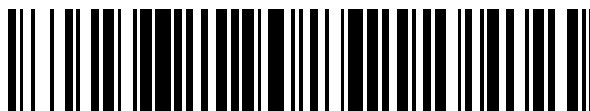


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 066**

51 Int. Cl.:
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08750628 .3**
96 Fecha de presentación: **16.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2146749**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2010**

54 Título: **Péptidos de unión a HGF marcados para la formación de imágenes**

30 Prioridad:
16.05.2007 GB 0709441
13.08.2007 GB 0715682

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.07.2012

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

72 Inventor/es:
JOHANNESSEN, Edvin Wilhelm y
CUTHBERTSON, Alan

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 385 066 T3

DESCRIPCIÓN

Péptidos de unión a HGF marcados para la formación de imágenes.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos de unión a cMET marcados adecuados para la formación de imágenes ópticas *in vivo*. Los péptidos se marcan con un grupo indicador óptico adecuado para la formación de imágenes en la región del rojo al infrarrojo cercano. También se desvelan procedimientos de formación de imágenes *in vivo*, especialmente de uso en el diagnóstico del cáncer colorrectal (CCR).

Antecedentes de la invención

En el documento WO 2005/030266 se desvela que existe la necesidad médica del diagnóstico precoz del cáncer colorrectal (CCR). En el documento WO 2005/030266 se desvelan agentes de contraste de formación de imágenes ópticas que tienen afinidad por una diana biológica anormalmente expresada en el CCR. La diana biológica está seleccionada de entre: COX-2, beta-catenina, E-cadherina, P-cadherina, diversas quinasas, Her-2, metaloproteinasas de matriz (MMP), ciclinas, P53, timidilato sintasa, receptores VEGF, receptores EGF, K-ras, proteína APC, catepsina B, uPAR, cMET, mucinas y receptores de gastrina. Se dice que de tales dianas son preferentes (p. 7 líneas 11-12): cMET, mmp-14, COX-2, beta-catenina y catepsina B. El vector del documento WO 2005/030266 puede ser: un péptido, un resto peptoide, un oligonucleótido, un oligosacárido, un compuesto relacionado con los lípidos o una molécula pequeña farmacológica orgánica tradicional. El resto indicador es preferentemente un colorante que interactúa con la luz en la región de longitud de onda del ultravioleta a la parte infrarroja del espectro electromagnético.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión (SF), es un factor de crecimiento que está implicado en diversos procesos fisiológicos, tales como la cicatrización de heridas y la angiogénesis. La interacción de HGF con su receptor de alta afinidad (cMET) está implicada en el crecimiento, la invasión y la metástasis tumoral.

Knudsen y col. han revisado el papel de HGF y cMet en el cáncer de próstata, con posibles implicaciones para la formación de imágenes y para la terapia [Adv. Cancer Res., 91, 31-67 (2004)]. En el documento WO 03/057155 se divulgan anticuerpos anti-met marcados para el diagnóstico y el tratamiento.

En el documento WO 2004/078778 se desvelan polipéptidos o construcciones de péptidos multiméricos que se unen cMet o a un complejo que comprende cMet y HGF. Se divulgan aproximadamente 10 clases estructurales diferentes de péptidos. En el documento WO2004/078778 se desvela que los péptidos pueden marcarse con un marcador detectable para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, o con un fármaco para aplicaciones terapéuticas. El marcador detectable puede ser: una enzima, un compuesto fluorescente, un colorante óptico, un ion metálico paramagnético, un agente de contraste por ultrasonidos o un radionúclido. Se indica que los marcadores preferentes del documento WO 2004/078778 son radiactivos o paramagnéticos, y más preferentemente comprenden un metal que está quelado por un metal quelante.

La presente invención.

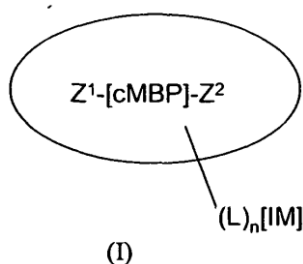
La presente invención proporciona agentes de formación de imágenes adecuados para la formación de imágenes ópticas *in vivo*, que comprenden péptidos cíclicos de unión a cMET, y un resto indicador de formación de imágenes ópticas adecuado para formar imágenes del cuerpo de los mamíferos *in vivo* usando luz de una longitud de onda del verde al infrarrojo cercano de 600-1.200 nm. Los péptidos cíclicos de unión a cMET están relacionados con una de las clases estructurales de péptido del documento WO 2004/078778, y tienen afinidad de unión óptima por cMet. Estos péptidos se obtuvieron a partir de la expresión en fagos y se seleccionaron por su afinidad por cMet y por no competir con HGF, tal como se divulga en el documento WO2004/078778. Los péptidos de unión a cMET de la presente invención tienen preferentemente por lo menos uno de sus extremos terminales protegido por grupos inhibidores del metabolismo (M^G). Esto es una consideración importante para las aplicaciones *in vivo*, en las que las peptidasas y las enzimas endógenas metabolizarían por lo demás el péptido rápidamente, con la consiguiente pérdida de afinidad de unión a cMET, y por tanto la pérdida de dirección selectiva *in vivo*.

La presente invención muestra que la mejor manera de usar los péptidos de unión a cMET *in vivo* implica el uso de un indicador óptico, a diferencia de otras modalidades de formación de imágenes (por ejemplo, nuclear, MRI o por ultrasonido), y también proporciona indicadores de formación de imágenes ópticas preferentes. Resulta preferente la región del verde al infrarrojo cercano (luz de longitud de onda de 500-1.200 nm), ya que la región tiene una superposición espectral mínima con los materiales y tejidos endógenos, tales como la hemoglobina, las porfirinas, la melanina, y el colágeno [Licha, Topics Curr. Chem., 222, 1-29 (2002)]. Otros contribuidores importantes para la autofluorescencia son NADH, FAD y elastina.

Descripción detallada de la invención.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente de formación de imágenes que comprende un

conjugado de Fórmula I:



en la que:

Z^1 está fijado al extremo N-terminal de cMBP, y es H o M^{IG} .
 Z^2 está fijado al extremo C-terminal de cMBP y es OH, OB^C , o M^{IG} , en la que B^C es un catión biocompatible;
 cMBP es un péptido cíclico de unión a cMET de 17 a 30 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos (SEC-1):

Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶;

en la que X¹ es Asn, His o Tyr;

X² es Gly, Ser, Thr o Asn;

X³ es Thr o Arg;

X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;

X⁵ es Ser o Thr;

X⁶ es Asp o Glu;

y Cys^{a-d} son cada uno restos de cisteína de manera que los restos a y b así como c y d se ciclan para formar dos enlaces disulfuro distintos;

M^{IG} es un grupo inhibidor del metabolismo que es un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP;

L es un grupo de engarce sintético de fórmula $-(A)_m-$ en la que cada A es independientemente $-CR_2-$, $-CR=CR-$, $-C\equiv C-$, $-CR_2CO_2-$, $-CO_2CR_2-$, $-NRCO-$, $-CONR-$, $-NR(C=O)NR-$, $-NR(C=S)NR-$, $-SO_2NR-$, $-NRSO_2-$, $-CR_2OCR_2-$, $-CR_2SCR_2-$, $-CR_2NRCR_2-$, un grupo cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arieno C₅₋₁₂, o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂, un aminoácido, un azúcar o un componente básico de polietilenglicol (PEG) monodisperso;

cada R se elige independientemente de entre H, alquilo C₁₋₄, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄, alcoxialquilo C₁₋₄ o hidroxialquilo C₁₋₄,

m es un número entero de un valor de 1 a 20;

n es un número entero de un valor de 0 ó 1;

IM es un resto indicador de formación de imágenes ópticas adecuado para la formación de imágenes del cuerpo de los mamíferos *in vivo* usando luz de una longitud de onda del verde al infrarrojo cercano de 600-1.200 nm.

Por la expresión "agente de formación de imágenes" se entiende un compuesto adecuado para la formación de imágenes del cuerpo de los mamíferos *in vivo*. Preferentemente, el mamífero es un sujeto humano. La formación de imágenes puede ser invasiva (por ejemplo, intraoperatoria o endoscópica) o no invasiva. El procedimiento de formación de imágenes preferente es la endoscopia. Aunque el conjugado de Fórmula I es adecuado para la formación de imágenes *in vivo*, también puede tener aplicaciones *in vitro* (por ejemplo, ensayos que cuantifiquen cMet en muestras biológicas o la visualización de cMet en muestras de tejido). Preferentemente, el agente de formación de imágenes se usa para la formación de imágenes *in vivo*.

El grupo Z^1 sustituye al grupo amino del último resto de aminoácido. De esta manera, cuando Z^1 es H, el extremo amino terminal del cMBP termina en un grupo NH_2 libre del último resto de aminoácido. El grupo Z^2 sustituye al grupo carbonilo del último resto de aminoácido. De esta manera, cuando Z^2 es OH, el extremo carboxilo terminal de cMBP termina en el grupo CO_2H libre del último resto de aminoácido, y cuando Z^2 es OB^C ese grupo carboxilo terminal se ioniza como un grupo CO_2B^C .

Por la expresión "grupo inhibidor del metabolismo" (M^{IG}) se entiende un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido cMBP en el extremo amino terminal (Z^1) o en el extremo carboxilo terminal (Z^2). Tales grupos son bien conocidos para los expertos en la materia y se eligen convenientemente, para el péptido amino terminal, de entre: grupos N-acilados $-NH(C=O)R^G$ en los que el grupo acilo $-(C=O)R^G$ tiene un R^G elegido de entre: grupos alquilo C₁₋₆, arilo C₃₋₁₀ o comprende un componente básico de polietilenglicol (PEG). Más adelante se divulgan grupos PEG adecuados para el grupo de engarce (L). Resultan preferentes como tales grupos PEG los biomodificadores de Fórmula IA o IB. Resultan preferentes como tales grupos M^{IG} amino terminales acetilo, benciloxicarbonilo o trifluoroacetilo, más preferentemente acetilo.

Grupos de inhibición del metabolismo adecuados para el extremo carboxilo terminal del péptido incluyen: carboxamida, terc-butil éster, éster bencílico, éster ciclohexílico, amino alcohol o un componente básico de polietilenglicol (PEG). Un grupo M^G adecuado para el resto de aminoácido del extremo carboxilo terminal del péptido cMBP es aquel en el que la amina terminal del resto de aminoácido está N-alquilada con un grupo alquilo C_{1-4} , preferentemente un grupo metilo. Resultan preferentes como tales grupos M^G la carboxamida o el PEG, la carboxamida resulta el más preferente de tales grupos.

La Fórmula I indica que el resto $-(L)_n[IM]$ puede estar fijado en cualquier posición adecuada de Z^1 , Z^2 o cMBP. Para Z^1 o Z^2 , el resto $-(L)_n[IM]$ puede estar fijado al grupo M^G cuando cualquiera de Z^1/Z^2 es un M^G . Cuando Z^1 es H o Z^2 es OH, la fijación del resto $-(L)_n[IM]$ en la posición Z^1 o Z^2 proporciona compuestos de fórmulas $[IM]-(L)_n-[cMBP]-Z^2$ o $Z^1-[cMBP]-(L)_n-[IM]$ respectivamente. La inhibición del metabolismo del cMBP en cualquiera de los extremos terminales del péptido también puede lograrse mediante la fijación del resto $-(L)_n[IM]$ de esta manera, pero $-(L)_n[IM]$ está fuera de la definición de M^G de la presente invención.

El resto $-(L)_n$ de Fórmula I puede estar fijado en cualquier posición adecuada del IM. El resto $-(L)_n$ toma el lugar de un sustituyente existente del IM, o está fijado covalentemente al sustituyente existente del IM. El resto $-(L)_n$ está fijado preferentemente a través de un sustituyente carboxialquilo del IM.

Por la expresión "péptido cíclico de unión a cMET" (cMBP) se entiende un péptido que se une al receptor de alta afinidad del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como cMet (c-Met o receptor del factor de crecimiento de hepatocitos). Los péptidos adecuados cMBP de la presente invención tienen una K_D aparente para cMet del complejo cMet/HGF inferior a aproximadamente 20 nM. Los péptidos cMBP comprenden restos de prolina, y se sabe que tales restos pueden mostrar isomerización *cis/trans* del enlace amida de la cadena principal. Los péptidos cMBP de la presente invención incluyen cualquiera de tales isómeros.

