en el que el valor  $K_i$  se determinó por competición con el ligando de alta afinidad conocido, equistatina. En la técnica se conocen bien procedimientos para realizar dichos ensayos de competición.

A continuación se ilustran algunos compuestos preferidos de la invención. Los compuestos A y B comprenden fluoresceína conjugada con un péptido que contiene RGD (Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys) por formación de un enlace amida, proporcionando ambos una configuración "anidada".

Compuesto A:



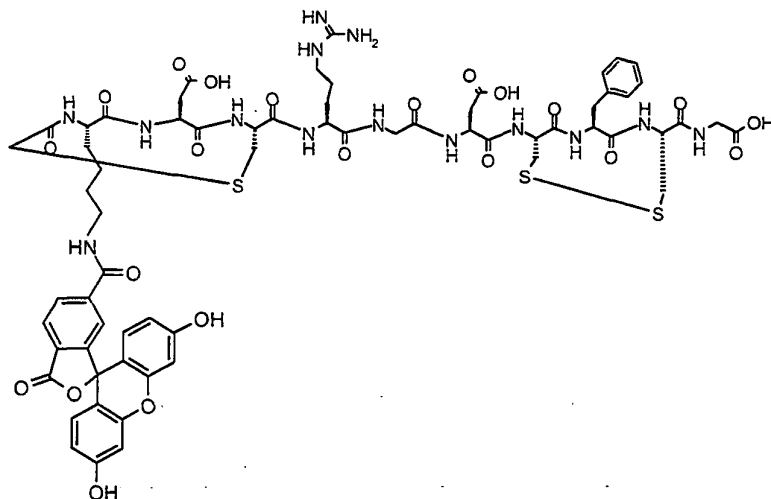
Compuesto B:



Otros ejemplos de compuestos de la invención se ilustran mediante los compuestos C y D a continuación.

Compuesto C:

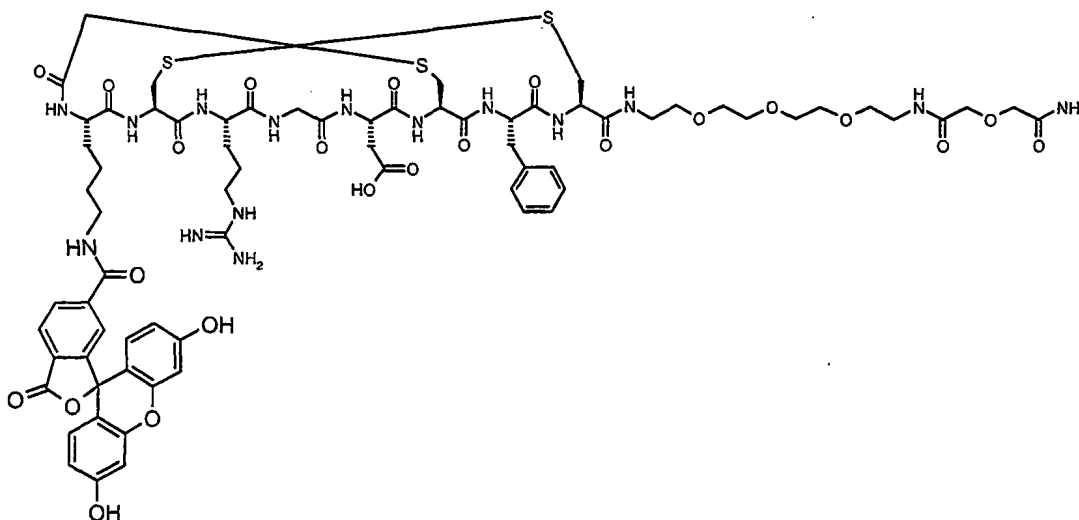
5 El compuesto comprende un péptido RGD (Lys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly) unido a fluoresceína formando una configuración "separada".



Compuesto D

El compuesto comprende un péptido RGD (Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys) unido a fluoresceína formando una configuración "entrelazada".





Los nuevos compuestos de la invención pueden usarse como agentes de contraste en formación de imágenes ópticas. El uso de los compuestos como agentes de contraste en la formación de imágenes ópticas es por lo tanto una realización de la invención. Una realización preferida de la invención son compuestos que se describen para usar como agente de contraste de formación de imágenes ópticas, particularmente para usar en la formación de imágenes ópticas de y para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la angiogénesis.

