

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 557**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05752383 .9**
96 Fecha de presentación: **15.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1765863**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **COMPUESTOS BASADOS EN PÉPTIDOS.**

30 Prioridad:
16.06.2004 NO 20042523

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.03.2012

73 Titular/es:
GE HEALTHCARE AS
PO BOX 4220, NYDALEN NYCOVEIEN 1-2
0401 OSLO, NO

72 Inventor/es:
CUTHBERTSON, Alan y
NAIRNE, Robert, James

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 376 557 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

Compuestos basados en péptidos

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos basados en péptidos y a su uso en técnicas de obtención de imágenes para el diagnóstico o para el tratamiento de una enfermedad. Más específicamente, la invención se refiere al uso de dichos compuestos basados en péptidos como vectores direccionadores que se unen a receptores asociados con la angiogénesis. Los compuestos pueden ser usados como agentes de contraste en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la angiogénesis o para el tratamiento de las mismas.

10 En general, pueden formarse nuevos vasos sanguíneos por medio de dos mecanismos diferentes: vasculogénesis o angiogénesis. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos por ramificación desde los vasos existentes. El principal estímulo para este proceso puede ser un suministro insuficiente de nutrientes y oxígeno (hipoxia) a las células en un tejido. Las células pueden responder secretando factores angiogénicos, de los cuales hay muchos; un ejemplo, al que se hace referencia con frecuencia, es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Estos factores inician la secreción de enzimas proteolíticas que descomponen las proteínas de la membrana basal, así como inhibidores que limitan la acción de estas enzimas, potencialmente dañinas. El otro efecto importante de los factores angiogénicos es hacer 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 en la parte vasolateral, no son sometidas a mitosis. El efecto combinado de la pérdida de unión y señales desde los receptores para factores angiogénicos, es hacer que las células endoteliales se muevan, se multipliquen y se reorganicen ellas mismas, y finalmente, para sintetizar una membrana basal alrededor de los nuevos vasos.

20 La angiogénesis es importante en el crecimiento y la remodelación de tejidos, incluyendo la cicatrización de heridas y los procedimientos inflamatorios. La inhibición de la angiogénesis es considerada también como una estrategia prometedora para la terapia antitumoral. Las transformaciones que acompañan a la angiogénesis son también muy prometedoras para el diagnóstico, siendo un ejemplo obvio una enfermedad maligna, pero el concepto representa también una gran promesa en la inflamación y en una diversidad de enfermedades relacionadas con la inflamación, incluyendo la aterosclerosis, siendo los macrófagos de lesiones ateroscleróticas tempranas fuentes potenciales de factores angiogénicos. Estos factores están implicados también en la revascularización de partes infartadas del miocardio, que ocurre si una estenosis es liberada en un corto período de tiempo.

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

30 Las enfermedades e indicaciones relacionadas con la angiogénesis son, por ejemplo, las diferentes formas de cáncer y metástasis, por ejemplo, cáncer de mama, de la piel, colorrectal, de páncreas, de próstata de pulmón o de ovario.

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

35 Enfermedades e indicaciones adicionales asociadas con la angiogénesis son malformaciones arteriovenosas, astrocitomas, coriocarcinomas, glioblastomas, gliomas, hemangiomas (capilar en la infancia), hepatomas, hiperplasia de endometrio, miocardio isquémico, endometriosis, sarcoma de Kaposi, degeneración macular, melanoma, neuroblastomas, enfermedad arterial periférica oclusiva, artrosis, psoriasis, retinopatía (diabética, proliferativa), esclerodermia, seminomas y colitis ulcerosa.

40 La angiogénesis implica receptores que son exclusivos de las células endoteliales y los tejidos circundantes. Estos marcadores incluyen receptores de factores de crecimiento, tales como receptores de la familia de las integrinas y VEGF. Los estudios inmunohistoquímicos han demostrado que una diversidad de integrinas, quizás de manera más importante, la clase α_v , son expresadas en la superficie apical de los vasos sanguíneos [Conforti, G., et al. (1992) Blood 80: 37-446] y están disponibles para ser direccionados por los ligandos circulantes [Pasqualini, R., et al. (1997) Nature Biotechnology 15: 542-546]. La $\alpha_5\beta_1$ es también una integrina importante en la promoción del ensamblado de la matriz de fibronectina y el inicio de la adhesión celular a fibronectina. También desempeña un papel crucial en la migración celular.

45 La integrina $\alpha_v\beta_3$ es uno de los receptores que se sabe que está asociado con la angiogénesis. Las células endoteliales estimuladas parecen depender de este receptor para la supervivencia durante un período crítico del procedimiento de angiogénesis, ya que los antagonistas de la interacción ligando/receptor de integrina $\alpha_v\beta_3$ inducen apoptosis e inhiben el crecimiento de vasos sanguíneos.

50 Las integrinas son moléculas heterodiméricas en las que las sub-unidades α y β penetran en la bicapa lipídica de la membrana celular. La subunidad α tiene cuatro dominios de unión de Ca^{2+} en su cadena extracelular, y la subunidad β tiene un número de dominios extracelulares ricos en cisteína.

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

Se conoce que los péptidos RGD se unen a una serie de receptores de integrina y que tienen el potencial para regular una serie de eventos celulares de considerable aplicación en el ámbito clínico. Quizás, el efecto más estudiado de los péptidos RGD y sus miméticos se refiere a su uso como agentes antitrombóticos, donde están dirigidos a la integrina GpIIb/IIIa de plaqueta.

La inhibición de la angiogénesis en los tejidos mediante la administración de cualquiera de entre un antagonista $\alpha\beta 3$ o $\alpha\beta 5$ ha sido descrita, por ejemplo, en los documentos WO 97/06791 y WO 95/25543, usando péptidos que contienen RGD o anticuerpos. El documento EP 578083 describe una serie de péptidos que contienen RGD mono-cíclico. Los péptidos RGD cíclicos, que contienen múltiples puentes, han sido descritos también en los documentos WO 98/54347 y WO 95/14714.

Ejemplos adicionales de compuestos basados en péptidos que comprenden RGD se encuentran en los documentos WO01/77145, WO02/26776 y WO 03/006491. El documento WO01/77145 divulga péptidos bicíclicos de tipo RGD conjugados con una fracción indicadora. El documento WO05/003466 divulga además péptidos de tipo RGD conjugados con fluoresceína, para su uso en técnicas de obtención de imágenes ópticas.

Existe una necesidad clínica para el desarrollo de técnicas de obtención de imágenes, no invasivas, más específicas, para enfermedades relacionadas con angiogénesis y para la terapia de dichas enfermedades. Dichas técnicas de obtención de imágenes desempeñarán un papel central en la evaluación de nuevas terapias anti-angiogénicas. La capacidad de evaluación del nivel real de la angiogénesis será clínicamente beneficiosa en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la angiogénesis en una etapa temprana. Pueden usarse técnicas de obtención de imágenes ópticas para evaluar el nivel de angiogénesis, y la invención proporciona nuevos compuestos útiles como agentes de contraste para técnicas de obtención de imágenes ópticas para este propósito.

En vista de las necesidades de la técnica, la invención proporciona compuestos basados en péptidos marcados con tintes de cianina, para su uso como agentes de contraste en un tratamiento terapéutico con técnicas de obtención de imágenes ópticas. La eficiente direccionamiento y obtención de imágenes de los receptores de integrina asociados con la angiogénesis in vivo exige un vector de tipo RGD, de alta afinidad, selectivo, que sea químicamente robusto y estable. Además, la ruta de eliminación es un factor importante cuando se diseñan agentes para obtención de imágenes para reducir problemas con el ruido de fondo. Estas rigurosas condiciones las cumplen los compuestos peptídicos marcados con tinte de cianina, descritos en la presente invención.

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

Los compuestos, o sus sales fisiológicamente aceptables, comprenden un vector peptídico y al menos un tinte de cianina sustituido tal como se ha descrito anteriormente, en el que el vector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos X_3 -G-D y en el que el vector peptídico y el al lo menos un tinte de cianina están acoplados, preferentemente mediante un enlace covalente. X_3 representa arginina, G representa glicina y D representa ácido aspártico. El vector peptídico tiene afinidad por los receptores de integrina, tales como los receptores $\alpha\beta 3$.

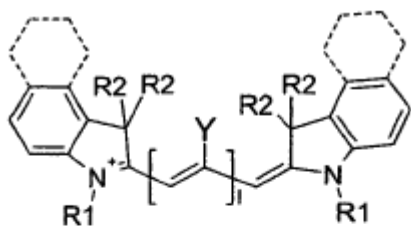
El tinte de cianina (CyDyeTM) está representado, en adelante, en la presente memoria, por la letra Z. Los tintes de cianina son compuestos definidos por una cadena de polieno que contiene un número impar de átomos de carbono unidos alternando enlaces carbono-carbono, únicos y múltiples, preferentemente dobles, terminados en ambos extremos por un grupo amino, uno de los cuales está cuaternizado. Los cromóforos aril-ligador-aril análogos y la cianina presentan, opcionalmente, sustituyentes de anillo, colgantes o fusionados. Una descripción general de los tintes de cianina y su síntesis se describen en los documentos US 6.048.982 y US 5.268.486. Los tintes de cianina son particularmente útiles debido al amplio rango de propiedades espectrales y variaciones estructurales disponibles. Un rango de tintes de cianina son bien conocidos y han sido ensayados, tienen una baja toxicidad, y están disponibles comercialmente (GE Healthcare, anteriormente Amersham Biosciences). Los tintes de cianina son una única familia de tintes muy intensos, con buena solubilidad en agua. Son insensibles al pH entre pH 3-10, presentan baja unión no específica y son más fotoestables que la fluoresceína.