Por la expresión "catión biocompatible" (B^C) se entiende un contraión cargado positivamente que forma una sal con un grupo ionizado cargado negativamente, en el que dicho contraión cargado positivamente es también no tóxico y por tanto adecuado para la administración al cuerpo de los mamíferos, especialmente al cuerpo humano. Ejemplos de cationes biocompatibles adecuados incluyen: los metales alcalinos sodio o potasio; los metales alcalinotérreos calcio y magnesio; y el ion amonio. Los cationes biocompatibles preferentes son sodio y potasio, más preferentemente sodio.

Por el término "aminoácido" se entiende un aminoácido L o D, un análogo de aminoácido (por ejemplo naftilalanina) o un mimético de aminoácido que pueden ser de origen natural o de origen puramente sintético, y pueden ser ópticamente puros, es decir, un solo enantiómero y, por tanto, quiral, o una mezcla de enantiómeros. En el presente documento se usan las abreviaturas convencionales de 3 letras o de una sola letra para los aminoácidos. Preferentemente, los aminoácidos de la presente invención son ópticamente puros. Por la expresión "mimético de aminoácido" se entiende análogos sintéticos de aminoácidos de origen natural que son isómeros, es decir, se han diseñado para imitar la estructura estérica y electrónica del compuesto natural. Tales isómeros son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen depsipéptidos, péptidos retroinversos, tioamidas, cicloalcanos o tetrazoles 1,5-disustituídos [véase M. Goodman, Biopolymers, 24, 137, (1985)].

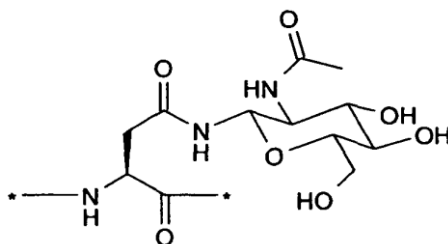
Por el término "péptido" se entiende un compuesto que comprende dos o más aminoácidos, tal como se ha definido anteriormente, unidos por un enlace peptídico (es decir, un enlace amida que une la amina de un aminoácido al carboxilo de otro). La expresión "mimético de péptido" o "mimético" se refiere a compuestos biológicamente activos que imitan la actividad biológica de un péptido o una proteína, pero ya no son de naturaleza química peptídica, es decir, ya no contienen ningún enlace peptídico (es decir, enlaces amida entre los aminoácidos). En el presente documento, la expresión mimético de péptido se usa en un sentido más amplio para incluir moléculas que ya no son de naturaleza completamente peptídica, tales como pseudo-péptidos, semi-péptidos y peptoides.

Por la expresión "resto indicador de formación de imágenes ópticas" (IM) se entiende un cromóforo o colorante fluorescente que es capaz de detección directa o indirecta en un procedimiento de formación de imágenes ópticas usando luz de longitud de onda del verde al infrarrojo cercano (500-1.200 nm, preferentemente 600-1.000 nm). Preferentemente, el IM tiene propiedades fluorescentes.

Se prevé que una de las funciones del grupo de engarce $-(A)_m-$ de Fórmula I sea distanciar el IM del sitio activo del péptido cMBP. Esto es especialmente importante cuando el resto de formación de imágenes es relativamente voluminoso, de manera que la interacción con la enzima no se vea perjudicada. Esto puede lograrse mediante una combinación de flexibilidad (por ejemplo, cadenas alquilo simples), de manera que el grupo voluminoso tenga la libertad de posicionarse lejos del sitio activo y/o de rigidez tal como un espaciador cicloalquilo o arilo que orienta el IM alejado del sitio activo. La naturaleza del grupo de engarce también puede usarse para modificar la biodistribución del agente de formación de imágenes. De esta manera, por ejemplo, la introducción de grupos éter en el engarce ayudará a minimizar la unión a proteínas plasmáticas. Cuando $-(A)_m-$ comprende un componente básico de polietilenglicol (PEG) o una cadena peptídica de 1 a 10 restos de aminoácidos, el grupo de engarce puede funcionar para modificar la farmacocinética y las velocidades de aclaramiento sanguíneo del agente de formación de imágenes *in vivo*. Tales grupos de engarce "biomodificadores" pueden acelerar el aclaramiento del agente de formación de imágenes del tejido de fondo, tal como músculo o hígado, y/o de la sangre, dando así una mejor

imagen de diagnóstico debido a la menor interferencia de fondo. También puede usarse un grupo de engarce biomodificador para favorecer una vía de excreción concreta, por ejemplo a través de los riñones a diferencia de a través del hígado.

- 5 Por el término "azúcar" se entiende un mono-, di- o tri-sacárido. Azúcares adecuados incluyen: glucosa, galactosa, maltosa, manosa, y lactosa. Opcionalmente, el azúcar puede funcionalizarse para permitir un acoplamiento fácil a los aminoácidos. De esta manera, puede conjugarse por ejemplo un derivado de glucosamina de un aminoácido con otros aminoácidos a través de enlaces peptídicos. El derivado de glucosamina de la asparagina (disponible en el mercado en NovaBiochem) es un ejemplo de ello:



10 Características preferentes.

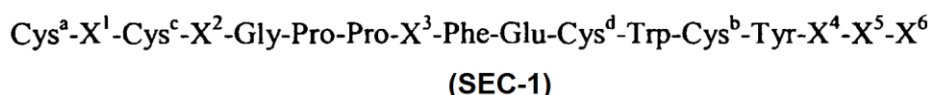
El peso molecular del agente de formación de imágenes es convenientemente de hasta 8.000 Daltons. Preferentemente, el peso molecular está en el intervalo de 2.800 a 6.000 Daltons, más preferentemente de 3.000 a 4.500 Daltons, siendo especialmente preferente de 3.200 a 4.000 Daltons.

- 15 Los agentes de formación de imágenes preferentes de la presente invención tienen ambos extremos terminales del péptido protegidos por grupos M^{IG} , es decir, preferentemente Z^1 y Z^2 son M^{IG} , que normalmente serán diferentes.

Como se ha señalado anteriormente, cualquiera de Z^1/Z^2 puede equivaler opcionalmente a $-(L)_n[IM]$. Tener ambos extremos terminales del péptido protegidos de esta manera es importante para las aplicaciones de formación de imágenes *in vivo*, ya que de lo contrario cabría esperar un metabolismo rápido con la consiguiente pérdida de afinidad de unión selectiva para cMet. Cuando Z^1 y Z^2 son M^{IG} , preferentemente Z^1 es acetilo y Z^2 es una amida primaria. Lo más preferentemente, Z^1 es acetilo y Z^2 es una amida primaria y el resto $-(L)_n[IM]$ está fijado a la amina épsilon de la cadena lateral de un resto de lisina de cMBP.

Los péptidos cMBP preferentes de la presente invención tienen una K_D para la unión de cMy col complejo cMet/HGF inferior a aproximadamente 10 nM (en base a mediciones de ensayo de polarización de fluorescencia), lo más preferentemente en el intervalo de 1 a 5 nM, siendo el ideal inferior a 3nM.

- 25 La secuencia peptídica (SEC-1)



30 del cMBP de Fórmula I es una secuencia peptídica 17-mer, que es principalmente responsable de la unión selectiva a cMet. Cuando el péptido cMBP de la presente invención comprende más de 17 restos de aminoácidos, los aminoácidos restantes pueden ser cualquier aminoácido, aparte de cisteína. Restos de cisteína adicionales no protegidos podrían causar una desorganización no deseada de los puentes disulfuro $\text{Cys}^a\text{-Cys}^b$ y $\text{Cys}^c\text{-Cys}^d$ definidos. Los péptidos adicionales comprenden preferentemente por lo menos un resto de aminoácido con una cadena lateral adecuada para una fácil conjugación del resto $-(L)_n[IM]$. Tales restos adecuados incluyen restos de Asp o Glu para la conjugación grupos $-(L)_n[IM]$ funcionalizados con amina, o un resto de Lys para la conjugación con un grupo $-(L)_n[IM]$ funcionalizado con un éster activo o con carboxilo. Los restos de aminoácidos para la conjugación de $-(L)_n[IM]$ se sitúan convenientemente lejos de la región de unión 17-mer del péptido cMBP (SEC-1), y se sitúan preferentemente en el extremo terminal C o N. Preferentemente, el resto de aminoácido para la conjugación es un resto de Lys.

40 Se evaluó la sustitución del resto de triptófano de la SEC-1 con los aminoácidos sustitutos conocidos fenilalanina y naftilalanina. Sin embargo, se descubrió una pérdida de afinidad de cMet, lo que sugería que el resto de triptófano es importante para la actividad.

Es preferible que el péptido cMBP comprenda adicionalmente un resto de serina N-terminal, lo que proporcionó el 18-mer (SEC-2):



Además de la SEC-1, o preferentemente la SEC-2, el cMBP comprende adicionalmente lo más preferentemente:

- (i) un resto de Asp o Glu dentro de los 4 restos de aminoácidos del extremo terminal C o N del péptido cMBP, y $-(L)_nIM$ se funcionaliza con un grupo amino que se conjuga con la cadena lateral carboxilo de dicho resto de Asp o Glu para dar un enlace amida,
- 5 (ii) un resto de Lys dentro de los 4 restos de aminoácidos del extremo terminal C o N del péptido cMBP, y $-(L)_nIM$ se funcionaliza con un grupo carboxilo que se conjuga con la amina épsilon de la cadena lateral de dicho resto de Lys para dar un enlace amida.

Los péptidos cMBP preferentes comprenden la secuencia de aminoácidos 22-mer (SEC-3):

Ala-Gly-Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-Gly-Thr. (SEQ-3)

- 10 Los péptidos cMBP de la presente invención tienen preferentemente X³ igual a Arg.

El péptido cMBP preferentemente comprende adicionalmente además de la SEC-1, la SEC-2 o la SEC-3, en el extremo terminal N o C, un péptido de engarce que se elige de entre:

- Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4), -Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5) o
- Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6).

- 15 El resto de Lys del péptido de engarce es el lugar más preferente para la conjugación del resto $-(L)_n[IM]$. Los péptidos cMBP especialmente preferentes comprenden la SEC-3 junto con el péptido de engarce de la SEC-4, que tiene la secuencia de aminoácidos 26-mer (SEC-7):

Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys. (SEQ-7)

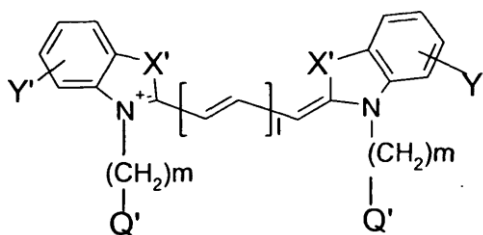
- 20 Los péptidos cMBP de la SEC-1, la SEC-2, la SEC-3 y la SEC-7 tienen preferentemente $Z^1=Z^2=M^{IG}$, y lo más preferentemente tienen Z^1 = acetilo y Z^2 = amida primaria.

- 25 El resto $-(L)_n[IM]$ está convenientemente fijado a cualquiera de los grupos Z^1 o Z^2 o un resto de aminoácido del péptido cMBP que sea diferente a la secuencia de unión a cMet de la SEC-1. Los restos de aminoácidos preferentes y los sitios de conjugación son tal como se ha divulgado anteriormente. Cuando el resto $-(L)_n[IM]$ está fijado a Z^1 o Z^2 , puede tomar el lugar de Z^1 o Z^2 por conjugación con el extremo terminal N o C, y bloquear el metabolismo *in vivo* de esa manera.

- 30 Los grupos de IM preferentes tienen un sistema de electrones deslocalizados extenso, por ejemplo cianinas, merocianinas, indocianinas, ftalocianinas, naftalocianinas trifenilmetinas, porfirinas, colorantes de pirilio, colorantes de tiapirilio, colorantes de escuarilio, colorantes de croconio, colorantes de azuleno, indoanilinas, colorantes de benzofenoxacinio, colorantes de benzotiafenotiacinio, antraquinonas, naphtoquinonas, indatrenos, ftaloilacridonas, trisfenoquinonas, colorantes azo, colorantes de transferencia de carga intramolecular e intermolecular y complejos de colorante, troponas, tetracinas, complejos de *bis*(ditioleno), complejos de *bis*(benceno-ditiolato), colorantes de yodoanilina, complejos de *bis*(S,O-ditioleno). También resultan útiles las proteínas fluorescentes, como la proteína verde fluorescente (GFP) y las modificaciones de las GFP que tengan diferentes propiedades de absorción/emisión.
- 35 En determinados contextos se usan complejos de determinados metales de tierras raras (por ejemplo, europio, samario, terbio y disprosio), así como nanocristales fluorescentes (puntos cuánticos).