Los compuestos de la presente invención son útiles como agentes formadores de imágenes en la detección de la angiogénesis tanto en seres humanos como en animales. Los productos también pueden tener utilidad en modelos animales preclínicos y permitir el control de la eficacia terapéutica de nuevos fármacos dentro de investigación farmacéutica, por ejemplo, en oncología.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz, por ejemplo, una cantidad eficaz para aumentar el contraste de imágenes en la formación de imágenes *in vivo* de un compuesto de la invención, o una sal del mismo, junto con uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, una sal del mismo, junto con uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Vista desde un aspecto adicional la invención proporciona el uso de un compuesto de la invención para la fabricación de un medio de contraste de formación de imágenes ópticas para usar en un procedimiento de diagnóstico que implica la administración de dicho medio de contraste a un cuerpo humano o animal y la generación de una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.

Vista desde un aspecto adicional más la invención proporciona un procedimiento de generación de una imagen de un cuerpo humano o animal por formación de imágenes ópticas que implique la generación de una imagen de al menos una parte de dicho cuerpo, en el que se ha distribuido un agente de contraste preadministrado, en el que como dicho agente de contraste se usa un compuesto según se describe.

Vista desde un aspecto adicional más la invención proporciona un procedimiento de generación de imágenes mejoradas de un cuerpo humano o animal por formación de imágenes ópticas al que se ha administrado previamente una composición de agente de contraste que comprende un compuesto según se define, comprendiendo dicho procedimiento generar una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.

Vista desde un aspecto adicional la invención proporciona un procedimiento de control del efecto de tratamiento de un cuerpo humano o animal con un fármaco para combatir una afección asociada con la angiogénesis, implicando dicho procedimiento la administración previa a dicho cuerpo de un agente de la invención y la detección de la captación de dicho agente por receptores celulares, preferentemente receptores de células endoteliales y en particular receptores  $\alpha v\beta 3$ , efectuándose dicha administración y detección opcionalmente, pero preferentemente, de forma repetida, por ejemplo, antes, durante y después del tratamiento con dicho fármaco. Comprendiendo dicha detección una técnica de formación de imágenes ópticas.

Puesto que la fluoresceína, así como el compuesto peptídico de fluoresceína de la presente invención emiten en el intervalo visual del espectro, para adquirir las imágenes puede usarse el equipo de oftalmoscopia convencional. Además, puede aplicarse en microscopía confocal *in vivo*. Posiblemente también pueden usarse técnicas de formación de imágenes de dominio del tiempo y de dominio de la frecuencia desarrolladas recientemente,

aprovechando las características adicionales del fluoróforo, tal como vida útil.

Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse usando todos los procedimientos de síntesis química conocidos, pero la metodología de fase sólida de Merrifield que emplea un sintetizador de péptidos automático (J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964)) es particularmente útil. Además, también puede realizarse el acoplamiento de fluoresceína, tal como de un éster activo de fluoresceína, automáticamente produciendo un enlace amida entre el vector peptídico y el grupo fluoresceína. El vector peptídico y el compuesto peptídico pueden purificarse usando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y caracterizarse por espectrometría de masas y HPLC analítica antes del ensayo en la exploración *in vitro*.

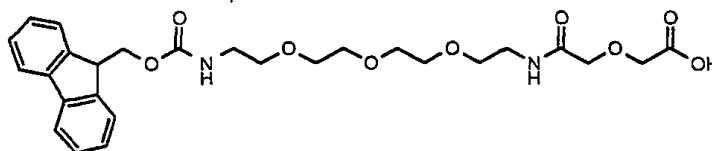
La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1:

Síntesis de disulfuro [Cys<sup>2-6</sup>] tioéter ciclo [CH<sub>2</sub>CO-Lys(flouresceína)-Cys<sup>2</sup>-Arg-Gly-Asp-Cys<sup>6</sup>-Phe-Cys]-PEG-NH<sub>2</sub>

1 a) Síntesis de ácido de 17-(Fmoc-amino)-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico



15 Este componente básico se acopla a la fase sólida usando química de Fmoc. La forma acoplada de este componente básico se denominará en forma abreviada PEG.

### 1,11-Diazido-3,6,9-trioxaundecano

Una solución de tetraetilenglicol seco (19,4 g, 0,100 mol) y cloruro de metanosulfonilo (25,2 g, 0,220 mol) en THF seco (100 ml) se mantuvo con argón y se enfrió a 0°C en un baño de hielo/agua. Al matraz se añadió una solución de trietilamina (22,6g, 0,220 mol) en THF seco (25 ml) gota a gota durante 45 min. Después de 1 h el baño de enfriamiento se retiró y se continuó con la agitación durante 4 h. Se añadió agua (60 ml). A la mezcla se añadió hidrogenocarbonato sódico (6g a pH 8) y azida sódica (14,3 g, 0,220 mol) en ese orden. Se eliminó el THF por destilación y la solución acuosa se calentó a reflujo durante 24 h (se formaron dos fases). La mezcla se enfrió y se añadió éter (100 ml). La fase acuosa se saturó con cloruro sódico. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con éter (4 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 50 ml) y se secaron (MgSO<sub>4</sub>). La filtración y concentración proporcionó 22,1 g (91%) de aceite amarillo. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