La presente invención permite que los tintes de cianina sean conjugados con los vectores peptídicos, resultando en una menor retención de acumulación de sangre. La invención proporciona un compuesto que comprende tintes de cianina con dos, una o ninguna fracción de ácido sulfónico. Los tintes con un número reducido de fracciones de ácido

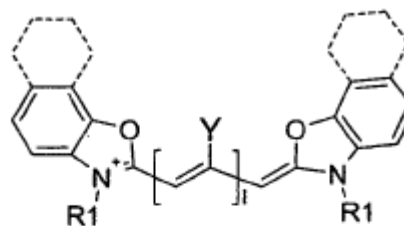
sulfónico, cuando son conjugados con péptidos, tales como el péptido RGD, poseen menor unión de plasma sanguíneo y menor unión no específica a tejido de fondo. Los grupos de ácido sulfónico imparten cierta hidrofiliidad a los tintes, una característica necesaria para obtención de imágenes *in vivo*. Tradicionalmente, los tintes de cianina han sido usados *in vitro* cuando la polisulfonación de los tintes era importante para hacer que los tintes fueran muy solubles en agua. Sorprendentemente, se ha descubierto que eliminando los grupos de ácido sulfónico del tinte, se experimenta una biodistribución más óptima de los compuestos.

Cada uno de los tintes de cianina adecuados comprenden 2, 1 o ninguna fracción de ácido sulfónico para reducir la unión a plasma sanguíneo y la unión no específica del compuesto basado en péptidos. Sorprendentemente, se encontró que los compuestos eran suficientemente hidrófilos para ser solubles en agua.

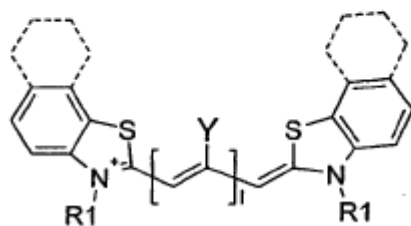
El tinte de cianina es seleccionado, preferentemente, de entre los grupos consistentes en carbacianinas, oxacianinas, tiacianinas y azacianinas, mostradas, a continuación, por las fórmulas generales.



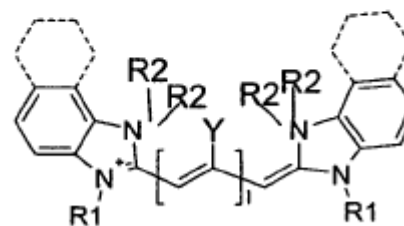
Fórmula I. Carbacianinas



Fórmula II. Oxacianinas



Fórmula III. Tiacianinas



Fórmula IV. Azacianinas

En estas estructuras, los grupos R1 son iguales o diferentes y son grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, preferentemente alquilos C1 a C6, y pueden comprender un éter o un grupo -N-CO-N-. Los grupos alquilo están sustituidos opcionalmente con grupos carboxi, ácido sulfónico, amina, amonio o éster. Los grupos R1 pueden formar puentes con cualquiera de los átomos de carbono de las cadenas de polieno, por ejemplo, por medio de un grupo -N-CO-N- o un grupo éter. Los grupos R2 son también iguales o diferentes y son grupos alquilo sustituidos o no sustituidos. Los grupos alquilo están sustituidos opcionalmente con grupos carboxi o ácido sulfónico, pero preferentemente los grupos R2 son grupos alquilo inferior, tales como alquilos C1 a C6 y, más preferentemente, grupos metilo. Los grupos aromáticos opcionales se indican por medio de líneas de puntos, para cubrir ambas estructuras que comprenden anillos benzo condensados y anillos nafto condensados. Los anillos son sustituidos o no sustituidos. Los anillos pueden ser sustituidos con grupos ácido sulfónico, grupos carboxílicos, grupos hidroxilo, grupos alquil(sulfoalquil)amino, grupos bis(sulfoalquil)amino, grupos sulfoalkoxi, grupos sulfoalquilsulfonylo, grupos alquilo o alquilo sustituidos o grupos sulfoalquilamino. Los grupos alquilo son, preferentemente, alquilos con, por ejemplo, 1 a 6 átomos de carbono. Y es seleccionado de entre hidrógeno, un grupo haluro, un grupo amina o un sulfonylo y es preferentemente hidrógeno. La cadena de polieno del tinte de cianina puede contener también uno o más grupos químicos cíclicos que forman puentes entre dos o más de los átomos de carbono de la cadena de polieno, por ejemplo, incluyendo un grupo -CO- entre dos de los átomos de carbono de la cadena, tal como en los tintes de squaraine, o incluyendo un puente alquilo. Estos puentes podrían servir para aumentar la fotoestabilidad química del tinte.

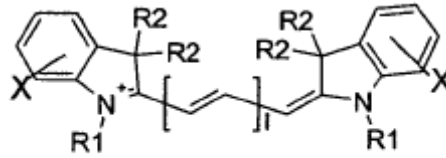
En las fórmulas I a IV, I es un entero positivo 1, 2, 3 o 4 que proporciona tintes de cianina trimetino, pentametina, heptametina o nonametina. Preferentemente, el tinte de cianina es un tinte de pentametina o heptametina con puentes de carbono de 5 y 7 átomos de carbono, respectivamente.

Con referencia a las fórmulas I-IV, los tintes adecuados, en su conjunto, tienen 2, 1 o ninguna fracción ácido sulfónico

fijada a los anillos indol o a los anillos benzeindol.

Los tintes preferentes son seleccionados de entre el grupo de carbacianinas. Y, aún son más preferentes los tintes de carbacianina del tipo indol. Los tintes preferentes de este tipo se ilustran por medio de la fórmula V:

5



(V)

10

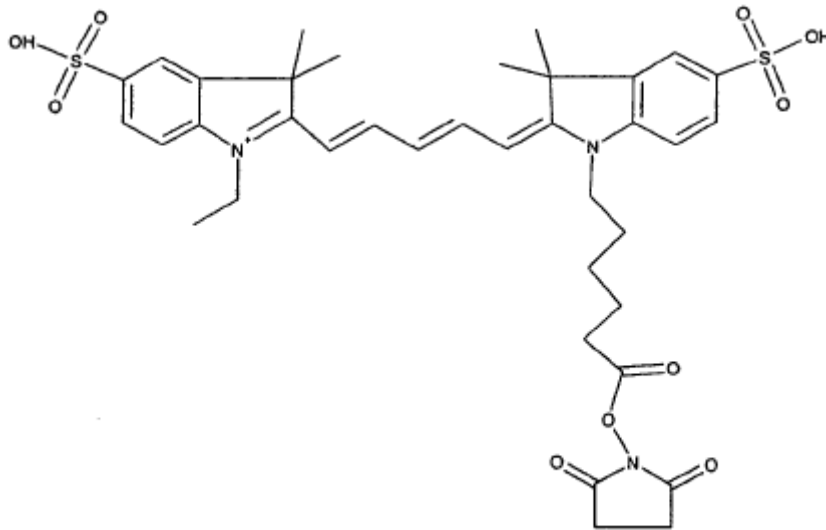
en la que X es una fracción ácido sulfónico o está ausente, los grupos R1 son iguales o diferentes y son grupos alquilo inferior, sustituidos o no sustituidos, por ejemplo, grupos alquilo C1 a C6 que están opcionalmente sustituidos. Los grupos alquilo son sustituidos, por ejemplo, con grupos carboxi, ácido sulfónico, aminas, amonio o éster, tales como grupos éster heterocíclicos (por ejemplo, NHS-éster). Los grupos R2 son grupos alquilo inferior, tales como alquilos C1 a C6, preferentemente grupos metilo, opcionalmente sustituido, por ejemplo, con grupos ácido sulfónico o carboxi. I es 1,2 o 3. Los tintes adecuados de Formula V comprenden dos, una o ninguna fracción ácido sulfónico.

15

R1, R2 y X son potenciales sitios de unión para la unión del tinte al vector peptídico, siendo el grupo R1 y X preferente. En un aspecto preferente, un grupo R1 está unido al vector peptídico mientras que el otro grupo R1 es un grupo alquilo inferior opcionalmente sustituido.

Los tintes más preferentes son Cy5 mono NHS-éster bis SO₃ y Cy7 mono NHS-éster bis SO₃, mostrados a continuación:

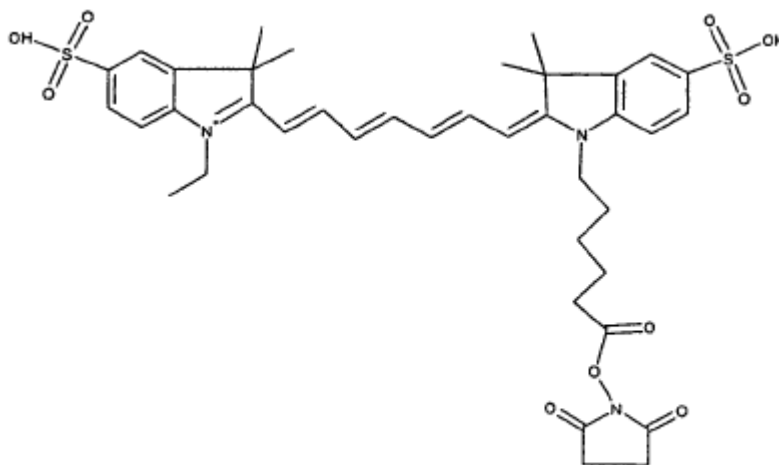
20



25

30

Cy5 mono NHS-éster bis SO₃

Cy7 mono NHS-éster bis SO₃

Los tintes de cianina adecuados para su uso en los compuestos de la invención tienen un espectro de emisión en el rango visible o infrarrojo cercano, preferentemente en el rango de 500-900 nm y, más preferentemente, en el rango de 650-850 nm.

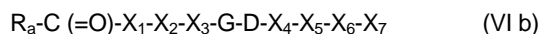
Los compuestos de la invención comprenden la secuencia de aminoácidos X₃-G-D, que tiene afinidad por los receptores de integrina. El compuesto comprende, preferentemente, aminoácidos adicionales y, opcionalmente, otras fracciones, en las que la secuencia X₃-G-D es el sitio de unión del vector peptídico que funciona como un vector que se une a un receptor de tipo integrina.