- 40 Ejemplos concretos de cromóforos que pueden usarse incluyen fluoresceína, sulforodamina 101 (Texas Red), rodamina B, rodamina 6G, rodamina 19, verde de indocianina, Cy2, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, Marina Blue, Pacific Blue, Oregon Green 488, Oregon Green 514, tetrametilrodamina, y Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, y Alexa Fluor 750. Los colorantes de cianina son especialmente preferentes. Licha y col. han revisado los colorantes y los conjugados de colorante para la formación de imágenes ópticas *in vivo* [Topics Curr. Chem., 222, 1-29 (2002); Adv. Drug Deliv. Rev., 57, 1087-1108 (2005)].

Los colorantes de cianina preferentes que son fluoróforos son de Fórmula II:



(II)

en la que:

cada X' está seleccionado independientemente de entre: -C(CH₃)₂, -S-, -O- o

5 - C[(CH₂)_aCH₃][(CH₂)_bM]-, en la que a es un número entero de un valor de 0 a 5, b es un número entero de un valor de 1 a 5, y M es un grupo G o está seleccionado de entre SO₃M¹ o H;

cada Y' representa independientemente de 1 a 4 grupos seleccionados del grupo que consiste en:

H, -CH₂NH₂, -SO₃M¹, -CH₂COOM¹, -NCS y F, y en la que los grupos Y' se colocan en cualquiera de las posiciones del anillo aromático;

10 Q' está seleccionado independientemente del grupo que consiste en: H, SO₃M¹, NH₂, COOM¹, amonio, grupos éster, bencilo y un grupo G;

M¹ es H o B^C;

l es un número entero de 1 a 3;

y m es un número entero de 1 a 5;

en la que por lo menos uno de X', Y' y Q' comprende un grupo G,

15 G es un grupo reactivo o funcional adecuado para la fijación al péptido cMBP.

El grupo G reacciona con un grupo complementario del péptido cMBP formando una unión covalente entre el fluoróforo colorante de cianina y el péptido cMBP. G puede ser un grupo reactivo que puede reaccionar con un grupo funcional complementario del péptido, o, de manera alternativa, puede incluir un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo reactivo del péptido cMBP. Ejemplos de grupos reactivos y funcionales incluyen: ésteres activos; isotiocianato; maleimida; haloacetamida; haluro de ácido; hidrazida; vinilsulfona; diclorotriazina; fosforamida; hidroxilo; amino; sulfhidrilo; carbonilo; ácido carboxílico y tiofosfato. G es preferentemente un éster activo.

25 Por la expresión "éster activado" o "éster activo" se entiende un derivado de éster del ácido carboxílico asociado que está diseñado para ser un mejor grupo saliente, y por tanto permitir una reacción más fácil con el nucleófilo, tal como las aminas. Ejemplos de ésteres activos adecuados son: N-hidroxisuccinimida (NHS), éster de sulfo-succinimidilo, pentafluorofenol, pentafluorotiofenol, *para*-nitrofenol, hidroxibenzotriazol, y PyBOP (es decir, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxipirrolidinofosfonio). Ésteres activos preferentes son ésteres de pentafluorofenol o N-hidroxisuccinimida, especialmente ésteres de N-hidroxisuccinimida.

En una forma de realización preferente de Fórmula II:

30 cada X' está seleccionado del grupo de -C(CH₃)₂- y -C(CH₃)[(CH₂)₄M]-, en la que M es un grupo G o -SO₃M¹;

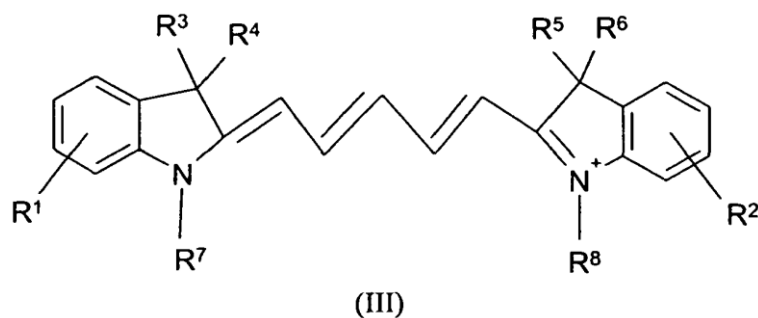
cada Y' representa SO₃M¹, H ó 1 a 4 átomos de F;

cada Q' está seleccionado de un grupo G y SO₃M¹;

1 es preferentemente 2 y m es preferentemente 3, 4 ó 5;

en la que cuando X' o Q' es un grupo G, es lo más preferentemente un éster de succinimidilo.

35 Colorantes de cianina especialmente preferentes son de Fórmula III:



en la que:

R^1 y R^2 son independientemente H o SO_3M^1 , y por lo menos uno de R^1 y R^2 es SO_3M^1 , en la que M^1 es H o B^{C} ;
 R^3 y R^4 son independientemente alquilo C_{1-4} o carboxialquilo C_{1-6} ; R^5 , R^6 , R^7 y R^8 son independientemente grupos R^{a} ;
 en la que R^{a} es alquilo C_{1-4} , carboxialquilo C_{1-6} o $-(\text{CH}_2)_k\text{SO}_3\text{M}^1$, en la que k es un número entero de un valor de 3 ó 4;
 con la condición de que el colorante de cianina tenga un total de 1 a 4 sustituyentes SO_3M^1 en los grupos R^1 , R^2 y R^{a} .

Los colorantes preferentes de Fórmula III se eligen de manera que esté presente por lo menos un grupo carboxialquilo C_{1-6} , a fin de facilitar la conjugación del cMBP.

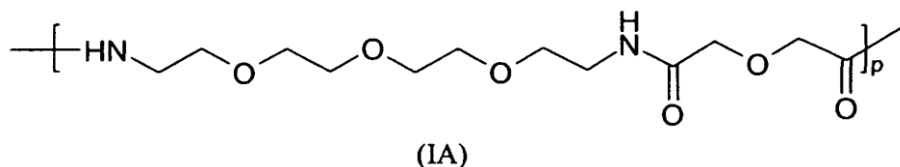
Colorantes individuales preferentes de Fórmula III se resumen en la Tabla 1:

Tabla 1: estructuras químicas de los colorantes de cianina individuales.

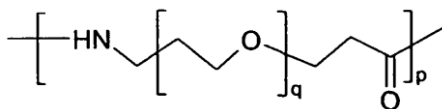
Tabla 1	Nombre del colorante			
	Cy5(1)	Cy5(2)	Cy5**	Alexa647
R^1	H	SO_3H	SO_3H	SO_3H
R^2	SO_3H	SO_3H	SO_3H	SO_3H
R^3	CH_3	CH_3	CH_3	R^{f}
R^4	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3
R^5	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3
R^6	CH_3	CH_3	$-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{H}$	CH_3
R^7	R^{f}	R^{f}	R^{f}	$-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}$
R^8	CH_3	Et	$-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{H}$	$-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}$
donde $\text{R}^{\text{f}} = -(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$.				

Colorantes especialmente preferentes de Fórmula II son Cy5** y Alexa647, siendo Cy5** el ideal.

Cuando se encuentra presente un grupo de engarce sintético (L), éste comprende preferentemente grupos funcionales terminales que facilitan la conjugación con [IM] y Z^1 -[cMBP]- Z^2 . Cuando L comprende una cadena peptídica de 1 a 10 restos de aminoácidos, los restos de aminoácidos se eligen preferentemente de entre glicina, lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico o serina. Cuando L comprende un resto de PEG, éste comprende preferentemente unidades derivadas de la oligomerización de estructuras similares a PEG monodisperso de las Fórmulas IA o IB:



ácido 17-amino-5-oxo-6-aza-3,9,12,15-tetraoxaheptadecanóico de Fórmula IA en la que p es un número entero de 1 a 10. De manera alternativa, puede usarse una estructura similar a PEG en base a un derivado de ácido propiónico de Fórmula IB:



(IB)

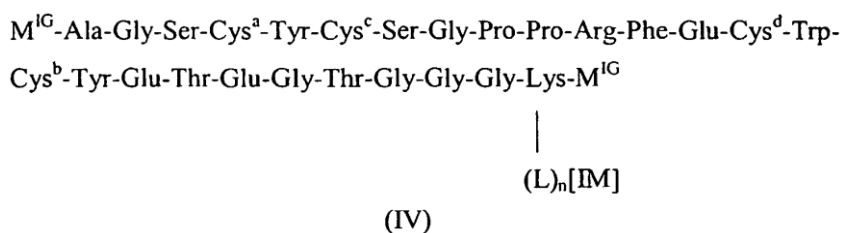
- 5 en la que p es tal como se define para la Fórmula IA y q es un número entero de 3 a 15.

En la fórmula IB, p es preferentemente 1 ó 2, y q es preferentemente de 5 a 12.

- 10 Cuando el grupo de engarce no comprende PEG o una cadena peptídica, los grupos L preferentes tienen una cadena principal de átomos unidos que componen el resto $-(A)_m$ de 2 a 10 átomos, lo más preferentemente de 2 a 5 átomos, siendo especialmente preferente 2 ó 3 átomos. Una cadena principal del grupo de engarce mínima de 2 átomos confiere la ventaja de que el resto de formación de imágenes queda bien separado de manera que minimiza cualquier interacción no deseable.

En la Fórmula I, n es preferentemente 0 ó 1, lo más preferentemente 0, es decir, no se encuentra presente ningún grupo de engarce.

- 15 Agentes de formación de imágenes preferentes de la presente invención son de Fórmula IV:



- 20 en la que el grupo $(L)_n[IM]$ está fijado al grupo amino en posición épsilon del resto de Lys. Los agentes de formación de imágenes preferentes de Fórmula IV tienen M^{IG} (Ala N-terminal) igual a acetilo y M^{IG} (Lys C-terminal) igual a amida primaria. En la Fórmula IV, n es preferentemente cero e IM es preferentemente un colorante de cianina, lo más preferentemente un colorante de cianina de Fórmula II. Agentes de formación de imágenes especialmente preferentes de Fórmula IV tienen $IM = Cy5^{**}$ o, Alexa647, idealmente $Cy5^{**}$.

Los péptidos de fórmula $Z^1\text{-[cMBP]-Z}^2$ de la presente invención pueden obtenerse mediante un procedimiento de preparación que comprende:

- 25 (i) síntesis de péptidos en fase sólida de un péptido lineal que tiene la misma secuencia peptídica que el péptido cMBP deseado y en el que el Cys^a y el Cys^b están desprotegidos, y los restos Cys^c y Cys^d tienen grupos protectores tiol;
 (ii) tratamiento del péptido de la etapa (i) con una base acuosa en solución para dar un péptido monocíclico con un primer enlace disulfuro que une Cys^a y Cys^b ;
 30 (iii) eliminación de los grupos protectores tiol de Cys^c y Cys^d y ciclación para dar un segundo enlace disulfuro que une Cys^c y Cys^d , que es el producto péptido bicíclico deseado $Z^1\text{-[cMBP]-Z}^2$.

- 35 Por la expresión "grupo protector" se entiende un grupo que inhibe o suprime las reacciones químicas no deseadas, pero que está diseñado para ser lo suficientemente reactivo como para poder ser escindido del grupo funcional en cuestión bajo condiciones lo suficientemente suaves para no modificar lo que queda de la molécula. Después de la desprotección se obtiene el producto deseado. Los grupos protectores amina son bien conocidos para los expertos en la materia y se eligen convenientemente de entre: Boc (en el que Boc es tertbutiloxycarbonilo), Fmoc (en el que Fmoc es fluorenilmetoxycarbonilo), trifluoroacetilo, aliloxycarbonilo, Dde [es decir 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo] o Npys (es decir, 3-nitro-2-piridina sulfenilo). Grupos protectores tiol adecuados son Trt (tritol), Acn (acetamidometilo), t-Bu (terc-butilo), terc-butiltio, metoxibencilo, metilbencilo o Npys (3-nitro-2-piridina sulfenilo). El uso de grupos protectores adicionales se divulga en "Protective Groups in Organic Synthesis", Theodor W. Greene y Peter G.M. Wuts, (John Wiley & Sons, 1991). Grupos protectores amina preferentes son Boc y Fmoc, lo más preferentemente Boc. Grupos amina protectores preferentes son Trt y Acn.
- 40

Los Ejemplos 1 y 2 proporcionan detalles específicos adicionales. Detalles adicionales de la síntesis de péptidos en fase sólida se divulgan en P. Lloyd-Williams, F. Albericio and E. Girald; Chemical Approaches to the Synthesis of

Peptides and Proteins, CRC Press, 1997. Es mejor almacenar los péptidos cMBP en atmósfera inerte y mantenerlos en un congelador. Cuando se usa en solución, lo mejor es evitar un pH superior a 7 ya se corre el riesgo de una desorganización de los puentes disulfuro.