### 11-Azido-3,6,9-trioxaundecanamina

A una suspensión de 1,11-diazido-3,6,9-trioxaundecano (20,8 g, 0,085 mol) en ácido clorhídrico al 5% (200 ml), enérgicamente agitada de manera mecánica, se añadió una solución de trifetilfosfina (19,9 g, 0,073 mol) en éter (150 ml) durante 3 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h adicionales. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 40 ml). La fase acuosa se enfrió en un baño de hielo/agua y se ajustó el pH hasta aproxim. 12 por adición de KOH. El producto se extrajo en diclorometano (5 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>). La filtración y evaporación proporcionó 14,0 g (88%) de aceite amarillo. El análisis por espectroscopía de masas de MALDI-TOF (matriz: ácido α-ciano-4-hidroxicinámico) proporcionó un pico de M+H a 219 como se esperaba. Una caracterización adicional usando espectroscopía de NMR <sup>1</sup>H (500 MHz) y <sup>13</sup>C (125 MHz) verificó la estructura.

### Ácido 17-Azido-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico

A una solución de 11-azido-3,6,9-trioxaundecanamina (10,9 g, 50,0 mmol) en diclorometano (100 ml) se añadió anhídrido diglicólico (6,38 g, 55,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche. El análisis de HPLC (columna Vydac 218TP54; disolventes: A = agua/TFA al 0,1% y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente B del 4-16% durante 20 min; flujo 1,0 ml/min; detección UV a 214 y 284 nm), mostró una conversión completa de material de partida en un producto con un tiempo de retención de 18,3 min. La solución se concentró para proporcionar un rendimiento cuantitativo de un jarabe amarillo. El producto se analizó por LC-MS (ionización EN) proporcionando [MH]<sup>+</sup> a 335 como se esperaba. La espectroscopía de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) y <sup>13</sup>C (125 MHz) concordaba con la estructura. El producto se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

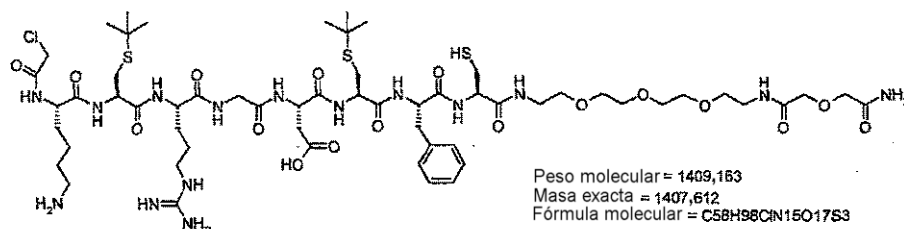
### Ácido 17-Amino-5-oxo-6-aza,3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico

Se redujo una solución de ácido 17-azido-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico (8,36 g, 25,0 mmol) en agua (100 ml) usando H<sub>2</sub> (g) -Pd/C (10%). La reacción se procesó hasta que el análisis de LC-EM mostró una conversión completa del material de partida (columna Vydac 218TP54; disolventes: A = agua/TFA al 0,1% TFA y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente B del 4-16% B durante 20 min; flujo 1,0 ml/min; detección UV a 214 y 284 nm, ionización EN que proporciona M+H a 335 para el material de partida y 309 para el producto). La solución se filtró y se usó directamente en la etapa siguiente.