El compuesto de la invención puede ser restringido, por ejemplo, mediante la formación de uno o más puentes de ciclado en la parte del vector peptídico. Un compuesto peptídico monocíclico puede ser obtenido mediante la formación de un enlace disulfuro o un enlace tioéter entre aminoácidos. Un compuesto basado en péptidos, que incluye un puente de ciclado, es más específico hacia αβ3, y es más preferente que un péptido lineal. Los compuestos de la invención comprenden, preferentemente, dos puentes de ciclado entre diferentes aminoácidos de los compuestos o entre los aminoácidos de otras fracciones. La expresión "puentes de ciclado" se refiere a cualquier combinación de aminoácidos con grupos funcionales, que permita la introducción de un puente, o entre aminoácidos y grupos -(CH₂)_n- o -(CH₂)_n-C₆H₄. n representa un número entero positivo de 1 a 10. Algunos ejemplos preferentes son disulfuros, miméticos de disulfuro, tales como el puente -(CH₂)₄-carba, tioacetal, puentes tioéter (cistationa o lantionina) y puentes que contienen ésteres y éteres. Preferentemente, un puente forma un enlace disulfuro y un segundo puente comprende un enlace tioéter (sulfuro).

En una realización adicional, el compuesto de la invención está identificado por la fórmula (VI a)



en la que A está identificado por la fórmula (VI b)



y Z representa al menos un tinte de cianina sustituido, según se ha descrito anteriormente, unido a uno o más de entre X₁, X₆ o X₇ de A, opcionalmente a través de un grupo espaciador,

comprendiendo el compuesto dos puentes de ciclado,

en la que,

X₃, G y D son tal como se han definido anteriormente;

R_a representa un grupo -(CH₂)_n- o -(CH₂)_n-C₆H₄-, que forma parte de un puente que se une a cualquiera de entre X₂, X₄ o X₆, en la que n representa un número entero positivo de 1 a 10;

X₁ representa un enlace o 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos, en el que al menos un residuo de aminoácido está funcionalizado opcionalmente con una fracción espaciadora y, preferentemente, dicho residuo de aminoácido posee una cadena lateral funcional, tal como un ácido o un grupo amino, y es seleccionado, preferentemente, de entre ácido

aspártico o glutámico, homolisina o un ácido diaminoalílico, tal como lisina, o ácido diaminopropiónico, y

X_2 y X_4 representan, independientemente, residuos de aminoácidos capaces de formar un puente de ciclado, tales como residuos de cisteína u homocisteína que forman enlaces disulfuro o tioéter, u otros residuos de aminoácidos capaces de formar un puente de ciclado, tal como ácido aspártico y lisina, preferentemente, X_2 y X_4 representan

5 residuos de cisteína u homocisteína y, preferentemente, X_2 y X_4 forman puentes de ciclado entre sí o con R_a o X_6 , y

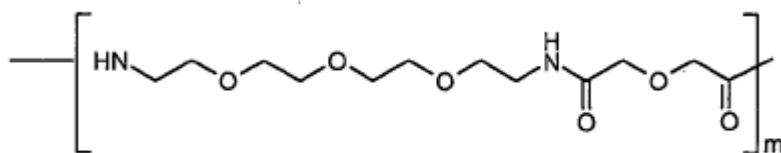
X_5 representa un aminoácido hidrófobo o sus derivados y, preferentemente, representa un residuo de naftilalanina, tirosina, fenilalanina o 3-yodo-tirosina y, más preferentemente, un residuo de 3-yodo-tirosina o fenilalanina, y

X_6 representa un residuo de aminoácido capaz de formar un puente de ciclado, preferentemente un residuo de aminoácido que contiene tiol, preferentemente, un residuo de homocisteína o cisteína y, preferentemente, X_6 forma un

10 puente de ciclado con R_a , X_2 o X_4 , y

X_7 representa una fracción biomodificadora o espaciadora o está ausente, y preferente comprende un bloque de construcción de polietilenglicol monodispersado (PEG) que comprende de 1 a 10 unidades de dicho bloque de construcción, teniendo dicho biomodificador la función de modificar la farmacocinética y las tasas de depuración sanguínea de dichos agentes. Además, X_7 puede representar también 1-10 residuos de aminoácidos que comprenden,

15 preferentemente, glicina, lisina, ácido aspártico o serina. X_7 puede representar también un espaciador o biomodificador que comprende tanto residuos de aminoácidos como una estructura de tipo PEG, preferentemente, una combinación bis aminoetil etilen glicol glicina. En una realización preferente, X_7 representa una unidad compuesta por la estructura de tipo PEG, monodispersada, ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanoico de fórmula (X),



(X)

25 en la que m es un entero de 1 a 10 y en la que el terminal C es una fracción ácida o amida. Se ha encontrado que el biomodificador, X_7 , modifica la farmacocinética y las tasas de depuración sanguínea de los compuestos. El biomodificador produce una menor captación de los compuestos en el tejido, es decir, músculo, hígado, etc., proporcionando, de esta manera, una mejor imagen de diagnóstico debido a una menor interferencia debida al ruido de fondo. La secreción es principalmente a través de los riñones y esto representa una ventaja adicional del

30 biomodificador.

El compuesto basado en péptidos comprende un vector peptídico definido por la secuencia de aminoácidos formada por X_1 , X_2 , X_3 , G, D, X_4 , X_5 y X_6 de Fórmula VI b y este péptido constituye un vector direccionador que tiene afinidad por los receptores de integrina asociados con la angiogénesis.

35 Dependiendo de la colocación de los puentes de ciclado, los compuestos comprenderán configuraciones "discretas", "anidadas" o "entrelazadas". Preferentemente los dos puentes en cada uno de los compuestos son:

Entre R_a y X_6 , y entre X_2 y X_4 (formando una configuración anidada),

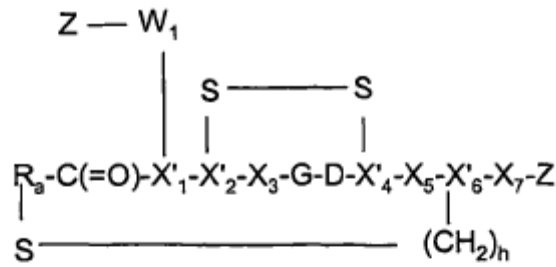
Entre R_a y X_2 , y entre X_4 y X_6 (configuración discreta);

Entre R_a y X_4 , y entre X_2 y X_6 (formando una configuración entrelazada).

En una realización preferente, un puente forma un enlace tioéter y el segundo puente forma un puente disulfuro.

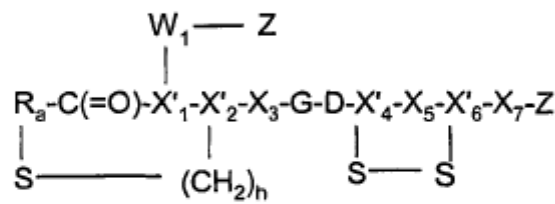
40 En una realización adicional, los compuestos de la invención están identificados por cualquiera de las fórmulas siguientes:

5



(VII)

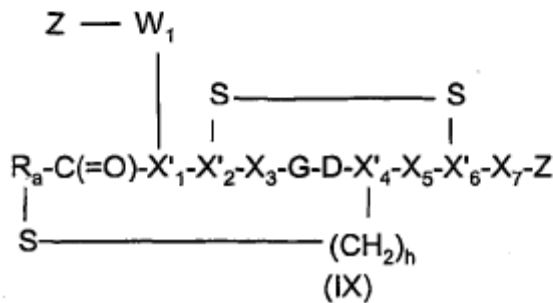
10



15

(VIII)

20



25

(IX)

en las que R_a, X₃, G, D, X₅ y X₇ son tal como se han definido para la fórmula VI b; y en las que

X'₁ comprende un residuo de aminoácido con una cadena lateral funcional, tal como un grupo ácido o amino, siendo seleccionado, preferentemente, el aminoácido de entre ácido aspártico o glutámico, homolisina o un ácido diaminoalcalílico, tal como lisina o ácido diaminopropiónico, más preferentemente, ácido aspártico o lisina;

30 X'₂, X'₄ y X'₆ representan residuos de aminoácidos que forman un enlace tioéter o disulfuro, tales como cisteínas u homocisteínas, mostrándose los enlaces disulfuro y tioéter;

W₁ es una fracción espaciadora o está ausente y, preferentemente, es derivado de ácido glutámico y/o ácido succínico y/o una unidad basada en polietilenglicol que une el indicador tinte de cianina al péptido. Otros elementos espaciadores (W₁) representativos incluyen polisacáridos de tipo estructural, polisacáridos de tipo almacenamiento, poliaminoácidos y sus ésteres metílicos y etílicos, y polipéptidos, oligosacáridos y oligonucleótidos, que pueden contener o no sitios de escisión de enzimas. El papel de la fracción espaciadora W₁ es alejar el tinte relativamente voluminoso del dominio de unión a receptor del componente peptídico;

h es un entero positivo de 1 o 2,

y en las que al menos uno de los grupos Z está presente, representando Z un tinte de cianina.

Preferentemente, los compuestos incluyen sólo un grupo Z.

El tinte de cianina, representado por Z, está unido a X₁, W₁, X₆ o X₇ del vector peptídico, por ejemplo, mediante la formación de un enlace amida, un enlace sulfonamida o un enlace tioéter. Un enlace amida es formado, por ejemplo, a partir de una reacción entre una amina y un grupo carboxílico, un enlace sulfonamida es formado, por ejemplo, a partir de una reacción entre una amina y un ácido sulfónico activado y un enlace tioéter es formado, por ejemplo, a partir de una reacción entre un tiol y un haluro. X₁ del vector peptídico, que comprende al menos un aminoácido con una cadena lateral funcional, constituye un punto de fijación preferente para el tinte de cianina. Los ésteres activos de los tintes de cianina, tales como ésteres NHS, se consideran particularmente útiles cuando se sintetizan compuestos que forman un enlace amida al vector peptídico.

En un aspecto preferente, los compuestos de fórmula VII-IX, o sus sales fisiológicamente aceptables, tienen las características siguientes:

preferentemente, R_a representa -(CH₂)_n-.