Los agentes de formación de imágenes pueden prepararse tal como se divulga en el tercer aspecto (más adelante).

- 5 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el agente de formación de imágenes del primer aspecto junto con un portador biocompatible, en una forma adecuada para la administración a mamíferos.

El "portador biocompatible" es un fluido, especialmente un líquido, en el que puede suspenderse o disolverse el agente de formación de imágenes, de manera que la composición sea fisiológicamente tolerable, es decir, pueda administrarse al cuerpo de los mamíferos sin toxicidad ni molestias innecesarias. El portador biocompatible es convenientemente un líquido portador inyectable tal como agua estéril apirógena para inyección; una solución acuosa tal como solución salina (que puede estar ventajosamente equilibrada de manera que el producto final para inyección sea isotónico); una solución acuosa de una o más sustancias ajustadoras de la tonicidad (por ejemplo, sales de cationes de plasma con contraiones biocompatibles), azúcares (por ejemplo glucosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (por ejemplo, sorbitol o manitol), glicoles (por ejemplo, glicerol), u otros materiales de poliol no iónico (por ejemplo polietilenglicoles, propilenglicoles). Preferentemente, el portador biocompatible es solución salina isotónica o agua apirógena para inyección.

Los agentes de formación de imágenes y el portador biocompatible se suministran en viales o recipientes adecuados que comprenden un envase sellado que permite el mantenimiento de la integridad estéril y/o la seguridad radiactiva, y opcionalmente, un gas de espacio de cabeza inerte (por ejemplo nitrógeno o argón), que permite al mismo tiempo añadir y extraer soluciones mediante jeringa o cánula. Un envase preferente de este tipo es un vial sellado con tabique, en el que sobre el cierre hermético a los gases se pliega una cápsula de garantía (por lo general de aluminio). El cierre es adecuado para la punción única o múltiple con una aguja hipodérmica (por ejemplo, un cierre de tabique sellado plegado) al tiempo que se mantiene la integridad estéril. Tales envases tienen la ventaja adicional de que el cierre puede soportar vacío, si se desea (por ejemplo, para cambiar el gas del espacio de cabeza o desgasificar las soluciones), y puede soportar los cambios de presión tales como las reducciones de presión sin permitir el acceso a los gases atmosféricos externos, tales como oxígeno o vapor de agua.

Envases multidosis preferentes comprenden un único vial a granel (por ejemplo de 10 a 30 cm³ de volumen) que contiene dosis múltiples para el paciente, de manera que pueden extraerse así dosis unitarias para el paciente a jeringas de calidad clínica en diversos intervalos de tiempo durante la vida útil viable de la preparación para adaptarse a la situación clínica. Las jeringas precargadas están diseñadas para contener una única dosis para seres humanos, o "dosis unitaria" y por tanto son preferentemente una jeringa desechable o de otro tipo adecuada para el uso clínico. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen preferentemente una dosificación adecuada para un solo paciente y se proporcionan en una jeringa o envase adecuado, tal como se ha divulgado anteriormente.

La composición farmacéutica puede contener opcionalmente excipientes adicionales tales como un conservante antimicrobiano, un agente regulador del pH, una carga, un estabilizador o un agente de ajuste de la osmolaridad. Por la expresión "conservante antimicrobiano" se entiende un agente que inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos tales como bacterias, levaduras u hongos. El conservante antimicrobiano puede presentar también propiedades bactericidas, dependiendo de la dosificación empleada. La función principal del conservante o de los conservantes antimicrobianos de la presente invención es la de inhibir el crecimiento de cualquiera de tales microorganismos en la composición farmacéutica. Sin embargo, el conservante antimicrobiano también puede usarse opcionalmente para inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos en uno o más componentes de los kits usados para preparar dicha composición antes de la administración. Conservante(s) antimicrobianos(s) adecuado(s) incluye(n): los parabenos, es decir, parabeno de metilo, de etilo, de propilo o de butilo o mezclas de los mismos; alcohol bencílico; fenol; cresol; cetrimida y tiomersal. Conservante(s) antimicrobiano(s) preferente(s) son los parabenos.

La expresión "agente regulador del pH" se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos útiles para asegurar que el pH de la composición esté dentro de los límites aceptables (aproximadamente pH de 4,0 a 10,5) para la administración a seres humanos o a mamíferos. Tales agentes reguladores adecuados del pH incluyen tampones farmacéuticamente aceptables, tales como tricina, fosfato o TRIS [es decir *tris*(hidroximetil) aminometano], y bases farmacéuticamente aceptables tales como carbonato sódico, bicarbonato sódico o mezclas de los mismos. Cuando se emplea la composición en forma de kit, el agente regulador del pH puede proporcionarse opcionalmente en un vial o envase distinto, de manera que el usuario del kit pueda ajustar el pH como parte de un procedimiento en varias etapas.

Por el término "carga" se entiende un agente de volumen farmacéuticamente aceptable que puede facilitar la manipulación del material durante la producción y la liofilización. Cargas adecuadas incluyen sales inorgánicas tales como cloruro sódico y alcoholes de azúcares o azúcares solubles en agua tales como sacarosa, maltosa, manitol o trehalosa.

Las composiciones farmacéuticas del segundo aspecto pueden prepararse en condiciones de fabricación asépticas (es decir, en sala limpia) para dar el producto apirógeno estéril deseado. Es preferible que los componentes clave, especialmente los reactivos asociados y aquellas partes del aparato que entran en contacto con el agente de formación de imágenes (por ejemplo los viales) sean estériles. Los componentes y los reactivos pueden esterilizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen: filtración estéril, esterilización terminal usando, por ejemplo, radiación gamma, autoclavado, calor seco o tratamiento químico (por ejemplo, con óxido de etileno). Es preferible esterilizar determinados componentes de antemano, de manera que se tenga que llevar a cabo el mínimo número de manipulaciones. Sin embargo, como medida de precaución, es preferible incluir por lo menos una etapa de filtración estéril como etapa final en la preparación de la composición farmacéutica.

- 10 La composición farmacéutica del segundo aspecto puede prepararse opcionalmente a partir de un kit, tal como se divulga para el cuarto aspecto que se presenta más adelante.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación del agente de formación de imágenes del primer aspecto, que comprende una de las etapas (i) a (iv):

- 15 (i) reacción de un péptido cMBP de fórmula Z^1 -[cMBP]- Z^2 en la que Z^1 es H y Z^2 es un M^{IG} con un compuesto de fórmula Y^1 -(L)_n-[IM], para dar el agente de formación de imágenes de Fórmula I en la que [IM] se conjuga en la posición Z^1 ;
- 20 (ii) reacción de un péptido cMBP de fórmula Z^1 -[cMBP]- Z^2 en la que $Z^1=Z^2=M^{IG}$ y cMBP comprenden un resto de Asp o Glu dentro de los 4 restos de aminoácidos de los extremos terminales N o C del péptido cMBP, y todos los demás restos de Asp/Glu del péptido cMBP están protegidos, con un compuesto de fórmula Y^2 -(L)_n-[IM], para dar el agente de formación de imágenes de Fórmula I en la que [IM] se conjuga en dicho resto de Asp o Glu del péptido cMBP,
- 25 (iii) reacción de un péptido cMBP de fórmula Z^1 -[cMBP]- Z^3 en la que Z^1 es M^{IG} y Z^3 es un grupo Z^2 o un éster activado y todos los demás restos de Asp/Glu del péptido cMBP están protegidos, con un compuesto de fórmula Y^2 -(L)_n-[IM], para dar el agente de formación de imágenes de Fórmula I en la que [IM] se conjuga en la posición Z^2 ,
- 30 (iv) reacción de un péptido cMBP de fórmula Z^1 -[cMBP]- Z^2 en la que $Z^1=Z^2=M^{IG}$ y cMBP comprenden una Lys dentro de los 4 restos de aminoácidos del extremo terminal N o C del péptido cMBP, con un compuesto de fórmula Y^1 -(L)_n-[IM], para dar el agente de formación de imágenes de Fórmula I en la que [IM] se conjuga a un resto de Lys del péptido cMBP;
- 35 en la que Z^1 , cMBP, Z^2 , M^{IG} , L, n e IM son tal como se definen en el primer aspecto (anteriormente indicado), y Z^3 es un grupo Z^2 o un éster activado;
 Y^1 es un grupo ácido carboxílico, éster activado, isotiocianato o tiocianato;
 Y^2 es un grupo amino.

- 35 Las expresiones "éster activado" o "éster activo" y las formas de realización preferentes de los mismos son tal como se han divulgado anteriormente. Y^2 es preferentemente un grupo amino primario o secundario, lo más preferentemente un grupo amino primario.

- 40 El compuesto Z^1 -[cMBP]- Z^2 tiene preferentemente Z^1 y Z^2 iguales a M^{IG} . Los grupos Z^1/Z^2 y los péptidos cMBP preferentes son tal como se ha divulgado en el primer aspecto. En concreto, es preferible que el péptido cMBP comprenda un resto de Asp, Glu o Lys para facilitar la conjugación tal como se ha divulgado para los péptidos cMBP preferentes del primer aspecto. Es especialmente preferente que el péptido cMBP comprenda un resto de Lys, tal como se ha divulgado en la etapa (iv).

La preparación del Z^1 -[cMBP]- Z^2 se divulga en la primera forma de realización (anteriormente indicada). El péptido Z^1 -[cMBP]- Z^3 en el que Z^3 es un éster activo puede prepararse a partir de Z^1 -[cMBP]- Z^2 , en el que Z^2 es OH o un catión biocompatible (B^C), mediante procedimientos convencionales.

- 45 Los colorantes indicadores ópticos (IM) funcionalizados adecuados para la conjugación de péptidos están disponibles en el mercado en GE Healthcare Limited, Atto-Tec, Dyomics, Molecular Probes y otros. La mayoría de tales colorantes están disponibles como ésteres de NHS.

- 50 Procedimientos de conjugación de indicadores ópticos (IM) adecuados, en concreto colorantes, con aminoácidos y péptidos son divulgados por Licha (véase más arriba), así como Flanagan y col. [Bioconj. Chem., 8, 751-756 (1997)], Lin y col., [ibid., 13, 605-610 (2002)] y Zaheer [Mol. Imaging, 1(4), 354-364 (2002)]. Los procedimientos de conjugación del grupo de engarce (L) con péptido cMBP usan una química análoga a la de los colorantes en solitario (véase lo anteriormente indicado), y son conocidos en la técnica.

- 55 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un kit para la preparación de la composición farmacéutica del segundo aspecto, que comprende el agente de formación de imágenes del primer aspecto en una forma sólida estéril de manera que, tras la reconstitución con un suministro estéril del portador biocompatible del segundo aspecto, se produzca la disolución para dar la composición farmacéutica deseada.

En ese caso, el agente de formación de imágenes, y otros excipientes opcionales tal como se han divulgado

anteriormente, pueden proporcionarse como un polvo liofilizado en un vial o envase adecuado. A continuación, el agente se diseña para ser reconstituido con el portador biocompatible deseado a la composición farmacéutica en una forma apirógena estéril que está lista para la administración a un mamífero.

- 5 Una forma sólida estéril preferente del agente de formación de imágenes es un sólido liofilizado. La forma sólida estéril se suministra preferentemente en un envase de calidad farmacéutica, tal como se ha divulgado para la composición farmacéutica (anteriormente indicada). Cuando el kit se liofiliza, la formulación puede comprender opcionalmente un agente crioprotector elegido de entre un sacárido, preferentemente manitol, maltosa o tricina.

- 10 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la formación de imágenes ópticas *in vivo* del cuerpo de los mamíferos que comprende el uso de cualquiera de los agentes de formación de imágenes del primer aspecto o de la composición farmacéutica del segundo aspecto para obtener imágenes de los sitios de localización o sobreexpresión de cMet *in vivo*.