#### Ácido 17-(Fmoc-amino)-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico

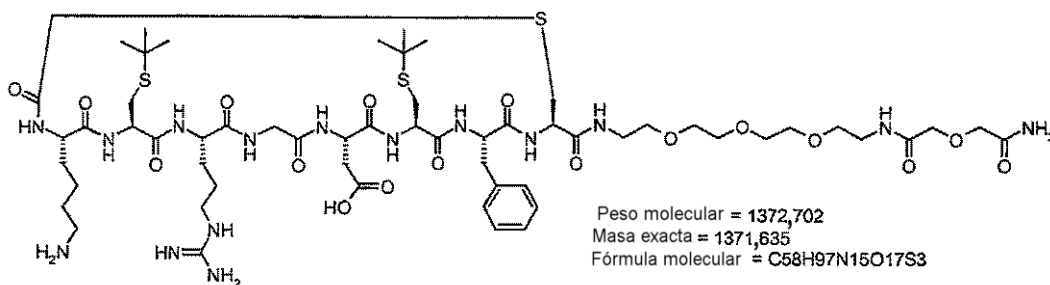
A la solución acuosa de ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico anterior (correspondiente a aminoácido 25,0 mmol) se añadió bicarbonato sódico (5,04 g, 60,0 mmol) y dioxano (40 ml). Se añadió gota a gota una solución de cloruro de Fmoc (7,11 g, 0,275 mol) en dioxano (40 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche. El dioxano se retiró por evaporación (rotavapor) y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se acidificó por adición de ácido clorhídrico y el material precipitado se extrajo en cloroformo. La fase orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró para proporcionar 11,3 g (85%) de un jarabe amarillo. La estructura se confirmó por análisis LC-EM (columna Vydac 218TP54; disolventes: A = agua/TFA al 0,1% TFA y B = acetonitrilo/TFA al 0,1%; gradiente B del 40-60% B durante 20 min; flujo 1,0 ml/min; detección UV a 214 y 254 nm, proporcionando la ionización EN M+H a 531 según se espera para el pico de producto a 5,8 minutos). El análisis mostró un contenido muy reducido de productos secundarios y el material se usó sin purificación adicional.

#### 1 b) Síntesis de ClCH<sub>2</sub>CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-PEG-NH<sub>2</sub>



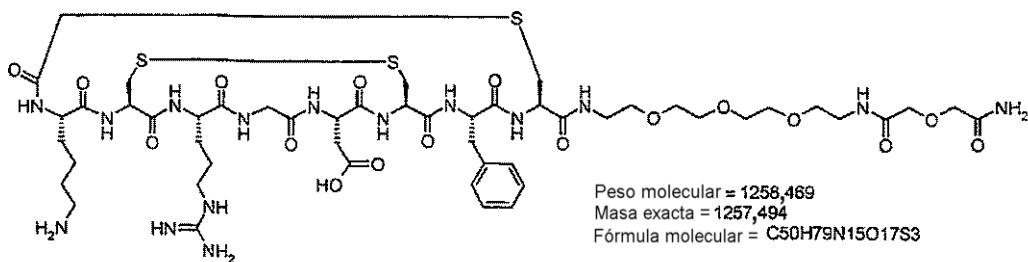
La unidad de PEG se acopló manualmente a resina Rink Amide AM, partiendo de una escala de 0,25 mmol, mediado por activación de HATU. El péptido restante se ensambló en un sintetizador de péptidos automático ABI 433A usando cartuchos de aminoácidos de 1 mmol. Los aminoácidos se activaron previamente usando HBTU antes del acoplamiento. Se cloroacetilaron grupos de amina N-terminal usando una solución de anhídrido cloroacético en DMF durante 30 min. La eliminación simultánea de péptido y grupos protectores de cadena lateral (excepto tBu) de la resina se realizó en TFA que contenía TIS (5%), H<sub>2</sub>O (5%) y fenol (2,5%) durante dos horas. Después del tratamiento se obtuvieron 322 mg de péptido bruto (HPLC analítica: Gradiente de B al 5-50% durante 10 min en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CB/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 ml/min; detección UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 6,37 min). Se realizó una caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas: Esperada, M+H a 1409, encontrada a 1415).

#### 1 c) Síntesis de tioéter ciclo [CH<sub>2</sub>CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-PEG-NH<sub>2</sub>



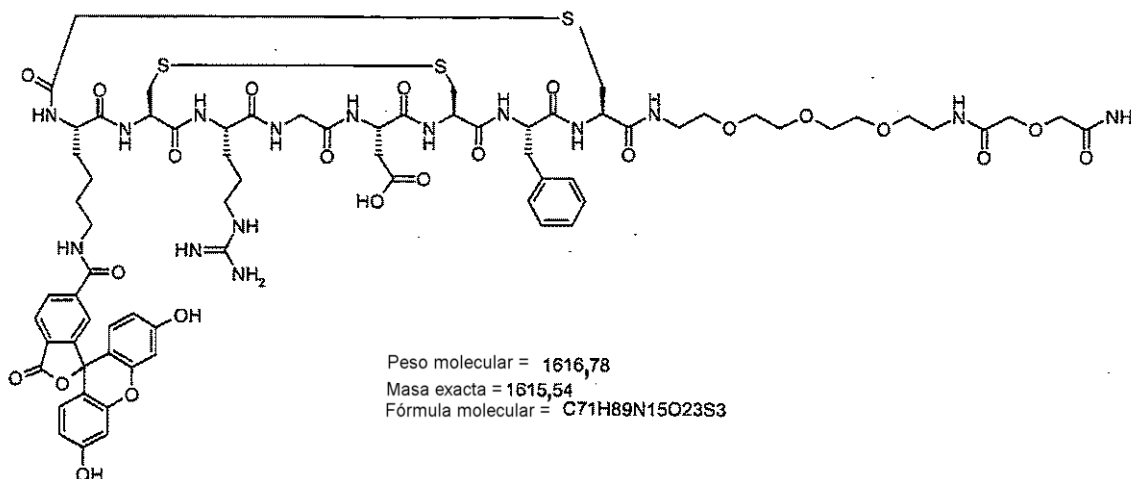
Se disolvieron 322 mg de ClCH<sub>2</sub>CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> en agua/acetonitrilo. La mezcla se ajustó a pH 8 con solución de amoníaco y se agitó durante 16 horas. Después del tratamiento se obtuvo péptido bruto (HPLC Analítica: Gradiente de B al 5-50% B durante 10 min en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 ml/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 6,22 min). Se realizó una caracterización adicional de producto usando espectrometría de masas: Esperada M+H a 1373, encontrada a 1378).