Además, X₁ representa un residuo de aminoácido con una cadena lateral funcional, tal como un grupo ácido o amino, siendo seleccionado, preferentemente, el aminoácido de entre ácido aspártico o glutámico, homolisina o un ácido diaminoalifático, tal como lisina o ácido diaminopropiónico, más preferentemente ácido aspártico o lisina.

Preferentemente, X₂, X₄ y X₆ representan, independiente, un residuo de homocisteína o cisteína.

Preferentemente, X₃ representa arginina.

Preferentemente, X₅ representa tirosina, fenilalanina, 3-yodo-tirosina o naftilalanina y, más preferentemente, fenilalanina o 3-yodo-tirosina.

X₇ y W₁ son tal como se han definido para la fórmula VI b. Preferentemente, X₇ comprende 1-10 unidades de un bloque de construcción PEG monodispersado o está ausente y, preferentemente, W₁ está ausente.

Z representa un tinte de cianina o está ausente, de manera que el compuesto comprende al menos una fracción de tinte de cianina.

En un aspecto preferente, los compuestos son de fórmula VII (anidados) o sus sales fisiológicamente aceptables y, más preferentemente, tienen las características indicadas anteriormente.

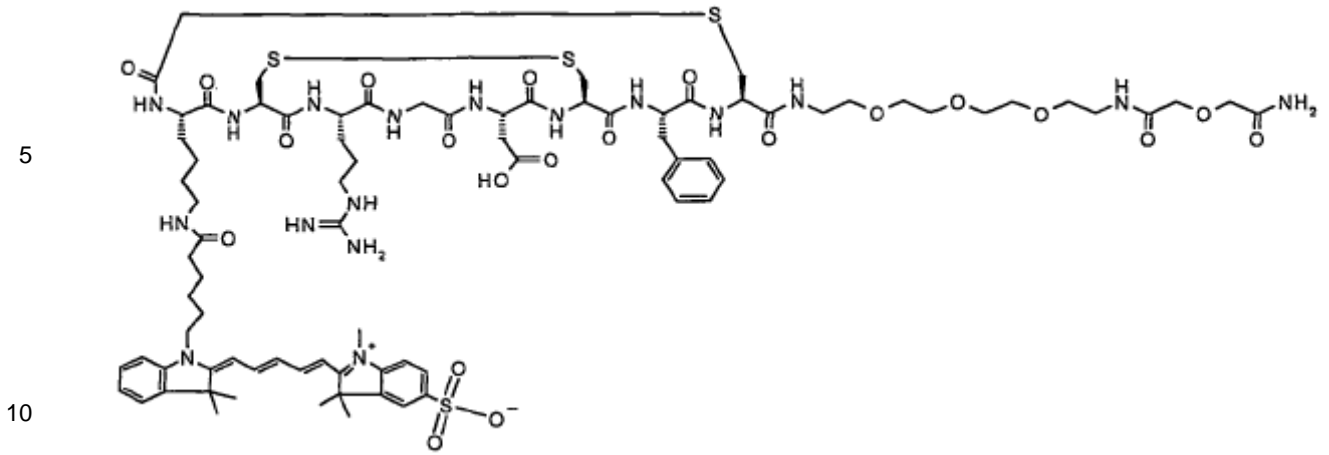
Cualquiera de los residuos de aminoácidos, tal como se definen en la fórmula VI b, puede representar, preferentemente, un aminoácido natural. En la mayoría de los casos, es preferente que los aminoácidos en el vector peptídico estén, todos ellos, en la forma-L. Sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, uno, dos, tres o más de los aminoácidos en el péptido están, preferentemente, en la forma D. La inclusión de dichos aminoácidos de forma D puede tener un efecto considerable en el aumento de la estabilidad sérica del compuesto.

Algunos de los compuestos de la invención son vectores de tipo RGD, de alta afinidad. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "vector de tipo RGD de alta afinidad" se refiere a compuestos que tienen un valor K_i de < 10 nM y, preferentemente, < 5 nM, en un ensayo de unión competitiva para integrina α_vβ₃ y donde el valor K_i fue determinado mediante competición con el ligando de alta afinidad equistatina, conocido. Los procedimientos para la realización de dichos ensayos de competición son bien conocidos en la técnica.

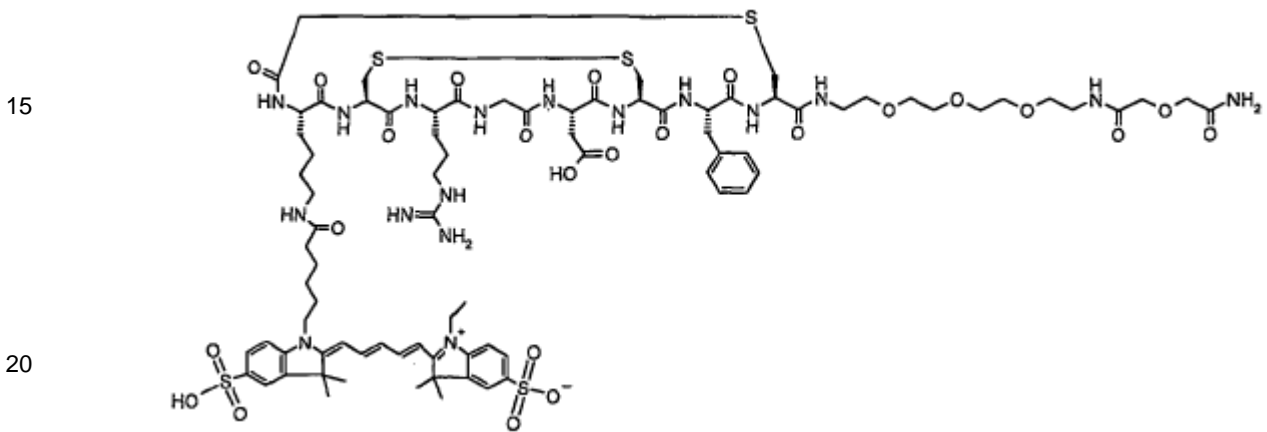
Los compuestos definidos por la presente invención son sorprendentemente estables in vivo y bajo las condiciones empleadas durante el marcado con un tinte de cianina.

A continuación, se ilustran algunos ejemplos de compuestos de la invención. Los compuestos A, B y C comprenden carbocianina pentametina con, respectivamente, uno, dos o cuatro grupos ácido sulfónico conjugados con un péptido que contiene RGD (Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys). Los compuestos A y B comprenden un tinte Cy5, mientras que el compuesto C comprende un tinte Cy5.5:

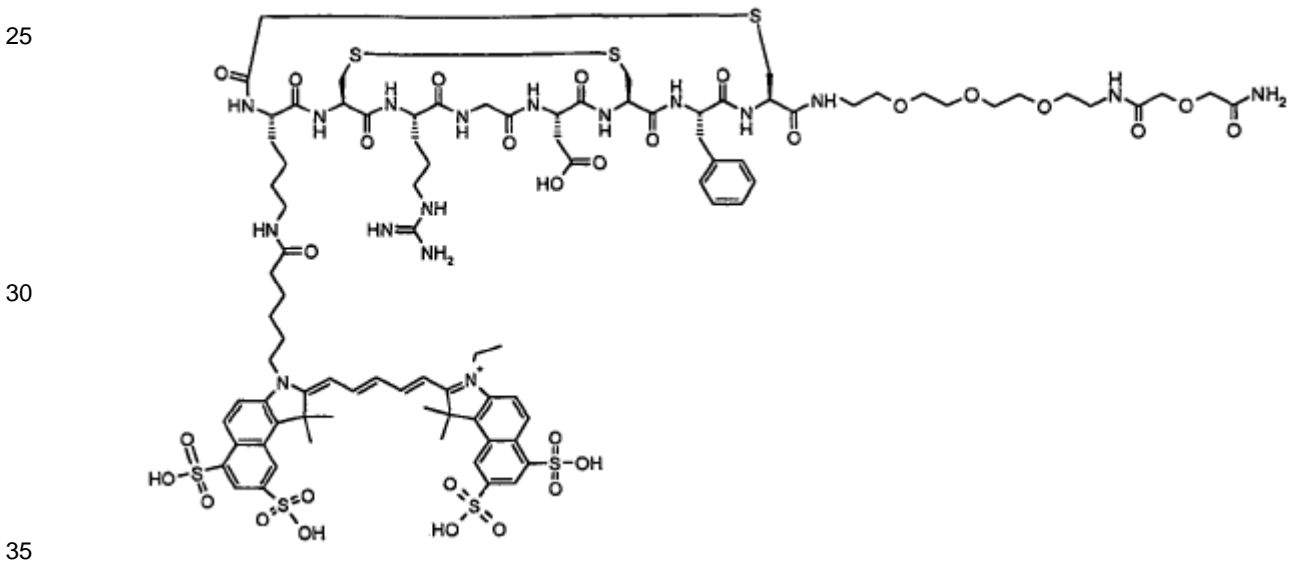
Compuesto A:



Compuesto B:

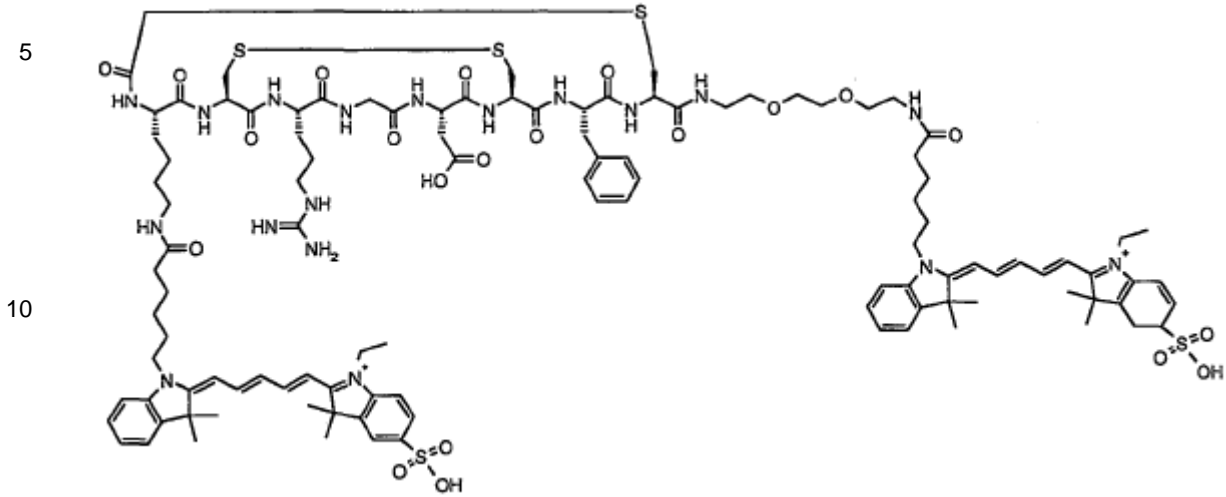


Compuesto C:

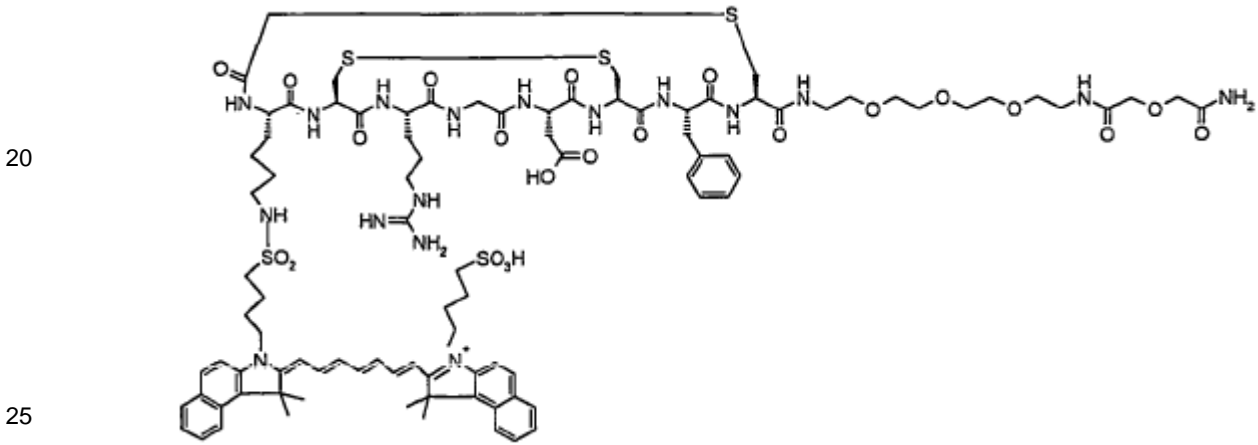


Compuesto D:

El compuesto comprende un péptido de tipo RGD (Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys) unido a dos grupos de tinta de cianina (Cy5).

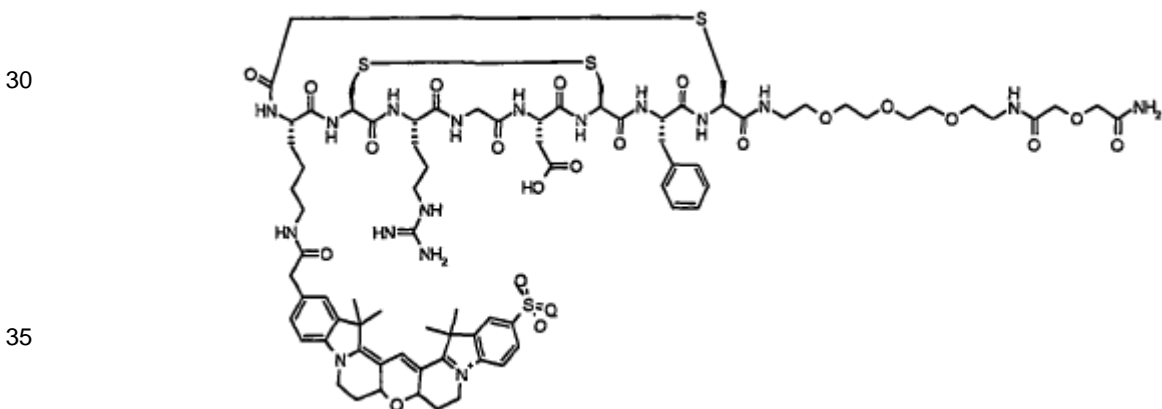


15 Compuesto E: El compuesto comprende el péptido Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys unido a verde de indocianina (ICG).



Compuesto F:

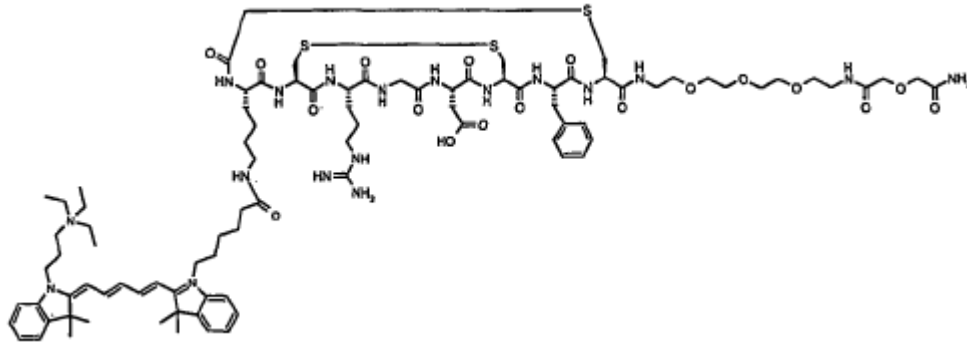
El compuesto comprende el péptido Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys unido a Cy3B.



Compuesto G:

El compuesto comprende el péptido Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys unido a un Cy5 en el que R1 es un grupo amonio sustituido con alquilo.

5

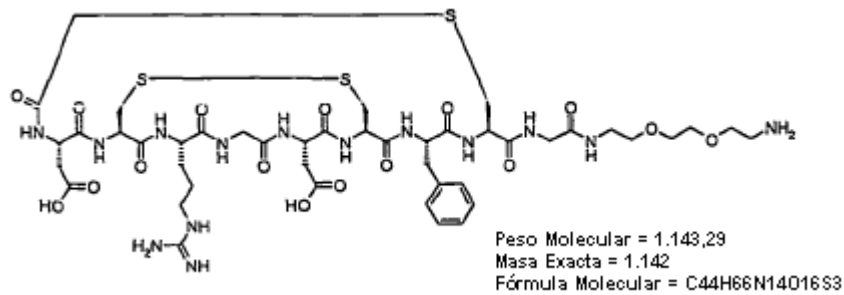


10

Compuesto H:

El compuesto peptídico mostrado a continuación, que comprende un péptido Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys, puede ser unido a un tinte de cianina uniendo el ácido aspártico (X₁) a un tinte de cianina funcionalizado con amina o haciendo reaccionar un tinte de cianina NHS-éster con el PEG-amino posicionado en X₇.

15



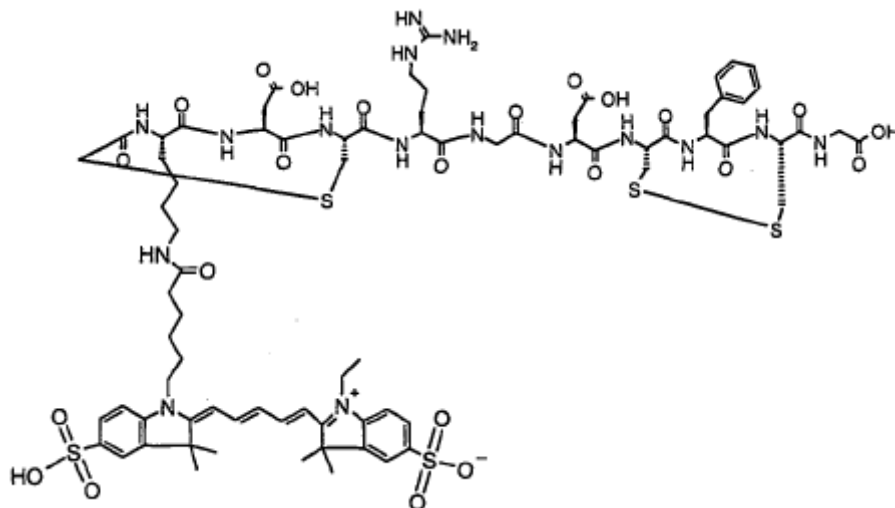
20

25

Compuesto I:

El compuesto comprende el péptido Lys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys-Gly unido a un Cy5.

30

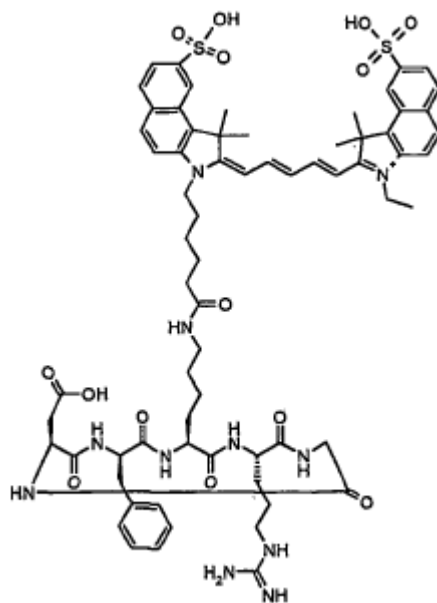


35

Compuesto J: c[-Asp-D-Phe-Lys(Cy5.5)-Arg-Gly-]

5

10



15

Los nuevos compuestos de la invención pueden ser usados como agentes de contraste en técnicas de obtención de imágenes ópticas o para el tratamiento de enfermedades. Una realización preferente de la invención son compuestos, tales como los descritos, para su uso en técnicas de obtención de imágenes ópticas y, preferentemente, para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la angiogénesis.