- 15 Por la expresión "formación de imágenes ópticas" se entiende cualquier procedimiento que forme una imagen para la detección, la determinación del estado o el diagnóstico de la enfermedad, el seguimiento del desarrollo de la enfermedad o para el seguimiento del tratamiento de la enfermedad en base a la interacción con la luz en la región del rojo al infrarrojo cercano (longitud de onda 600-1.200 nm). Las imágenes ópticas incluyen adicionalmente todos los procedimientos desde la visualización directa sin el uso de ningún dispositivo y que implica el uso de dispositivos tales como diversos endoscopios, catéteres y equipos de formación de imágenes ópticas, por ejemplo, hardware asistido por ordenador para presentaciones tomográficas. Las modalidades y las técnicas de medición incluyen: 20 formación de imágenes de luminiscencia, endoscopia, endoscopia de fluorescencia, tomografía de coherencia óptica, formación de imágenes de transmitancia, formación de imágenes de transmitancia resuelta en tiempo, formación de imágenes confocales, microscopía no lineal; formación de imágenes fotoacústicas; formación de imágenes acústico-ópticas, espectroscopia, espectroscopia de reflectancia, interferometría, interferometría de coherencia, tomografía óptica difusa y fluorescencia mediada por la tomografía óptica difusa (sistemas de onda continua, de dominio temporal y de dominio de frecuencia), y la medición de la absorción, polarización, 25 luminiscencia, vida útil de la fluorescencia, rendimiento cuántico, extinción y dispersión de la luz. Los detalles adicionales de estas técnicas se proporcionan en: (Tuan Vo-Dinh (editor): "Biomedical Photonics Handbook" (2003), CRC Press LCC; Mycek y Pogue (editores): "Handbook of Biomedical Fluorescence" (2003), Marcel Dekker, Inc., Splinter y Hopper: "An Introduction to Biomedical Optics" (2007), CRC Press LCC.

- 30 La luz de la región del verde al infrarrojo cercano tiene preferentemente una longitud de onda de 600-1.000 nm. El procedimiento de formación de imágenes ópticas es preferentemente la endoscopia de fluorescencia. El cuerpo de mamífero del quinto aspecto es preferentemente el cuerpo humano. Formas de realización preferentes del agente de formación de imágenes son tal como se ha divulgado para el primer aspecto (anteriormente indicado). En concreto, es preferible emplear un colorante fluorescente.

- 35 En el procedimiento del quinto aspecto, el agente de formación de imágenes o la composición farmacéutica se ha administrado previamente a dicho cuerpo de mamífero. Por "administrado previamente" se entiende que la etapa que implica al clínico, en la que se da al paciente el agente de formación de imágenes, por ejemplo, como una inyección intravenosa, ya se ha llevado a cabo antes de la formación de imágenes. Esta forma de realización incluye el uso del agente de formación de imágenes de la primera forma de realización para la fabricación de un agente de diagnóstico para la formación de imágenes para el diagnóstico *in vivo* de las patologías del cuerpo de los mamíferos 40 en las que está implicado cMet.

- Un procedimiento de formación de imágenes ópticas preferente del quinto aspecto es la formación de imágenes de reflectancia por fluorescencia (FRI). En la FRI, se administra el agente de formación de imágenes de la presente invención a un sujeto a diagnosticar, y posteriormente se ilumina una superficie de tejido del sujeto con una luz de excitación - normalmente una excitación de onda continua (OC). La luz excita la molécula indicadora (IM). La 45 fluorescencia del agente de formación de imágenes, que es generada por la luz de excitación, se detecta usando un detector de fluorescencia. La luz que vuelve se filtra preferentemente para separar el componente de fluorescencia (exclusiva o parcialmente). Se forma una imagen a partir de la luz fluorescente. Normalmente, se realiza un procesamiento mínimo (sin procesador para calcular los parámetros ópticos tales como la vida útil, el rendimiento cuántico, etc.) y la imagen mapea la intensidad de fluorescencia. El agente de formación de imágenes está diseñado 50 para concentrarse en el área de la enfermedad, produciendo una mayor intensidad de fluorescencia. De esta manera, el área de la enfermedad produce contraste positivo en una imagen de intensidad de fluorescencia. La imagen se obtiene preferentemente usando una microplaca o cámara CCD, de manera que sea posible la formación de imágenes en tiempo real.

- 55 La longitud de onda para la excitación varía dependiendo del tipo de colorante usado. El aparato para generar la luz de excitación puede ser una fuente de luz de excitación convencional, tal como: un láser (por ejemplo, láser de iones, láser de colorante o láser semiconductor); fuente de luz de halógena o fuente de luz xenón. Pueden usarse opcionalmente diversos filtros ópticos para obtener la longitud de onda de excitación óptima.

Un procedimiento FRI preferente comprende las etapas como sigue:

- (i) una superficie de tejido de interés dentro del cuerpo de mamífero se ilumina con una luz de excitación,
- (ii) la fluorescencia del agente de formación de imágenes, que es generado por la excitación del resto de formación de imágenes (IM), se detecta usando un detector de fluorescencia,
- (iii) la luz detectada por el detector de fluorescencia se filtra opcionalmente para separar el componente de fluorescencia,
- (iv) una imagen de dicha superficie del tejido de interés se forma a partir de la luz fluorescente de las etapas (ii) o (iii).

En la etapa (i), la luz de excitación tiene preferentemente naturaleza de onda continua (OC). En la etapa (iii), la luz detectada preferentemente se filtra. Un procedimiento FRI especialmente preferente es la endoscopia de fluorescencia.

Un procedimiento alternativo de formación de imágenes del quinto aspecto usa FDPM (migración de fotones de dominio de frecuencia). Esto tiene ventajas sobre los procedimientos de onda continua (OC) en los es importante una mayor profundidad de detección del IM dentro del tejido [Sevick-Muraca y col., Curr. Opin. Chem. Biol., 6, 642-650 (2002)]. Para tal formación de imágenes de dominio temporal/de frecuencia, resulta ventajoso que el IM tenga propiedades fluorescentes que puedan modularse dependiendo de la profundidad del tejido de la lesión de la que se formarán imágenes, y el tipo de instrumentación empleada.

El procedimiento FDPM es como sigue:

- (a) exponer el tejido biológico dispersor de luz de dicho cuerpo de mamífero que tiene una composición heterogénea, a la luz de una fuente luminosa con una intensidad predeterminada variable en el tiempo para excitar el agente de formación de imágenes, dispersando el tejido múltiplemente la luz de excitación;
- (b) detectar una emisión de luz dispersada múltiplemente desde el tejido en respuesta a dicha exposición,
- (c) cuantificar una característica de fluorescencia en todo el tejido a partir de la emisión estableciendo una serie de valores con un procesador, correspondiendo cada uno de los valores a un nivel de la característica de fluorescencia en una posición diferente dentro del tejido, variando el nivel de la característica de fluorescencia con la composición heterogénea del tejido, y
- (d) generar una imagen del tejido mapeando la composición heterogénea del tejido de acuerdo con los valores de la etapa (c).

La característica de fluorescencia de la etapa (c) corresponde preferentemente a la absorción del agente de formación de imágenes y, preferentemente, comprende adicionalmente el mapeo de una serie de cantidades correspondientes a los coeficientes de adsorción y dispersión del tejido antes de la administración del agente de formación de imágenes. La característica de fluorescencia de la etapa (c) corresponde preferentemente a por lo menos uno de entre vida útil de fluorescencia, eficacia cuántica de fluorescencia, rendimiento de fluorescencia y absorción del agente de formación de imágenes. La característica de fluorescencia es preferentemente independiente de la intensidad de la emisión e independiente de la concentración de agente de formación de imágenes.

La cuantificación de la etapa (c) comprende preferentemente: (i) establecer una estimación de los valores, (ii) determinar una emisión calculada en función de la estimación, (iii) comparar la emisión calculada con la emisión de dicha detección para determinar un error, (iv) proporcionar una estimación modificada de la característica de fluorescencia en función del error. La cuantificación comprende preferentemente la determinación de los valores a partir de una relación matemática que modeliza el comportamiento de dispersión múltiple de la luz del tejido. El procedimiento de la primera opción preferentemente comprende adicionalmente una monitorización de la propiedad metabólica del tejido *in vivo* detectando la variación de dicha característica de fluorescencia.

La formación de imágenes ópticas del quinto aspecto se usa preferentemente para ayudar a facilitar la gestión del cáncer colorrectal (CCR). Por el término "gestión del CCR" se entiende el uso en: la detección, la determinación del estado, el diagnóstico, la monitorización de la progresión de la enfermedad o la monitorización del tratamiento. Los detalles adicionales sobre procedimientos adecuados de formación de imágenes ópticas han sido revisados por Sevick-Muraca y col. [Curr. Opin. Chem. Biol., 6, 642-650 (2002)].

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona compuestos para su uso en un procedimiento de detección, determinación del estado, diagnóstico, monitorización de la progresión de la enfermedad o en la monitorización de un tratamiento del cáncer colorrectal (CCR) del cuerpo de los mamíferos.

La invención se ilustra mediante los Ejemplos que se detallan más adelante. El Ejemplo 1 proporciona la síntesis de un péptido cMBP de la invención (Compuesto 1). El Ejemplo 2 proporciona la síntesis de un péptido relacionado como control negativo, en el que la secuencia del péptido del Compuesto 1 se encuentra desorganizada. El Ejemplo 3 proporciona la síntesis del colorante de ciclina Cy5**, un colorante preferente de la invención. El Ejemplo 4 proporciona la síntesis de un éster activo de Cy5**. El Ejemplo 5 proporciona la conjugación de los colorantes de cianina de la invención con los péptidos (péptido cMBP y control). Los compuestos 3 a 7 se compararon de esta manera. El Ejemplo 6 proporciona un procedimiento de determinación de la afinidad de los péptidos por cMET *in vitro*. Los resultados demuestran que la unión es selectiva, incluso cuando se fija un resto indicador de formación de

imágenes ópticas (un colorante de cianina). El Ejemplo 7 proporciona datos sobre el ensayo *in vivo* de los Compuestos 5 y 7 en un modelo animal de cáncer. Se observaron relaciones superiores tumor:fondo con el Compuesto 5, mientras que el Compuesto 7 (control negativo) no discriminaba entre el tumor y el fondo.

Abreviaturas.

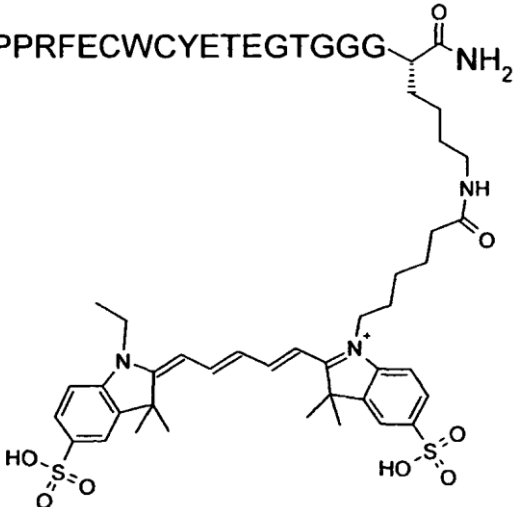
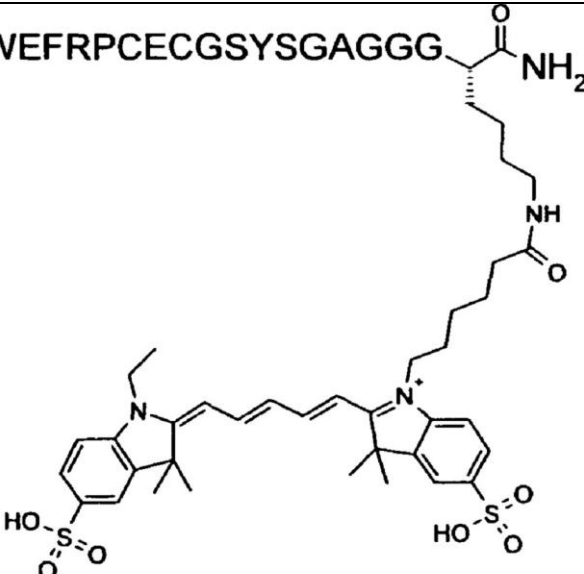
5 se usan las abreviaturas de aminoácidos de una sola letra o de 3 letras convencionales.

Acm:	acetamidometilo
ACN (o MeCN):	Acetonitrilo
Boc:	<i>terc</i> -Butiloxicarbonil
DCM:	Diclorometano
DMF:	Dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
Fmoc:	9-Fluorenilmetoxycarbonilo
HBTU:	O-Benzotriazol-1-il-N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato
HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HSPyU hexafluorofosfato	O-(N-succinimidilo)-N,N,N',N' tetrametilenuronio
NHS:	N-hidroxi-succinimida
NMM:	N-Metilmorfolina
NMP:	1-Metil-2-pirrolidinona
Pbf:	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
tBu:	t-butilo
TFA:	Ácido trifluoroacético
TIS:	Triisopropilsilano
Trt:	Tritilo

Tabla 2: estructuras de los compuestos de la invención.