#### 1 d) Síntesis de disulfuro [Cys<sup>2-6</sup>] tioéter ciclo[CH<sub>2</sub>CO-Lys-Cys<sup>2</sup>-Arg-Gly-Asp-Cys<sup>6</sup>-Phe-Cys]-PEG-NH<sub>2</sub>



Se trató tioéter ciclo [CH<sub>2</sub>CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> con una solución de anisol (200 µl), DMSO (2 ml) y TFA (100 ml) durante 60 min después de lo cual se eliminó el TFA al vacío y el péptido se precipitó por adición de éter dietílico. Se realizó una purificación por HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna 5 µ C18 (2) 250 x 21,20 mm) de 70 mg de material bruto usando B al 0-30%, en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1% durante 40 min a un caudal de 10 ml/min. Después de la liofilización se obtuvieron 46 mg de material puro (HPLC analítica: Gradiente de B al 0-30% durante 10 min en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 ml/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto 6,80 min). Se realizó una caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas: Esperada, M+H a 1258,5, encontrada a 1258,8).

1 e) Síntesis de disulfuro [Cys<sup>2-6</sup>] tioéter ciclo [CH<sub>2</sub>CO-Lys(fluoresceína)-Cys<sup>2</sup>-Arg-Gly-Asp-Cys<sup>6</sup>-Phe-Cys]-PEG-NH<sub>2</sub>

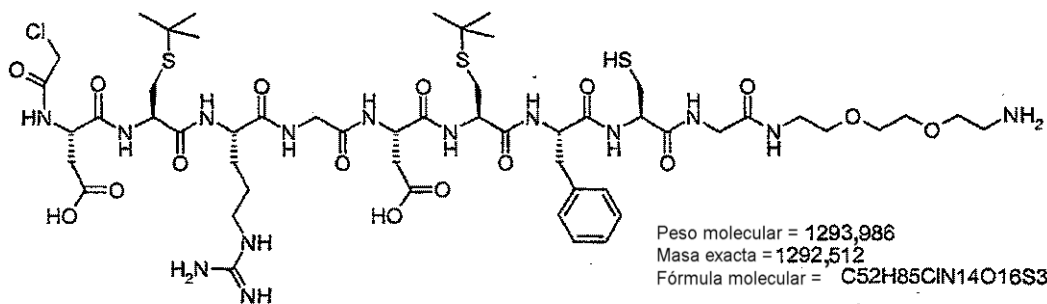


Se disolvieron 3 mg de [Cys<sup>2-6</sup>] ciclo[CH<sub>2</sub>CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-PEG-NH<sub>2</sub>, 16,2 mg de éster de NHS de Fluoresceína y 4 ml de N-metilmorfolina en DMF (3 ml). La mezcla se protegió de la luz y se agitó durante una noche. Se realizó una purificación por HPLC preparativa (columna Vydac 218TP1022 C18) de la mezcla de reacción usando B al 20-30%, en la que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%, durante 40 min a un caudal de 10 ml/min. Después de la liofilización se obtuvieron 21,6 mg de material puro (HPLC analítica: Gradiente de B del 10-40% durante 10 min en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%; columna, Phenomenex Luna 3 µ C18 (2) 50 x 4,6 mm; flujo, 2 ml/min; detección, UV 214 nm; tiempo de retención de producto, 7,0 min). Se llevó a cabo una caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas: Esperada M+H a 1616,5, encontrada a 1616,3).