20

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

25

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva, por ejemplo, una cantidad efectiva para mejorar el contraste de imagen en técnicas de obtención 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.

30

Vista desde un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un compuesto de la invención para la fabricación de un agente de contraste para técnicas de obtención de imágenes ópticas para su uso en un procedimiento de diagnóstico que implica la administración de dicho agente de contraste al cuerpo de un ser humano o un animal y la generación de una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.

35

Vista desde otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para generar una imagen del cuerpo de un ser humano o un animal, mediante técnicas de obtención de imágenes ópticas que implican generar una imagen de al menos una parte de dicho cuerpo, al cual se ha administrado previamente un agente de contraste, en el que, como dicho agente de contraste, se usa un compuesto, tal como se ha descrito anteriormente.

40

Vista desde otro aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para generar imágenes mejoradas del cuerpo de un ser humano o un animal mediante técnicas de obtención de imágenes ópticas, al cual se ha administrado previamente una composición de agente de contraste que comprende un compuesto, tal como se ha definido, cuyo procedimiento comprende la generación de una imagen de al menos parte de dicho cuerpo .

45

Vista desde un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de supervisión del efecto del tratamiento del cuerpo de un ser humano o un animal con un fármaco para combatir una afección asociada con la angiogénesis, implicando dicho procedimiento la detección de la captación de un agente administrado previamente por los receptores celulares, preferentemente, receptores de las células endoteliales y, en particular, receptores $\alpha v \beta 3$, siendo realizadas dicha administración previa y dicha detección, de manera opcional, pero preferentemente, de manera repetida, por ejemplo, antes, durante y después del tratamiento con dicho fármaco. Comprendiendo dicha detección una técnica de obtención de imágenes ópticas.

Los agentes de contraste de la invención están destinados para su uso en técnicas de obtención de imágenes ópticas. Cualquier procedimiento que forma una imagen para el diagnóstico de una enfermedad, el seguimiento del desarrollo de una enfermedad o para el seguimiento del tratamiento de una enfermedad, en base a la interacción con luz en el espectro electromagnético que va desde la radiación ultravioleta hasta el infrarrojo cercano, está incluido en la expresión técnica de obtención de imágenes ópticas. Las técnicas de obtención de imágenes ópticas incluyen todos los procedimientos desde la visualización directa, sin el uso de ningún dispositivo, y con el uso de dispositivos tales como diversos endoscopios, catéteres y equipos de obtención de imágenes ópticas, por ejemplo, hardware basado en ordenador para presentaciones tomográficas. Los agentes de contraste serán útiles con modalidades de obtención de imágenes ópticas y técnicas de medición, incluyendo pero sin limitarse a: obtención de imágenes de luminiscencia, endoscopia, endoscopia de fluorescencia, tomografía de coherencia óptica, obtención de imágenes por transmitancia, obtención de imágenes por transmitancia con resolución temporal; obtención de imágenes confocales, microscopía no lineal; obtención de imágenes fotoacústicas; obtención de imágenes acústico-ópticas, espectroscopia, a espectroscopia de reflectancia; interferometría; interferometría de coherencia, tomografía óptica difusa y tomografía óptica difusa mediada por fluorescencia (onda continua, sistema en dominio temporal y en dominio de la frecuencia), y medición de dispersión, absorción, polarización, luminosidad de la luz, tiempo de vida media de fluorescencia, rendimiento cuántico, y desactivación. Los procedimientos de diagnóstico mediante obtención de imágenes ópticas, basados en medición o identificación de fluorescencia, son preferentes.

Los vectores peptídicos de los compuestos de la presente invención pueden ser sintetizados usando procedimientos conocidos de síntesis química y particularmente útil es la metodología de fase sólida de Merrifield, que emplea un sintetizador de péptidos automatizado (J. Am. Chem. Soc. , 85: 2149 (1964)). Además, puede realizarse, automáticamente, un acoplamiento de un tinte de cianina, tal como un éster activo de tinte de cianina, empleando un sintetizador de péptidos automatizado obteniendo un enlace amida entre el péptido y la fracción de tinte de cianina. Otros enlaces entre el tinte de cianina y el péptido, tales como enlaces tioéter o sulfona amida pueden ser obtenidos también automáticamente, o la reacción del tinte y el péptido puede ser realizada mediante una síntesis química manual ordinaria. La síntesis de péptidos mediante técnicas de fase sólida se basa en la adición secuencial de aminoácidos protegidos unidos, opcionalmente a través de un grupo de unión, a un soporte en fase sólida. En un procedimiento empleado comúnmente, el grupo α -amino está protegido, de manera adecuada, con grupos protectores de ácido lábil o base lábil. Después de la adición y el acoplamiento del primer residuo de aminoácido, el grupo protector α -amino es eliminado. La cadena es extendida por medio de la adición secuencial de derivados de aminoácidos protegidos adicionales o fragmentos de péptidos y/o derivados de tinte de cianina, protegidos y derivados de manera adecuada. De esta manera, un compuesto peptídico, marcado con tinte, según la invención puede ser construido mediante la adición secuencial de aminoácidos o un derivado de tinte de cianina.

Los vectores peptídicos que contienen múltiples puentes son sintetizados usando diferentes grupos protectores de cisteína, de manera que no existe ambigüedad en cuanto a la forma plegada final del vector. Puede usarse la síntesis divulgada en el documento WO03/006491, que describe cómo se forman los péptidos, que incluyen puentes disulfuro y tioéter. La ciclación de tioéter puede llevarse a cabo, por ejemplo, de la siguiente manera: El péptido Cys(t-Bu)-protegido es disuelto en agua/acetonitrilo (1 mg/ml). La mezcla es ajustada a pH 8, usando una solución diluida de amoníaco y la mezcla es agitada durante la noche. Los puentes disulfuro pueden ser formados mediante oxidación DMSO/THF de la siguiente manera: El péptido es disuelto en 5% de DMSO/TFA (1 mg/ml) y la mezcla es agitada durante 30 minutos.

Los tintes de cianina están disponibles comercialmente en GE Healthcare, previamente Amersham Biosciences, por ejemplo, Cy5 NHS éster, 1 mg, PA15101.

Los vectores peptídicos y los compuestos peptídicos pueden ser purificados usando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y son caracterizados mediante espectrometría de masas y HPLC analítica antes de ser ensayados en la pantalla in vitro.

A continuación, la presente invención será ilustrada adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

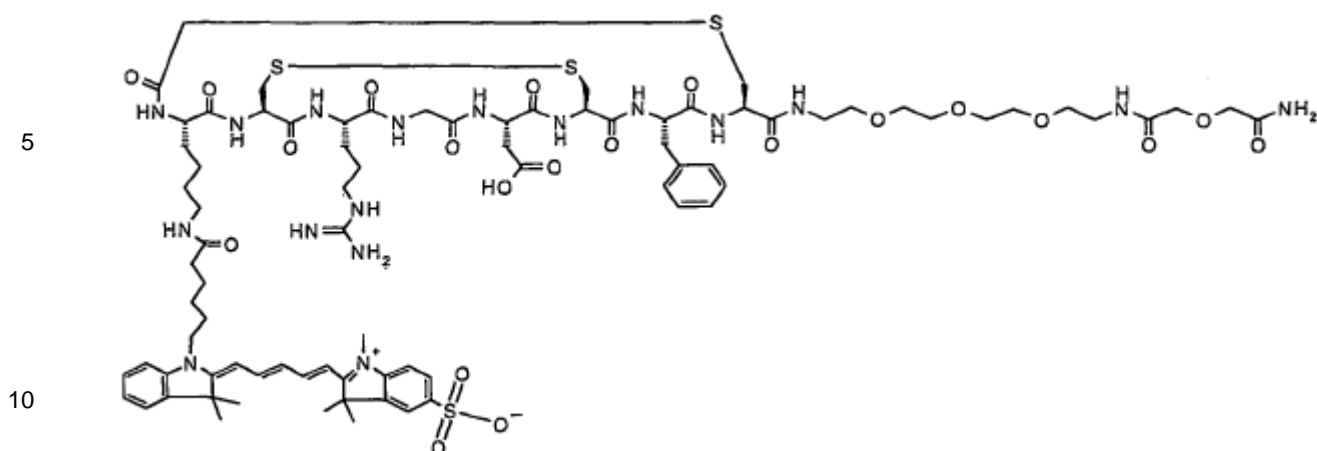
Abreviaturas:

50 TSTU: Tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio

TFA: Ácido trifluoroacético

DMF: N,N-dimetilformamida

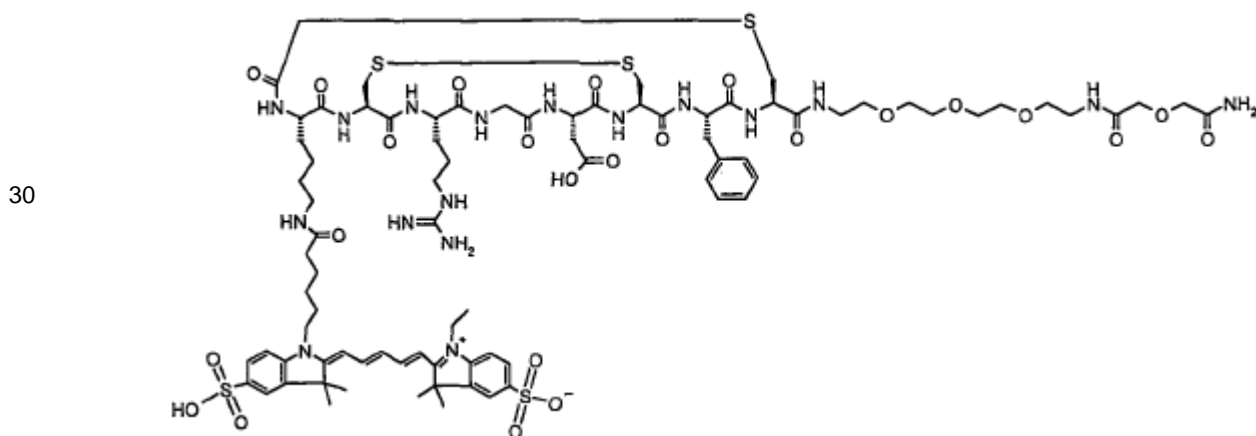
NMM: N-metilmorfolina

Ejemplo 1: Síntesis de Cys2-6; c[CH₂CO-Lys(Cy5 mono-SO₃)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂(n-1)