Nº	Estructura de los Compuestos
1	Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH ₂
2	Ac-TGECTCPYWEFRPCECGSYSGAGGGK-NH ₂ (control negativo)

(continuación)

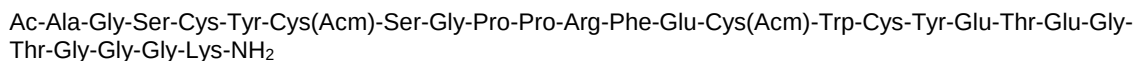
N°	Estructura de los Compuestos
3	Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGG  Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK(ε-Cy5)-NH₂
4	Ac-TGECTCPYWEFRPCECGSYSAGGG  (control negativo)

(continuación)

Nº	Estructura de los Compuestos
5	Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGG Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGG(ε-Cy5**)-NH₂
6	Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK(ε-Alexa647)-NH ₂
7	Ac-TGECTCPYWEFRPCECGSYSGAGGGK(ε-Cy5**)-NH ₂ (control negativo)

Ejemplo 1: Síntesis del Compuesto 1.Etapas (a): síntesis del péptido lineal precursor protegido.

- 5 El péptido lineal precursor tiene la estructura:



- Se ensambló la peptidil resina H-Ala-Gly-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Cys(Acm)-Ser(tBu)-Gly-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Phe-Glu-(OtBu)-Cys(Acm)-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Gly-Gly-Lys-(Boc)-polímero sobre un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433A usando la química Fmoc comenzando con 0,1 mmol de resina Rink Amide Novagel. Se aplicó un exceso de 1 mmol de aminoácidos preactivados (usando HBTU) en las etapas de acoplamiento. Se incorporó pseudoprolina Glu-Thr (Novabiochem 05-20-1122) en la secuencia. La resina se transfirió a un aparato de burbujeo de nitrógeno y se trató con una solución de anhídrido acético (1 mmol) y NMM (1 mmol) disuelta en DCM (5 ml) durante 60 minutos. La solución de anhídrido se eliminó por filtración y la resina se lavó con DCM y se secó bajo una corriente de nitrógeno.

La eliminación simultánea de los grupos protectores de la cadena lateral y la escisión del péptido a partir de la resina se llevó a cabo en TFA (10 ml) que contenía TIS al 2,5 %, 4-tiocresol al 2,5 % y agua al 2,5 % durante 2 horas y 30 minutos. La resina se eliminó por filtración, el TFA eliminó al vacío y se añadió éter dietílico al resto. El precipitado formado se lavó con éter dietílico y se secó al aire, lo que proporcionó 264 mg del péptido bruto.

- La purificación del péptido bruto mediante HPLC preparativa (gradiente: 20-30 % de B durante 40 minutos, donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5μ C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 30 minutos) proporcionó 100 mg del precursor lineal Compuesto 1 puro. El producto puro se analizó por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 minutos donde A = H₂O/ TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna

3 μ C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 6,54 minutos). La caracterización adicional del producto más se llevó a cabo usando espectrometría de masas por electronebulización (MH_2^{2+} calculado: 1464,6, MH_2^{2+} encontrado: 1465,1).

Etapla (b): Formación del puente disulfuro Cys4-16 monocíclico.

- 5 Cys4-16; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Lys-NH₂.

El precursor lineal de la etapa (a) (100 mg) se disolvió en el 5 % de DMSO/agua (200 ml) y la solución se ajustó a pH 6 usando amoníaco. La mezcla de reacción se agitó durante 5 días. A continuación se ajustó la solución a pH 2 usando TFA y la mayor parte del disolvente se eliminó por evaporación al vacío. El resto (40 ml) se inyectó en porciones sobre una columna de HPLC preparativa para la purificación del producto.

La purificación del resto por HPLC preparativa (gradiente: 0 % de B durante 10 minutos, a continuación 0-40 % de B durante 40 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 44 minutos) proporcionó 72 mg del precursor monocíclico Compuesto 1 puro.

- 15 El producto puro (como una mezcla de isómeros P1 a P3) se analizó por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50x2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 5,37 minutos (P1); 5,61 minutos (P2); 6,05 minutos (P3)). La caracterización adicional del producto se llevó a cabo usando espectrometría de masas por electronebulización (MH_2^{2+} calculado: 1463,6, MH_2^{2+} encontrado: 1464,1 (P1), 1464,4 (P2), 1464,3 (P3)).

Etapla (c): Formación del segundo puente disulfuro Cys6-14 (Compuesto 1).

- El precursor monocíclico de la etapa (b) (72 mg) se disolvió en AcOH al 75 %/agua (72 ml) bajo una manta de nitrógeno. Se añadió HCl 1 M (7,2 ml) e I₂ 0,05 M en AcOH (4,8 ml) en ese orden y se agitó la mezcla durante 45 minutos. Se añadió ácido ascórbico 1 M (1 ml) lo que proporcionó una mezcla incolora. La mayoría de los disolventes se evaporaron al vacío y el resto (18 ml) se diluyó con agua/TFA al 0,1 % (4 ml) y se purificó el producto usando HPLC preparativa.

- La purificación del resto por HPLC preparativa (gradiente: 0 % de B durante 10 minutos, a continuación 20-30 % de B durante 40 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 43-53 minutos) proporcionó 52 mg de Compuesto 1 puro. El producto puro se analizó por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 6,54 minutos). La caracterización adicional del producto se llevó a cabo usando espectrometría de masas por electronebulización (MH_2^{2+} calculado: 1391,5, MH_2^{2+} encontrado: 1392,5).

Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto 2.

Ac-Thr-Gly-Glu-Cys-Thr-Cys(Acm)-Pro-Tyr-Trp-Glu-Phe-Arg-Pro-Cys(Acm)-Glu-Cys-Gly-Ser-Tyr-Ser-Gly-Ala-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂

El Compuesto 2 es un control negativo, en el que se ha desorganizado la secuencia del péptido del Compuesto 1.

Etapla (a): síntesis del péptido lineal precursor protegido.

- 40 Se ensambló la peptidil resina H-Thr(tBu)-Gly-Glu(OtBu)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-Cys(Acm)-Pro-Tyr(tBu)-Trp(Boc)-Glu(OtBu)-Phe-Arg(Pbf)-Pro-Cys(Acm)-Glu(OtBu)-Cys(Trt)-Gly-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Ser($\psi^{Me,Me}_{pro}$)-Gly-Ala-Gly-Gly-Lys(Boc)-polímero sobre un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433A usando la química Fmoc comenzando con 0,1 mmol de resina Rink Amide Novagel. Se aplicó un exceso de 1 mmol de aminoácidos preactivados (usando HBTU) en las etapas de acoplamiento. Se incorporó la pseudoprolina Tyr-Ser (Novabiochem 05-20-1014) en la secuencia. La resina se transfirió a un aparato de burbujeo de nitrógeno y se trató con una solución de anhídrido acético (1 mmol) y NMM (1 mmol) disuelto en DCM (5 ml) durante 60 minutos. La solución de anhídrido se eliminó por filtración y la resina se lavó con DCM y se secó bajo una corriente de nitrógeno.

- La eliminación simultánea de los grupos protectores de la cadena lateral y la escisión del péptido a partir de la resina se llevó a cabo en TFA (10 ml) que contenía TIS AL 2,5 %, 4-tiocresol al 2,5 % y agua al 2,5 % durante 2 horas y 10 minutos. Se eliminó La resina por filtración, se eliminó el TFA al vacío y se añadió éter dietílico al resto. El precipitado formado se lavó con éter dietílico y se secó al aire, lo que proporcionó 216 mg del péptido bruto.

La purificación del péptido bruto por HPLC preparativa (gradiente: 20-30 % de B durante 40 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 50 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 50 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 34,1 minutos) proporcionó el precursor lineal

control negativo DX-1662 puro disuelto en 200 ml de ACN/agua. El producto puro se analizó por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 5 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 0,6 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 3,52 minutos). La caracterización adicional del producto se llevó a cabo usando espectrometría de masas por electronebulización (MH₂²⁺ calculado: 1464,6, MH₂²⁺ encontrado: 1464,9).

Etapa (b): Formación del puente disulfuro Cys4-16 monocíclico.

Cys4-16; Ac-Thr-Gly-Glu-Cys-Thr-Cys(Acm)-Pro-Tyr-Trp-Glu-Phe-Arg-Pro-Cys(Acm)-Glu-Cys-Gly-Ser-Tyr-Ser-Gly-Ala-Gly-Gly-Lys-NH₂

Se añadió DMSO (10 ml) a la solución de precursor lineal de control negativo de la etapa (a) (200 ml, véase 4.3.1) y la solución se ajustó a pH 7 usando amoníaco. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 18 horas, a continuación a 60 °C durante 60 minutos. La solución se ajustó a pH 2 usando TFA y se eliminó el ACN por evaporación al vacío. El resto se sometió a purificación por HPLC preparativa.

La purificación del resto por HPLC preparativa (gradiente: 0 % de B durante 5 minutos, a continuación 20-30 % de B durante 60 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 50 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 50 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 29,6 minutos) proporcionó el precursor monocíclico de control negativo puro en 100 ml de ACN/agua. El producto puro se analizó por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 5 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 0,6 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 3,46 minutos). La caracterización adicional del producto se llevó a cabo usando espectrometría de masas por electronebulización (MH₂²⁺ calculado: 1463,6, MH₂²⁺ encontrado: 1463,7).

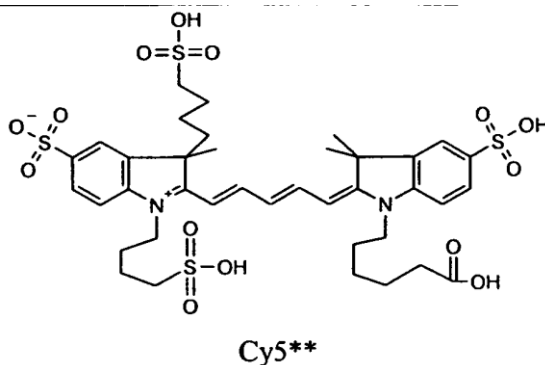
Etapa (c): Formación del segundo puente disulfuro Cys6-14 (Compuesto 2).

Cys4-16, 6-14; Ac-Thr-Gly-Glu-Cys-Thr-Cys-Pro-Tyr-Trp-Glu-Phe-Arg-Pro-Cys-Glu-Cys-Gly-Ser-Tyr-Ser-Gly-Ala-Gly-Gly-Lys-NH₂.

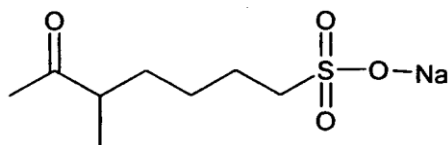
Se diluyó la solución de precursor monocíclico de control negativo de la etapa (b) (100 ml) con AcOH (100 ml). Se añadió HCl 1 M (5 ml) e I₂ 0,05 M en AcOH (7 ml) en ese orden bajo una manta de argón y se agitó la mezcla durante 20 minutos. Se añadió ácido ascórbico 1 M (1 ml) lo que proporcionó una mezcla incolora. La mayoría de los disolventes se evaporaron al vacío y el resto (30 ml) se diluyó con agua/TFA al 0,1 % (100 ml) y se purificó el producto usando HPLC preparativa.

La purificación del resto por HPLC preparativa (gradiente: 0 % de B durante 10 minutos, a continuación 20-30 % de B durante 60 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 50 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 50 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 32,8 minutos) proporcionó 30 mg de Compuesto 2 puro. El producto puro se analizó por HPLC analítica (gradiente: 10-40 % de B durante 10 minutos donde A = H₂O/TFA al 0,1 % y B = ACN/TFA al 0,1 %, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 6,54 minutos). La caracterización adicional del producto se llevó a cabo usando espectrometría de masas por electronebulización (MH₂²⁺ calculado: 1391,5, NM₂²⁺ encontrado: 1392,5).

Ejemplo 3: Síntesis del colorante de cianina 2-1{(1E,3E,5E)-5-[1-(5-carboxipentilo)-3,3-dimetil-5-sulfo-1,3-dihidro-2H-indol-2-iliden]penta-1,3-dienil}-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (Cy5).**

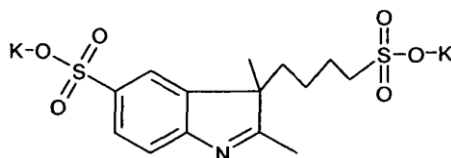


(3a) ácido 5-Metil-6-oxoheptano-1-sulfónico.