Ejemplo 2:

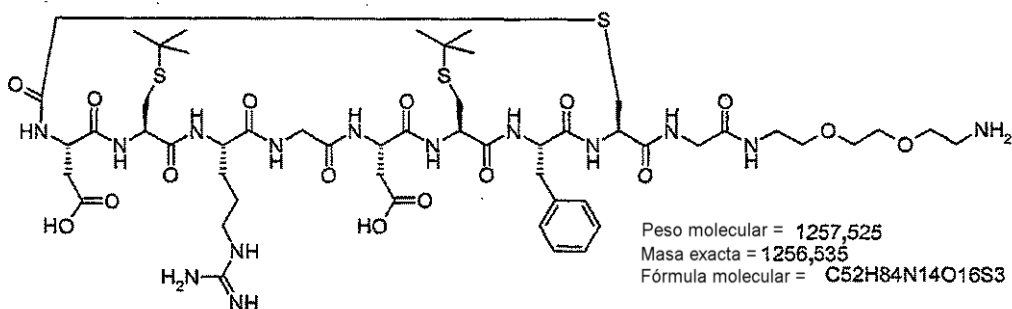
Síntesis de disulfuro [Cys<sup>2-6</sup>] tioéter ciclo[CH<sub>2</sub>CO-Asp-Cys<sup>2</sup>-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly]-Bis(aminoetil)etilenglicol-fluoresceína

25 2a. Síntesis de ClCH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>



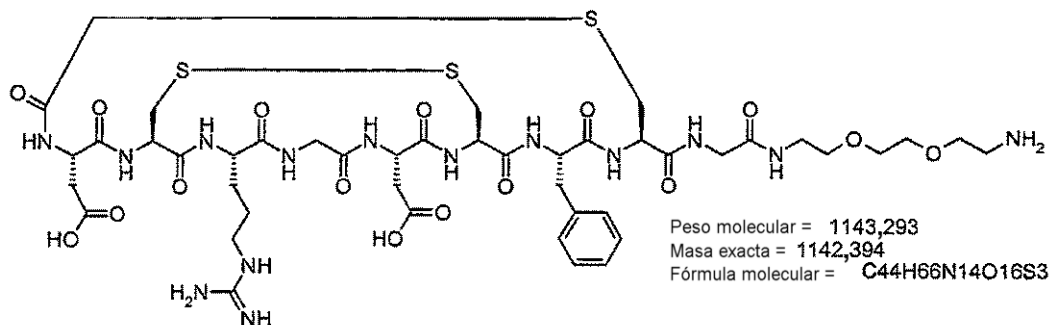
El péptido se sintetizó en un sintetizador de péptidos automático ABI 433A partiendo de resina O-Bis-(aminoetil) etilenglicol tritilo en una escala 0,25 mmol usando cartuchos amino de 1 mmol. Los aminoácidos se activaron previamente usando HBTU antes del acoplamiento. El N-terminal se cloroacetiló usando anhídrido cloroacético. La eliminación simultánea de péptido y grupos protectores de cadena lateral (excepto tBu) de la resina se realizó en TFA que contenía TIS (5%), H<sub>2</sub>O (5%) y fenol (2,5%) durante dos horas. Después del tratamiento se obtuvieron 364 mg de péptido bruto (HPLC Analítica: Gradiente de B al 5-50% durante 10 min en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%; 2 ml/min; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; detección UV 214 nm; tiempo de retención de producto 6,55 min). Se realizó una caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas por electronebulización: esperada M+H a 1293,5, encontrada a 1293,4).

2b. Síntesis de ciclo [CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>



Se disolvieron 250 mg de ClCH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> en agua/acetonitrilo. La mezcla se ajustó a pH 8 con solución de amoníaco y se agitó durante 18 horas. Después de la liofilización, se obtuvo el péptido bruto como un polvo blanco. (HPLC Analítica: Gradiente de B al 5-50% durante 10 min, en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%; flujo 2 ml/min; columna, Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 4,6 mm; detección UV 214 nm; tiempo de retención de producto 6,17min). Se realizó una caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas con electronebulización: esperada M+H a 1257,5, encontrada a 1257,6).