15

20

El péptido anterior fue ensamblado usando procedimientos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida. El péptido cloroacetilado fue escindido del soporte sólido y fue ciclizado en solución, formando primero el puente tioéter y, a continuación, el puente disulfuro. El NHS-éster de Cy5 mono ácido mono SO₃ (4,5 mg, 0,008 mmol) fue formado mediante un tratamiento con TSTU (2,1 mg, 0,0076 mmol) y NMM (0,009 ml, 0,08 mmol) en DMF (2 ml) durante 1 h. A continuación, la solución fue añadida al péptido (20 mg, 0,016 mmol) y la reacción se dejó proseguir durante la noche, evitando la luz. Se evaporó la DMF a presión reducida y el producto bruto fue purificado mediante cromatografía preparativa de fase reversa (columna Vydac C18, 218TP1022; solventes: A = agua / 0,1% TFA y B = CH₃CN / 0,1% TFA, gradiente de 20-40% de B durante 60 min; flujo 10 ml/min, detección a 254 nm), proporcionando 4,9 mg (34%) de producto puro (HPLC analítica: columna Phenomenex Luna C18, 00G -4252-EO; solventes: A = agua / 0,1% TFA y B = CH₃CN / 0,1% de TFA; gradiente de 25-45% de B durante 20 min; flujo 1,0 ml/min, tiempo de retención 15,2 min, detección a 214 y 254 nm). Se realizó una caracterización adicional usando espectrometría de masas, proporcionando un valor m/z de 902,1 [MH²⁺].

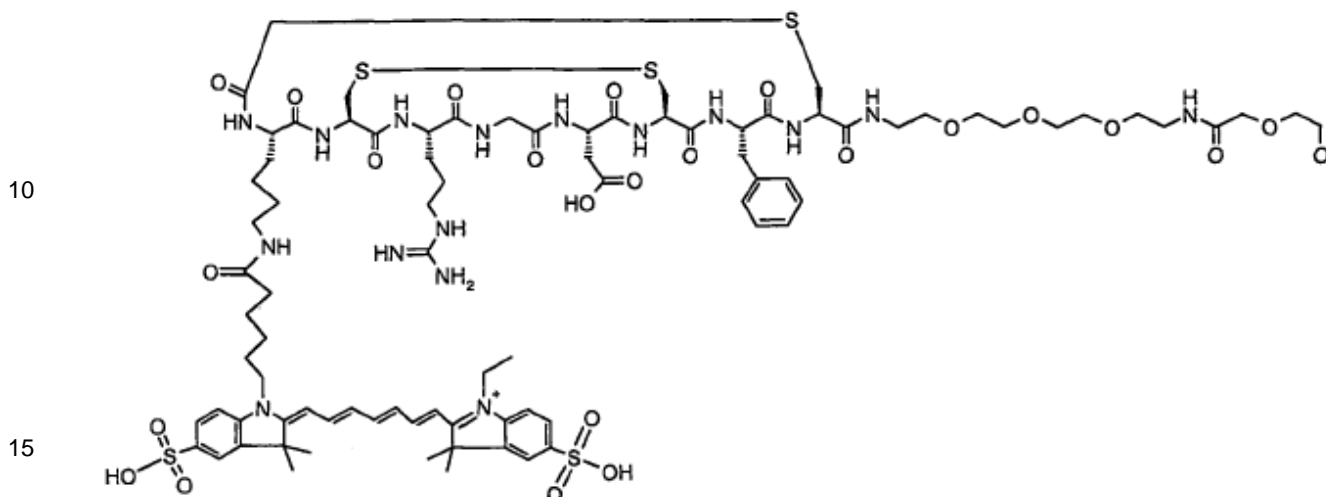
Ejemplo 2: Síntesis de Cys2-6; c[CH₂CO-Lys (Cy5 bis-SO₃)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ (n = 1)

40

El péptido anterior fue ensamblado usando procedimientos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida. El péptido cloroacetilado fue escindido del soporte sólido y fue ciclizado en solución, formando primero el puente tioéter y, a continuación, el puente disulfuro. El péptido bicíclico (24 mg, 0,02 mmol) fue añadido como un sólido a una solución de Cy5 mono NHS-éster bis-SO₃ (7,5 mg, 0,01 mmol) en DMF (2 ml) y, a continuación, se añadió NMM (0,01 ml, 0,09 mmol). La reacción se dejó proseguir durante la noche, evitando la luz. La DMF fue evaporada a presión reducida y el producto crudo fue purificado mediante cromatografía preparativa de fase reversa (columna Vydac C18, 218TP1022; solventes: A = agua / 0,1% TFA y B = CH₃CN / 0,1% TFA, gradiente de 10-30% de B durante 60 min, flujo de 10

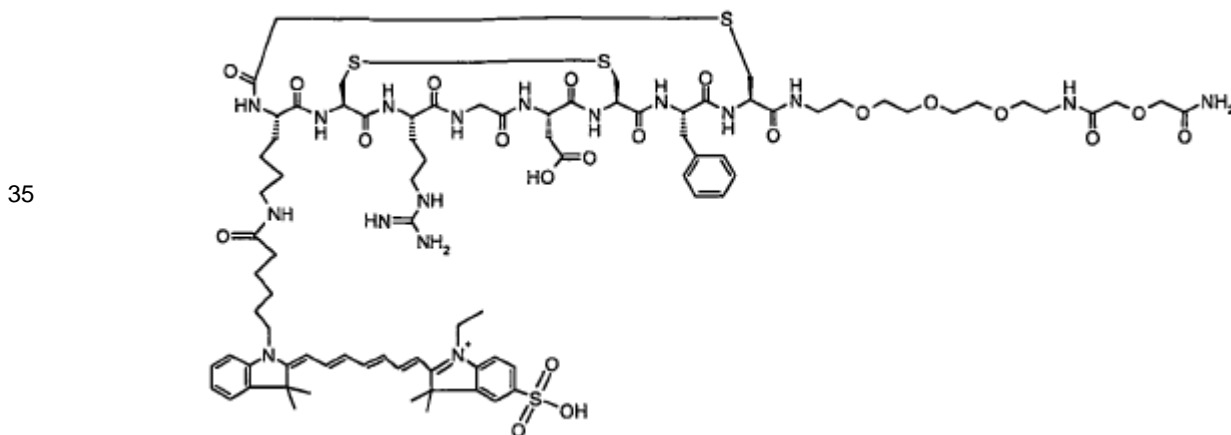
ml/min, detección a 254 nm), proporcionando 6,6 mg (37%) de producto puro (HPLC analítica: columna Phenomenex Luna C18, 00G-4252-E0; solventes: A = agua / 0,1% TFA y B = CH₃CN / 0,1% TFA; gradiente de 15-35% de B durante 20 min, flujo de 1,0 ml/min, tiempo de retención 19,5 min, detección a 214 y 254 nm). Se realizó una caracterización adicional mediante espectrometría de masas, proporcionando un valor m/z de 949,1 [MH²⁺].

5 **Ejemplo 3: Síntesis de Cys2-6; c[CH₂CO-Lys(Cy7 bis-SO₃)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ (n = 1)**



20 El conjugado anterior fue ensamblado usando procedimientos estándar de síntesis en fase sólida. El péptido cloroacetilado fue escindido del soporte sólido y fue ciclado en solución, formando primero el puente tioéter y, a continuación, el puente disulfuro. El NHS-éster de Cy7 mono ácido bis-SO₃ fue formado tratando Cy7 (5,4 mg, 1 eq) con TSTU (2,1 mg, 0,95 eq) y NMM (5 eq) en DMF (2 ml) durante 1 h. A continuación, la solución fue añadida al péptido (18,9 mg, 0,015 mmol, 2eq) en DMF (2 ml) y la reacción se dejó proseguir en la oscuridad, típicamente, durante la noche. La DMF fue evaporada bajo presión reducida y el producto crudo fue purificado mediante cromatografía preparativa en fase reversa (columna Vydac C18, 218TP1022; solventes A = agua / 0,1% TFA y B = CH₃CN / 0,1% TFA, gradiente de 15-35% de B durante 60 min, flujo de 10 ml/min, detección a 254 nm), proporcionando 5,2 mg (36%) de compuesto puro (HPLC analítica: columna Phenomenex Luna C18, 00G-4252-E0; solventes: A = agua / 0,1% TFA / B = CH₃CN / 0,1% TFA, gradiente: 20-40% de B durante 20 min, flujo de 1,0 ml/min, tiempo de retención 16,6 minutos, detección a 214 y 254 nm). Se realizó una caracterización adicional mediante espectrometría de masas, proporcionando un valor m/z de 961,9 [MH²⁺].

30 **Ejemplo 4: Síntesis de Cys2-6; c[CH₂CO-Lys(Cy7 mono-SO₃)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)_n-NH₂ (n = 1)**



El péptido fue ensamblado usando procedimientos estándar de síntesis en fase sólida. El péptido cloroacetilado fue escindido del soporte sólido y fue ciclado en solución, formando primero el puente tioéter y, a continuación, el puente disulfuro. El NHS-éster de Cy7 mono ácido mono-SO₃ fue formado tratando Cy7 (6 mg, 1 eq) con TSTU (3 mg, 0,95 eq) y NMM (5 eq) en DMF (1 ml) durante 1 h. A continuación, la solución fue añadida al péptido (14,7 mg, 0,012 mmol, 1.2 eq) en DMF (2 ml) y la reacción se dejó proseguir en la oscuridad durante la noche. La DMF fue evaporada bajo presión reducida y el producto crudo fue purificado mediante cromatografía preparativa de fase reversa (columna Vydac C18, 218TP1022; solventes A = agua / 0,1% TFA y B = CH₃CN / 0,1% TFA; gradiente 25-35% de B durante 60 min, flujo de 10 ml/min, detección a 254 nm), proporcionando 7,0 mg (38%) de compuesto puro (HPLC analítica: columna Phenomenex Luna C18, 00G- 4252-E0; solventes: A = agua / 0,1% TFA / B = CH₃CN / 0,1% TFA, gradiente: 30-40% de B durante 20 min, flujo de 1,0 ml/min, tiempo de retención 17,4 minutos, detección a 214 y 254 nm). Se realizó una caracterización adicional mediante espectrometría de masas, proporcionando un valor m/z de 922,1 [MH²⁺].