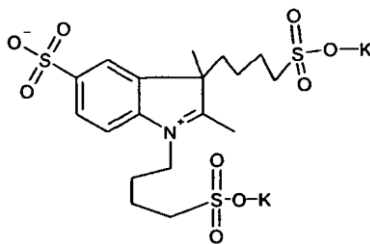
Se añadió, gota a gota, etil 2-metilacetoacetato (50 g) en DMF (25 ml) a una suspensión de hidruro sódico (12,0 g de NaH al 60 % en aceite mineral) en DMF (100 ml) con enfriamiento en baño de hielo durante 1 hora, (temperatura interna 0-4 °C). Se dejó calentar esta mezcla a temperatura ambiente durante 45 minutos con agitación antes de volver a enfriar. A continuación se añadió, gota a gota, una solución de 1,4-butanosultona (45 g) en DMF (25 ml) durante 15 minutos. La mezcla final se calentó a 60 °C durante 18 horas. El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria y el resto se repartió entre agua y éter dietílico. Se recogió la capa acuosa, se lavó con éter dietílico fresco y se sometió a evaporación rotatoria para dar una espuma pegajosa. Este intermediario se disolvió en agua (100 ml) e hidróxido sódico (17,8 g) durante 15 minutos con agitación. La mezcla se calentó a 90 °C durante 18 horas. La mezcla de reacción enfriada se ajustó a ~pH 2 por adición de ácido clorhídrico concentrado (~40 ml). La solución se sometió a evaporación rotatoria y se secó bajo vacío. Se lavó el sólido amarillo con etanol que contenía ácido clorhídrico al 2 % (3 x 150 ml). Se filtró la solución etanólica, se sometió a evaporación rotatoria y se secó bajo vacío para dar un sólido amarillo. Rendimiento 70 g.

(3b) ácido 2,3-Dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indol-5-sulfónico, sal dipotásica.



Se mezclaron y se calentaron a reflujo ácido 4-Hidrazinobencenosulfónico (40 g), ácido 5-metil-6-oxoheptano-1-sulfónico (de 3a; 60g) y ácido acético (500 ml) durante 6 horas. El disolvente se filtró, se sometió a evaporación rotatoria y se secó bajo vacío. El sólido se disolvió en metanol (1 l). A esto se añadió hidróxido potásico metanólico 2 M (300 ml). La mezcla se agitó durante 3 horas y a continuación se redujo el volumen de disolvente en un 50 % usando evaporación rotatoria. El precipitado resultante se filtró, se lavó con metanol y se secó bajo vacío. Rendimiento 60 g. MS (LCMS): MH^+ 362. Masa Exacta: Encontrada, 362,0729. $MH^+ = C_{14}H_{20}NO_6S_2$ requiere m/z 362,0732 (-0,8 ppm).

(3c) Ácido 2,3-Dimetil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato, sal dipotásica.

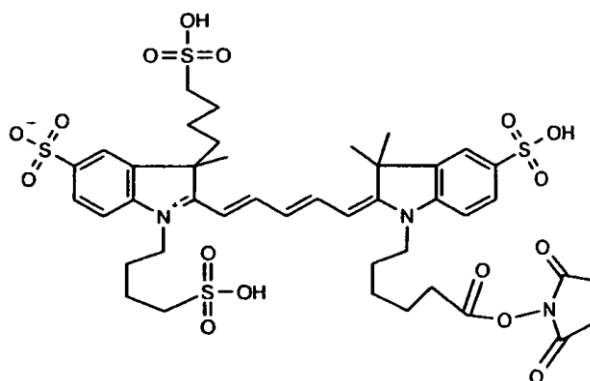


Se calentó ácido 2,3-Dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indol-5-sulfónico (de 3b; 60g) con 1,4-butanosultona (180g) y tetrametilsulfona (146 ml) a 140 °C durante 16 horas. El sólido rojo resultante se lavó con éter dietílico, se molió hasta polvo y se secó bajo vacío. Rendimiento 60 g.

(3d) Cy5**, como sal de TFA.

Se calentaron ácido 1-(5'-Carboxipentilo)-2,3,3-trimetil-indolenio bromuro-5-sulfónico, sal K^+ (2,7 g), monoclóhidrato de malonaldehído bis(fenilimina) (960 mg), anhídrido acético (36 ml) y ácido acético (18 ml) a 120 °C durante 1 hora para dar una solución de color marrón oscuro-rojo. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla 2,3-Dimetil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (de 3c; 8,1 g) y acetato potásico (4,5 g), que se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La solución de color azul resultante se precipitó usando acetato de etilo y se secó bajo vacío. El colorante bruto se purificó mediante cromatografía líquida (RPC₁₈. Gradiente agua + TFA al 0,1 %/MeCN + TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el pico principal de colorante se recogieron, se agruparon y se evaporaron bajo vacío para dar el colorante del título, 2 g. UV/Vis (Agua + TFA al 0,1 %): 650 nm. MS (MALDI-TOF): MH^+ 887,1. $MH^+ = C_{38}H_{50}N_2O_{14}S_4$ requiere m/z 887,1.

Ejemplo 4: Síntesis de 2-[(1E,3E,5E)-5-(1-{6-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-6-oxohexil}-3,3-dimetil-5-sulfo-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno)penta-1,3-dienil]-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato, sal de diisopropiletilamina (NHS Éster de Cy5).**



Se disolvió Cy5** (Ejemplo 3; 10 mg) en DMSO anhidro (3 ml); a esto se añadieron HSPyU (20 mg) y N,N'-diisopropiletilamina (80 µl). La solución resultante se mezcló durante 3 horas, después de lo cual la TLC (RPC18. Agua/MeCN) puso de manifiesto una reacción completa. El colorante se aisló por precipitación en acetato de etilo/éter dietílico, se filtró, se lavó con acetato de etilo y se secó bajo vacío. UV/VIS (Agua) 650 nm. MS (MALDI-TOF) MH^+ 983.5. $MH^+ = C_{42}H_{53}N_3O_{16}S_4$ requiere m/z 984,16.

Ejemplo 5: Conjugación de colorantes, Síntesis de los Compuestos 3 a 7.

Cys4-16, 6-14; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys(Cy5)-NH₂ (Compuesto 3).

- 10 El compuesto 1 (10 mg), NMM (4 µl) y Cy5 NHS éster (5,7 mg; GE Healthcare PA15104) se disolvieron en NMP (1 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 7 horas. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con ACN/agua al 5 % (8 ml) y el producto se purificó usando HPLC preparativa.

- 15 La purificación del péptido bruto por HPLC preparativa (gradiente: 5-50 % de B durante 40 minutos donde A = H₂O/HCOOH al 0,1 % y B = ACN/HCOOH al 0,1 %, caudal: 10 ml/min, columna: Phenomenex Luna 5µ C18 (2) 250 x 21,20 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 35,5 minutos) proporcionó 8,1 mg del Compuesto 3 puro. El producto puro se analizó por HPLC analítica (gradiente: 5-50 % de B durante 10 minutos donde A = H₂O/HCOOH al 0,1 % y B = ACN/HCOOH al 0,1 %, caudal: 0,3 ml/min, columna: Phenomenex Luna 3µ C18 (2) 50 x 2 mm, detección: UV 214 nm, tiempo de retención del producto: 8,15 minutos). La caracterización adicional del producto se llevó a cabo usando espectrometría de masas por electronebulización (MH_2^{2+} calculado: 1710,6, MH_2^{2+} encontrado: 1711,0). El Compuesto 4 se preparó de manera similar - espectrometría de masas por electronebulización (MH_2^{2+} calculado: 1710,6, NM_2^{2+} encontrado: 1710,9).

Se prepararon otros conjugados colorante-péptido (Compuestos 5 a 7) mediante procedimientos análogos. Alexa647 se adquirió en Molecular Probes (A20106):

- 25 Compuesto 5 (NM_2^{2+} calculado: 1825,7, NM_2^{2+} encontrado: 1825,9),
Compuesto 6 (MH_2^{2+} calculado: 1811,7, NM_2^{2+} encontrado: 1812,0),
Compuesto 7 (MH_2^{2+} calculado: 1825,7, NM_2^{2+} encontrado: 1826,2).

Ejemplo 6: Ensayo de polarización de fluorescencia *in vitro*.

El principio del procedimiento de polarización de fluorescencia puede divulgarse brevemente como sigue:

- 30 La luz monocromática pasa a través de un filtro de polarización horizontal y excita las moléculas fluorescentes de la muestra. Sólo aquellas moléculas que se han orientado correctamente en el plano polarizado verticalmente absorben la luz, se excitan, y, posteriormente emiten luz. La luz emitida se mide en los planos horizontal y vertical. El valor de anisotropía (A), es la relación entre las intensidades de luz que siguen la ecuación

$$A = \frac{\text{intensidad con polarizador horizontal} - \text{Intensidad con polarizador vertical}}{\text{intensidad con el polarizador horizontal} + 2 * \text{Intensidad con el polarizador vertical}}$$

Intensidad con el polarizador horizontal + 2 Intensidad con el polarizador vertical*

- 35 Las mediciones de anisotropía de fluorescencia se realizaron en microplacas de 384 pocillos en un volumen de 10 µl en tampón de unión (PBS, Tween-20 al 0,01 %, pH 7,5) usando un lector de placas de polarización de fluorescencia Tecan Safire (Tecan, EE.UU.) a ex646/em678 nm. La concentración de colorante-péptido marcado se mantuvo constante (20 nm) y las concentraciones de las quimeras c-Met/Fc de ratón o humanas (R&D Systems) o Semaforina 6A (R&D Systems) se variaron de 0-150 nm. Las mezclas de unión se equilibraron en la microplaca durante 10 minutos a 30 °C. El cambio observado en la anisotropía se ajustaba a la ecuación

$$r_{obs} = r_{free} + (r_{bound} - r_{free}) \frac{(K_D + c_{Met} + P) - \sqrt{(K_D + c_{Met} + P)^2 - 4 \cdot c_{Met} \cdot P}}{2 \cdot P}$$

en la que *r_{obs}* es la anisotropía observada, *r_{free}* es la anisotropía del péptido libre, *r_{bound}* es la anisotropía del péptido unido, *K_D* es la constante de disociación, *c_{Met}* es la concentración total de c-Met, y *P* es la concentración total del péptido marcado con colorante. La ecuación supone que el péptido sintético y el receptor forman un complejo reversible en solución con estequiometría 1:1. El ajuste de datos se realizó a través de la regresión no lineal usando el software GraphPad Prism para obtener el valor *K_D* (unión un solo sitio).

Los compuestos 3 y 4 se sometieron a ensayo para verificar la unión hacia c-Met de ratón y humano (quimera de Fc). Los resultados mostraron una *K_D* de 3 +/- 1 nM para la unión del Compuesto 3 a c-Met humano. No hubo unión del Compuesto 4 a c-Met humano. Además, los Compuestos 3 y 4 no mostraron unión a c-Met de ratón en el intervalo sometido a ensayo.

Usando el mismo procedimiento, el Compuesto 5 resultó tener una *K_D* para cMet humano de 1,1 nM.

Ejemplo 7: Ensayos *in vivo* de los Compuestos 5 y 7.

(a) Modelo Animal.

En el estudio se usaron 54 ratones desnudos hembra BALB c/A (Bom). El uso de los animales fue aprobado por el comité de ética local. BALB/c desnudo es una cepa de ratones endogámicos inmunocomprometidos con una alta tasa de aceptación de tumores humanos en comparación con otras cepas de ratones desnudos. Los ratones tenían 4 semanas de edad a la llegada y un peso corporal de aproximadamente 20 gramos al comienzo del estudio. Los animales fueron alojados en jaulas ventiladas individualmente (IVC, Scanbur BK) con aire filtrado con HEPA. Los animales tuvieron acceso a discreción a una dieta "Rat and Mouse nr. 3 Breeding" (Scanbur BK) y agua del grifo acidificada por adición de HCl a una concentración molar de 1 mM (pH 3,0).

La célula de cáncer de colon HCT-15 se obtiene a partir de carcinomas de colon humanos y se ha informado que expresa c-Met de acuerdo con Zeng y col. [Clin. Exp. Metastasis, 21, 409-417. (2004)]. La línea celular demostró ser tumorigénica cuando se inoculaba por vía subcutánea en ratones desnudos [Flatmark y col., Eur. J. Cancer 40,1593-1598 (2004)].

Se cultivaron células HCT-15 y se prepararon para la inoculación subcutánea en RPIM (Sigma Cat # R0883) con suero al 10 % y penicilina/estreptomicina. Las reservas se hicieron en el paso número cuatro (P4) y se congelaron para su almacenamiento en nitrógeno líquido a 3×10^7 células/vial en el medio de cultivo que contenía DMSO al 5 %. El día del trasplante, se descongelaron rápidamente las células en un baño de agua a 37 °C (aproximadamente 2 minutos), se lavaron y se resuspendieron en PBS/suero al 2 % (centrifugación a 1.200 rpm durante 10 minutos). Se aseguró la mezcla completa de las células en los viales cada vez que las células eran aspiradas en la jeringa de dosificación. Se inyectaron volúmenes de 0,1 ml de suspensión de células por vía subcutánea en el hombro y en el lomo usando una aguja de calibre fino (25 G), mientras los animales estaban bajo anestesia ligera de gas. A continuación se devolvió los animales a sus jaulas y se dejó crecer los tumores durante 13 a 17 días. Se dejó a los animales un período de aclimatación de por lo menos 5 días antes del procedimiento de inoculación.