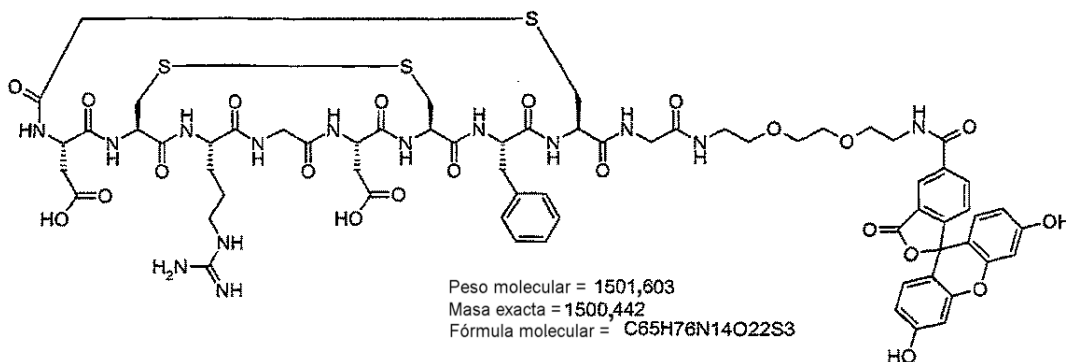
2.c Síntesis de [Cys<sup>2-6</sup>] ciclo[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>



Se disolvió ciclo[CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> en una solución de anisol (500 μl), DMSO (4 ml) y TFA (200 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min después de lo cual se eliminó el TFA al vacío y el péptido se precipitó por adición de éter dietílico. Se realizó una

5 purificación por HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21,20 mm) del material bruto usando B al 0-30%, en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%, durante 40 min a un caudal de 10 ml/min. Después de la liofilización se obtuvieron 44 mg de material bruto. (HPLC Analítica: Gradiente de B al 0-30% durante 10 min en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%; flujo 2 ml/min; columna, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4,6 mm; detección UV 214 nm; tiempo de retención de producto 5,88 min). Se realizó una caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas por electronebulización: esperada M+H a 1143,4, encontrada a 1143,5).

2d. Conjugación de [Cys<sup>2-6</sup>] ciclo [CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> con fluoresceína



10 Se disolvieron 10 mg de [Cys<sup>2-6</sup>] ciclo [CH<sub>2</sub>CONH-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 4,7 mg de éster de NHS de fluoresceína y 5  $\mu$ l de 4-metilmorfolina en DMF (0,5 ml) y la solución se agitó durante 3 horas. Se realizó una purificación por HPLC preparativa (columna Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 (2) 250 x 21,20 mm) del material bruto usando B al 0-30%, en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%, durante 40 min a un caudal de 10 ml/min. Después de la liofilización se obtuvieron 6 mg de material bruto. (HPLC Analítica: Gradiente de B del 0-30% durante 10 min en el que A = H<sub>2</sub>O/TFA al 0,1% y B = CH<sub>3</sub>CN/TFA al 0,1%; flujo 2 ml/min; columna, Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2) 50 x 4,6 mm; detección UV 214 nm; tiempo de retención de producto 10,07 min). Se realizó una caracterización de producto adicional usando espectrometría de masas por electronebulización: esperada M+H a 1501,4, encontrada a 1501,4).

20 LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Amersham Health AS
- <120> Compuestos basados en péptidos
- <130> PN0353
- <150> NO20033115
- <151> 08-06-2003
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Péptido sintetizado
- <400> 1

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys  
1 5

- <210> 2
- <211> 8

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintetizado

10 <220>  
 <221> TIOÉT.  
 <222> (1)..(8)  
 <223> Puente tioéter entre los aminoácidos 1 y 8.

15 <220>  
 <221> DISULFUR  
 <222> (2)..(6)  
 <223> Puente disulfuro entre los aminoácidos 2 y 6.

<400> 2

Lys	Cys	Arg	Gly	Asp	Cys	Phe	Cys
1				5			

20 <210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintetizado

<400> 3

Lys	Asp	Cys	Arg	Gly	Asp	Cys	Phe	Cys	Gly
1				5					10

30 <210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Péptido sintetizado

40 <220>  
 <221> TIOÉT.  
 <222> (1)..(3)  
 <223> Puente tioéter entre los aminoácidos 1 y 3.

45 <220>  
 <221> DISULFUR  
 <222> (7)..(9)  
 <223> Puente disulfuro entre los aminoácidos 7 y 9.

<400> 4

Lys	Asp	Cys	Arg	Gly	Asp	Cys	Phe	Cys	Gly
1				5					10

50 <210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> Péptido sintetizado

<400> 5

Lys	Cys	Arg	Gly	Asp	Cys	Phe	Cys
1				5			

<210> 6

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

5

<220>  
 <223> Péptido sintetizado

<220>  
 <221> TIOÉT.  
 <222> (1)..(6)  
 <223> Puente tioéter entre los aminoácidos 1 y 6.

10

<220>  
 <221> DISULFUR  
 <222> (2)..(6)  
 <223> Puente disulfuro entre los aminoácidos 2 y 8.