Ejemplo 5: Análisis de unión a proteína de conjugados de tinte que contienen 1, 2 y 4 grupos ácido sulfónico.

Se realizó un análisis de unión a proteína de los conjugados de tinta de la invención mediante una diálisis de equilibrio y diálisis de velocidad, tal como se describe en el libro "Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and calorimetry", editado por Stephen E. Harding y Babur Z. Chowdhry, Oxford University Press, publicado en 2001, capítulo 2 por Bent Honoré, Department of Medical Biochemistry, University of Aarhus.

Resultados:

Compuesto	Unión a proteína (%)
No. A, del Ejemplo 1. Péptido RGD Cy5 mono-SO ₃	17
No. B del Ejemplo 2. Péptido RGD Cy5 bis-SO ₃	21
No. C. Péptido RDG Cy5.5 4-SO ₃	45

El ejemplo muestra que los tintes de cianina con un número reducido de fracciones ácido sulfónico, cuando se conjugan con el péptido RGD, poseen una menor unión a plasma sanguíneo y menor unión no específica a tejido de fondo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amersham Health AS
 <120> Compuesto basado en péptido
 <130> PN0428
 <160> 8
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido Sintético

<400> 1

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

5 <210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Péptido Sintético

<400> 2

Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

15 <210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Péptido Sintético

<400> 3

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

25 <210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Péptido Sintético

<220>

<221> THIOETH

<222> (1)..(8)

<223> Puente tioéter entre residuos aminoácidos 1 y 8

35 <220>

<221> DISULFID

<222> (2)..(6)

<223> Puente disulfuro entre residuos aminoácidos 2 y 6

<400> 4

5

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

<210> 5

<211> 8

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<220>

15

<221> THIOETH

<222> (1)..(8)

<223> Puente tioéter entre residuos aminoácidos 1 y 8

<220>

<221> DISULFID

20

<222> (2)..(6)

<223> Puente disulfuro entre residuos aminoácidos 2 y 6

<400> 5

Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

25

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Péptido Sintético

<220>

<221> THIOETH

<222> (1)..(3)

35

<223> Puente tioéter entre residuos aminoácidos 1 y 3

<220>

<221> DISULFID

<222> (7)..(9)

<223> Puente disulfuro entre residuos aminoácidos 7 y 9

5 <400> 6

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

<210> 7

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

15 <400> 7

Asp Phe Lys Arg Gly
1 5

<210> 8

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

25 <220>

<221> BINDING

<222> (1)..(5)

<223>

<400> 8

30

Asp Phe Lys Arg Gly
1 5

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende un vector peptídico y al menos un tinte de cianina, en el que el vector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos X3-G-D, en el que el vector peptídico y el al menos un tinte de cianina están acoplados, y en el que el al menos un tinte de cianina comprende 2, 1 o ninguna fracción ácido sulfónico;

5 y en el que

X₃ representa arginina,

G representa glicina,

D representa ácido aspártico,

o una sal fisiológicamente aceptable del mismo.

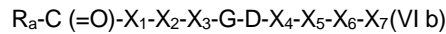
10 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el al menos un tinte de cianina es seleccionado de entre los grupos de carbacianinas, oxacianinas, tiacianinas y azacianinas.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el al menos un tinte de cianina es un tinte de carbacianina.

4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, identificado por la fórmula (VI a)

15 AZ (VI a)

en la que A es identificado por la fórmula (VI b)



y Z representa al menos un tinte de cianina, unido a uno o más de entre X₁, X₆ o X₇ de A,

comprendiendo el compuesto dos puentes de ciclados,

20 en la que,

X₃, G y D son tal como se ha definido anteriormente;

R_a representa un grupo -(CH₂)_n- o -(CH₂)_n-C₆H₄-, que forma parte de un puente que se une a cualquiera de entre X₂, X₄ o X₆, en la que n representa un número entero positivo de 1 a 10;

25 X₁ representa un enlace o 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos, en el que al menos un residuo de aminoácido está funcionalizado opcionalmente con una fracción espaciadora o dicho residuo de aminoácido posee una cadena lateral funcional, tal como un ácido o un grupo amino,

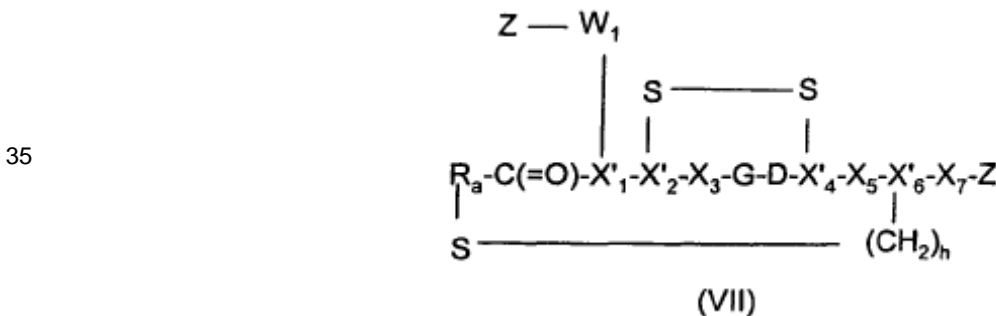
X₂ y X₄ representan, independientemente, residuos de aminoácidos capaces de formar un puente de ciclados,

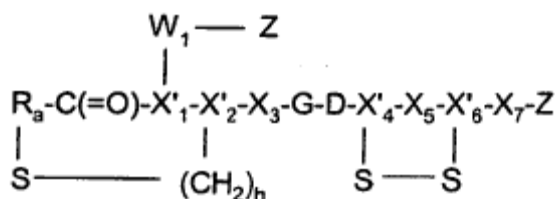
X₅ representa un aminoácido hidrófobo o sus derivados, y

X₆ representa un residuo de aminoácido capaz de formar un puente de ciclados,

30 X₇ representa una fracción biomodificadora o espaciadora o está ausente

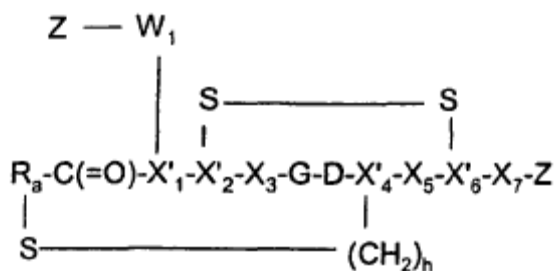
5. Compuesto según la reivindicación 4, seleccionado de entre una cualquiera de las fórmulas;





5

(VIII)



10

(IX)

15

en las que R_a , X_3 , G , D , X_5 y X_7 son tal como se han definido en la reivindicación 5, y en las que

X'_1 comprende un residuo de aminoácido con una cadena lateral funcional, tal como un grupo ácido o amino, siendo seleccionado, preferentemente, el aminoácido de entre ácido aspártico o glutámico, homolisina o un ácido diaminoalílico, tal como lisina o ácido diaminopropiónico, más preferentemente, ácido aspártico o lisina;

20

X'_2 , X'_4 y X'_6 representan residuos de aminoácidos que forman un enlace tioéter o disulfuro,

W_1 es una fracción espaciadora o está ausente,

h es un entero positivo de 1 o 2,

y en las que al menos uno de los grupos Z está presente, representando Z un tinte de cianina.

6. Compuesto de fórmula VII según la reivindicación 5, en el que R_a representa $-(CH_2)-$.

25

7. Compuesto de fórmula VII según las reivindicaciones 5 ó 6, en el que X'_1 representa un residuo de aminoácido con una cadena lateral funcional, tal como un grupo amino o ácido, siendo seleccionado el aminoácido de entre ácido aspártico, ácido glutámico, homolisina, lisina o ácido diaminopropiónico.

8. Compuesto de fórmula VII según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que X'_2 , X'_4 y X'_6 representan, independientemente, un residuo de cisteína o de homocisteína.

30

9. Compuesto de fórmula VII según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que X_5 representa fenilalanina, tirosina 3-yodo-tirosina o naftialanina.

10. Compuesto de fórmula VII según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que X_7 comprende 1-10 unidades de un bloque de construcción PEG monodispersado o está ausente.

35

11. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que los tintes de cianina Z están unidos a uno o más de entre X'_1 , W_1 , X'_6 o X'_7 a través de una amida, sulfonamida o un enlace tioéter.

12. Composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, junto con uno o más adyuvantes, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

13. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso como un agente de contraste en técnicas de obtención de imágenes ópticas.

40

14. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la fabricación de un agente de

contraste para técnicas de obtención de imágenes ópticas para su uso en un procedimiento de diagnóstico que implica la administración de dicho agente de contraste al cuerpo de un ser humano o un animal y la generación de una imagen de al menos parte de dicho cuerpo.

5 15. Procedimiento de generación de imágenes del cuerpo de un ser humano o un animal, que implica la generación de una imagen de al menos una parte de dicho cuerpo, al cual se ha administrado previamente un agente de contraste, **caracterizado porque** dicho agente de contraste comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

10 18. Procedimiento de supervisión del efecto del tratamiento del cuerpo de un ser humano o un animal con un fármaco para combatir una afección asociada con la angiogénesis, implicando dicho procedimiento la detección de la captación, por parte de los receptores de las células, de una composición o compuesto administrado previamente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, siendo realizadas dicha administración previa y dicha detección, opcionalmente, pero preferentemente, de manera repetida, por ejemplo, antes, durante y después del tratamiento con dicho compuesto o composición.