(b) procedimiento.

Todas las sustancias de ensayo se reconstituyeron con PBS a partir de polvo liofilizado. Se formó la imagen de una pila pequeña de papel blanco de impresora para obtener una imagen de campo plano que se usó para corregir las inhomogeneidades de iluminación. Las sustancias de ensayo se inyectaron por vía intravenosa en la vena lateral de la cola durante la fijación física. El volumen de inyección fue de 0,1 ml, que corresponde a una dosis de 1 nmol de la sustancia de ensayo por animal. Después de la inyección se devolvió a los animales a sus jaulas. Los animales fueron sacrificados inmediatamente antes de la formación de imágenes por dislocación cervical. El instante de tiempo óptimo para la formación de imágenes para cada sustancia de ensayo se estimó en base a la comparación de las tasas de eliminación por lavado en la piel y en el tejido muscular en un número limitado de animales (*n* = 1-6). El instante de tiempo de formación de imágenes para los compuestos 3 y 4 fue de 120 minutos después de la inyección. Por cada animal los tumores crecidos subcutáneamente se extirparon *post mortem*. Del borde de uno de los tumores se realizó un corte fino, de aproximadamente 1,6 mm de espesor y 3-4 mm de diámetro. A continuación se formaron imágenes del corte del tumor contra un área del colon normal del mismo animal.

(c) formación de imágenes.

La formación de imágenes se realizó a través de un laparoscopia clínico adaptado para usar una fuente luminosa para excitar al indicador y un sistema de filtrado para extraer el componente de fluorescencia. Se usó un láser de 635 nm para la excitación de la molécula indicadora. Como detector se usó una cámara CCD Hamamatsu ORCA ERG. La cámara fue operada en modo binning 2x2 con una ganancia de 0. El tiempo de exposición convencional para la formación de imágenes del colon fue 10 s. Las mediciones de calibración del sistema indican que el tiempo de exposición de 10 segundos con el sistema de formación de imágenes de animales corresponde a 40 ms de

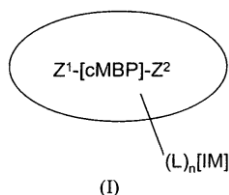
5 exposición con una fuente luminosa, un campo de visión, y una distancia a la superficie del tejido clínicamente pertinente. La distribución de la intensidad en la imagen se corrigió para las inhomogeneidades de iluminación a través de los datos de calibración del sistema. Se calculó una relación entre la diana y el fondo a partir de las regiones de interés colocadas sobre el tumor, y el fondo del colon normal. Las imágenes se puntuaron visualmente usando el sistema de puntuación convencional empleado para el análisis de las características de funcionamiento del receptor.

(d) Resultados.

10 El Compuesto 5 tenía una relación entre tumor y normal de 1,46:1 y el péptido de control desorganizado correspondiente con el mismo colorante (Compuesto 7) tenía un relación de 1,04:1. El Compuesto 5 tenía un tumor fácilmente identificable, mientras que no se podía advertir nada contra el fondo con el Compuesto 7.

REIVINDICACIONES

1 Un agente de formación de imágenes que comprende un conjugado de Fórmula I:



en la que:

5 Z^1 está fijado al extremo N-terminal de cMBP, y es H o M^{IG} , Z^2 está fijado al extremo C-terminal de cMBP y es OH, OB^c o M^{IG} , en la que B^c es un catión biocompatible; cMBP es un péptido cíclico de unión a cMet de 17 a 30 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos (SEC-1):

10 Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶; en la que X¹ es Asn, His o Tyr;
X² es Gly, Ser, Thr o Asn;
X³ es Thr o Arg;
X⁴ es Ala, Asp, Glu, Gly o Ser;
X⁵ es Ser o Thr;
15 X⁶ es Asp o Glu;
y Cys^{a-d} son cada uno restos de cisteína de manera que esos restos a y b así como c y d se ciclan para formar dos enlaces disulfuro distintos;

20 M^{IG} es un grupo inhibidor del metabolismo que es un grupo biocompatible que inhibe o suprime el metabolismo *in vivo* del péptido;
L es un grupo de engarce sintético de fórmula $-(A)_m-$ en la que cada A es independientemente $-CR_2-$, $-CR=CR-$, $-C\equiv C-$, $-CR_2CO_2-$, $-CO_2CR_2-$, $-NRCO-$, $-CONR-$, $-NR(C=O)NR-$, $-NR(C=S)NR-$, $-SO_2NR-$, $-NRSO_2-$, $-CR_2OCR_2-$, $-CR_2SCR_2-$, $-CR_2NRCR_2-$, un grupo cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arileno C₅₋₁₂, o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂, un aminoácido, un azúcar o un componente básico de polietilenglicol (PEG) monodisperso;
25 cada R se elige independientemente de entre H, alquilo C₁₋₄, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄, alcoxialquilo C₁₋₄ o hidroxialquilo C₁₋₄,
m es un número entero de un valor de 1 a 20;
n es un número entero de un valor de 0 ó 1;
IM es un resto indicador de formación de imágenes ópticas adecuado para la formación de imágenes del cuerpo de los mamíferos *in vivo* usando luz de una longitud de onda del verde al infrarrojo cercano de 600-1.200 nm.

35 2. El agente de formación de imágenes según la reivindicación 1, en el que además de la SEC-1, el cMBP comprende adicionalmente un resto de Asp o Glu dentro de los 4 restos de aminoácidos del extremo terminal C o N del péptido cMBP, y $-(L)_nIM$ se funcionaliza con un grupo amino que se conjuga con la cadena lateral carboxilo de dicho resto de Asp o Glu para dar un enlace amida.

3. El agente de formación de imágenes según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que además de la SEC-1, el cMBP comprende un resto de Lys dentro de 4 restos de aminoácidos del extremo terminal C o N del péptido cMBP, y $-(L)_nIM$ se funcionaliza con un grupo carboxilo que se conjuga con la amina épsilon de la cadena lateral de dicho resto de Lys para dar un enlace amida.

40 4. El agente de formación de imágenes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cMBP comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC-2 o la SEC-3:

Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶ (SEC-2);
Ala-Gly-Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-Gly-Thr (SEC-3).

45 5. El agente de formación de imágenes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que además de la SEC-1, la SEC-2 o la SEC-3, cMBP comprende adicionalmente en el extremo terminal N o C un péptido de engarce que se elige de entre -Gly-Gly-Gly-Lys- (SEC-4), -Gly-Ser-Gly-Lys- (SEC-PN0744 EP 5) o -Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEC-6).

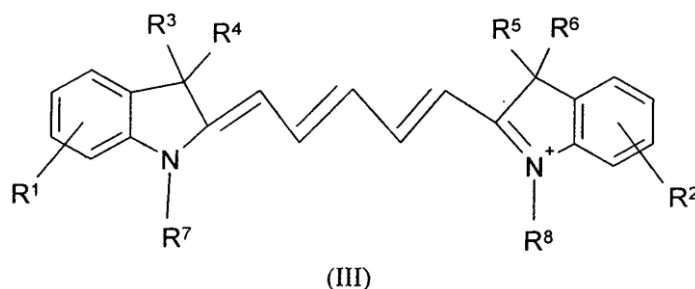
6. El agente de formación de imágenes según la reivindicación 5, en el que cMBP tiene la secuencia de aminoácidos (SEC-7):

Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys.

7. El agente de formación de imágenes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que IM es un colorante que tiene un máximo de absorción en el intervalo de 600-1.000 nm.

5 8. El agente de formación de imágenes según la reivindicación 7, en el que IM es un colorante de cianina.

9. El agente de formación de imágenes según la reivindicación 8, en el que el colorante de cianina es de Fórmula III:



en la que:

- 10 R^1 y R^2 son independientemente H o SO_3M^1 , y por lo menos uno de R^1 y R^2 es SO_3M^1 , en la que M^1 es H o B^{C} ;
 R^3 y R^4 son independientemente alquilo C_{1-4} o carboxialquilo C_{1-6} ;
 R^5 , R^6 , R^7 y R^8 son independientemente grupos R^a ;
 en la que R^a es alquilo C_{1-4} , carboxialquilo C_{1-6} o $-(\text{CH}_2)_k\text{SO}_3\text{M}^1$, en la que k es un número entero de un valor de 3 ó 4;
 15 con la condición de que el colorante de cianina tenga un total de 1 a 4 sustituyentes SO_3M^1 en los grupos R^1 , R^2 y R^a .

10. El agente de formación de imágenes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que cMBP es tal como se define en la reivindicación 6, Z^1 es acetilo y Z^2 es una amida primaria, e IM es tal como se define en las reivindicaciones 3 y 9.

20 11. Una composición farmacéutica que comprende el agente de formación de imágenes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 junto con un portador biocompatible, en una forma adecuada para la administración a mamíferos.

12. Un procedimiento de preparación del agente de formación de imágenes según las reivindicaciones 1 a 10, que comprende una de las etapas (i) a (iv):

- 25 (i) reacción de un péptido cMBP de fórmula $\text{Z}^1\text{-[cMBP]-Z}^2$ en la que Z^1 es H y Z^2 es un M^{IG} con un compuesto de fórmula $\text{Y}^1\text{-(L)}_n\text{-[IM]}$, para dar el agente de formación de imágenes de Fórmula I en la que [IM] se conjuga en la posición Z^1 ;
 (ii) reacción de un péptido cMBP de fórmula $\text{Z}^1\text{-[cMBP]-Z}^2$ en la que $\text{Z}^1=\text{Z}^2=\text{M}^{\text{IG}}$ y cMBP comprende un resto de Asp o Glu dentro de 4 restos de aminoácidos de los extremos terminales C o N del péptido cMBP, y todos los demás restos de Asp/Glu del péptido cMBP están protegidos, con un compuesto de fórmula $\text{Y}^2\text{-(L)}_n\text{-[IM]}$, para dar el agente de formación de imágenes de Fórmula I en la que [IM] se conjuga en dicho resto de Asp o Glu del péptido cMBP;
 30 (iii) reacción de un péptido cMBP de fórmula $\text{Z}^1\text{-[cMBP]-Z}^3$ en la que Z^1 es M^{IG} y Z^3 es un grupo Z^2 o un éster activado y todos los demás restos de Asp/Glu de los péptidos cMBP están protegidos, con un compuesto de fórmula $\text{Y}^2\text{-(L)}_n\text{-[IM]}$, para dar el agente de formación de imágenes de Fórmula I en la que [IM] se conjuga en la posición Z^2 ;
 35 (iv) reacción de un péptido cMBP de fórmula $\text{Z}^1\text{-[cMBP]-Z}^2$ en la que $\text{Z}^1=\text{Z}^2=\text{M}^{\text{IG}}$ y cMBP comprende una Lys dentro de 4 restos de aminoácidos del extremo terminal C o N del péptido cMBP, con un compuesto de fórmula $\text{Y}^1\text{-(L)}_n\text{-[IM]}$, para dar el agente de formación de imágenes de Fórmula I en la que [IM] se conjuga en un resto de Lys del péptido cMBP;
 40 en la que Z^1 , cMBP, Z^2 , M^{IG} , L, n e IM son tal como se define en la reivindicación 1, y Z^3 es un grupo Z^2 o un éster activado;
 Y^1 es un grupo ácido carboxílico, éster activado, tiocianato o isotiocianato; Y^2 es un grupo amino.

45 13. Un kit para la preparación de la composición farmacéutica según la reivindicación 11 que comprende el agente de formación de imágenes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en una forma sólida estéril, de manera que tras la reconstitución con un suministro estéril del portador biocompatible tal como se define en la reivindicación 11, se produzca la disolución para dar la composición farmacéutica deseada.

14. Un procedimiento de formación de imágenes ópticas *in vivo* del cuerpo de los mamíferos que comprende el uso del agente de formación de imágenes según las reivindicaciones 1 a 10 o de la composición farmacéutica según la reivindicación 11 para obtener imágenes de los sitios de localización o sobreexpresión de cMet *in vivo*.

- 5 15. El agente de formación de imágenes según las reivindicaciones 1 a 10 o la composición farmacéutica según la reivindicación 11 para su uso en un procedimiento de detección, determinación del estado, diagnóstico, monitorización de la progresión de la enfermedad o monitorización del tratamiento del cáncer colorrectal (CCR) del cuerpo de los mamíferos.