15

<400> 6  
Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys  
1 5

20

<210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>  
 <223> Péptido sintetizado

<400> 7  
Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys  
1 5

30

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

35

<220>  
 <223> Péptido sintetizado

<220>  
 <221> TIOÉT.  
 <222> (1)..(8)  
 <223> Puente tioéter entre los aminoácidos 1 y 8.

40

<220>  
 <221> DISULFUR  
 <222> (2)..(6)  
 <223> Puente disulfuro entre los aminoácidos 2 y 6.

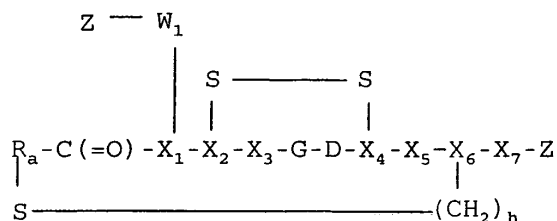
45

<400> 8  
Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys  
1 5

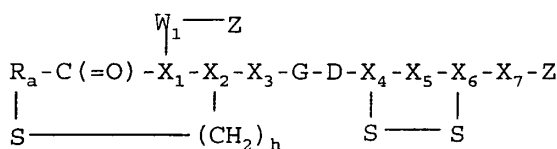


REIVINDICACIONES

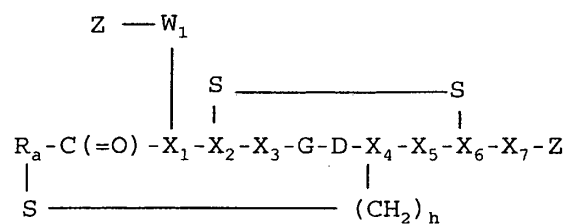
1. Un compuesto que comprende un vector peptídico y al menos un colorante de fluoresceína, en el que dicho compuesto se selecciona de una de las fórmulas:



5 (III)



(IV)



(V)

10 en las que:

15  $\text{R}_a$  representa  $-(\text{CH}_2)_n-$  o  $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}_6\text{H}_4-$  que forma un puente con  $\text{X}_2$ ,  $\text{X}_4$  o  $\text{X}_6$ , en las que  $n$  representa un número entero positivo de 1 a 10,

20  $\text{X}_1$  representa un enlace ó 1, 2, 3, 4 ó 5 restos aminoácidos, en el que un resto aminoácido está opcionalmente funcionalizado con un resto espaciador, o dicho resto aminoácido posee una cadena lateral funcional, tal como un grupo ácido o amina,

25  $\text{X}_2$ ,  $\text{X}_4$  y  $\text{X}_6$  representan restos aminoácidos que pueden formar un enlace disulfuro o tioéter,  $\text{X}_3$  representa arginina,  $\text{G}$  representa glicina,  $\text{D}$  representa ácido aspártico,  $\text{X}_5$  representa un aminoácido hidrófobo; y  $\text{X}_7$  representa un resto espaciador o biomodificador o está ausente, y  $\text{W}_1$  es un resto espaciador o está ausente,  $h$  es un número entero positivo 1 ó 2 y en el que al menos uno de los grupos  $\text{Z}$  que está presente representa un colorante de fluoresceína; o una sal fisiológicamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de fórmula III, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que  $\text{R}_a$  representa  $-(\text{CH}_2)-$ .

3. Un compuesto de fórmula III, de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2m en el que  $\text{X}_1$  representando un resto aminoácido con una cadena lateral funcional, tal como un grupo ácido o amina, seleccionándose el aminoácido de ácido aspártico, lisina, ácido glutámico, homolisina o ácido diaminoalifílico.

4. Un compuesto de fórmula III, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que  $\text{X}_2$ ,  $\text{X}_4$  y  $\text{X}_6$  representan independientemente un resto de cisteína o de homocisteína.

5. Un compuesto de fórmula III, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que X<sub>5</sub> representa fenilalanina, tirosina, una 3-yodo-tirosina o naftilalanina.
6. Un compuesto de fórmula III, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que X<sub>7</sub> comprende 1-10 unidades de un componente básico PEG monodisperso o está ausente.
- 5 7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, junto con uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
8. Compuestos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para usar como agente de contraste de formación de imágenes ópticas.
- 10 9. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la fabricación de un agente de contraste de formación de imágenes ópticas para usar en un procedimiento de diagnóstico que implique administrar dicho agente de contraste a un cuerpo humano o animal y generar una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.
- 15 10. Un procedimiento de generación de imágenes de un cuerpo humano o animal por formación de imágenes ópticas que implica generar una imagen de al menos una parte de dicho cuerpo en el que se ha distribuido un agente de contraste previamente administrado, **caracterizado porque** dicho agente de contraste comprende un compuesto reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.