(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 386 073**

(51) Int. CI.:

B82Y 5/00	(2011.01)
C07K 7/06	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)
A61K 49/14	(2006.01)
A61K 49/18	(2006.01)
A61K 51/08	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **10195948 .4**

(96) Fecha de presentación: **28.03.2008**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2322538**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2011**

(54) Título: **Compuestos para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la expresión de VCAM**

(30) Prioridad:
28.03.2007 FR 0754087

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.08.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.08.2012

(73) Titular/es:
GUERBET
15, Rue des Vanesses
93420 Villepinte, FR

(72) Inventor/es:
Port, Marc;
Rousseaux, Olivier;
Muller, Robert y
Burtea, Carmen

(74) Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la expresión de VCAM.

La presente invención se refiere a compuestos de diagnóstico de enfermedades relacionadas con la expresión de VCAM, a su procedimiento de preparación y a su uso en la formación de imágenes médicas.

La VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule - 1) es una inmunoglobulina de interés en particular diagnóstico en las patologías cardiovasculares. Efectivamente, la VCAM-1 es un marcador de las zonas predispuestas a volverse ateromatosas. La VCAM-1 está muy sobreexpresada en las células endoteliales activadas. Como otras moléculas de adhesión, tales como ICAM-1, 2 y 3, la VCAM-1 está implicada en la adhesión de leucocitos al endotelio en el transcurso de la aterosclerosis. Se han descrito varios modelos *in vivo*. En las lesiones ateroescleróticas avanzadas, la expresión de VCAM-1 es positiva a nivel del endotelio que cubre la placa; la VCAM-1 está presente asimismo en células endoteliales en la proximidad de lesiones y es muy abundante en la íntima, a nivel de las células musculares lisas

En el ser humano, la expresión de VCAM-1 en las arterias ateroscleróticas aórticas y femorales humanas se ha descrito de la forma siguiente:

- arteria de apariencia sana: expresión baja a nivel del endotelio
- arteria con engrosamiento de la neoíntima sin infiltración macrofágica: ligero aumento endotelial de VCAM-1
- lesión desarrollada, que contiene macrófagos "maduros": expresión duplicada con respecto a la situación anterior
- lesión desarrollada, que comprende una infiltración reciente de macrófagos: inmunomarcaje significativamente más elevado, que recubre una parte elevada de la zona endotelial.

A nivel de las coronarias, la VCAM-1 se expresa solo en el endotelio de las placas, y no a nivel de las paredes sanas.

En el campo oncológico, la VCAM participa en la adhesión de los linfocitos, de los monocitos y de los polinucleares eosinófilos a las células endoteliales activadas mediante la integrina alfa4beta1. Se expresa en gran medida en patologías tales como la colitis ulcerosa crónica o la enfermedad de Crohn. Al igual que la ICAM-1, se sobreexpresaría en la periferia de los cánceres y podría participar en los procesos metastásicos.

El documento FR 2 876 033 describe la utilización de un ligando de VCAM-1 para la fabricación de un agente destinado a la detección o al tratamiento de una enfermedad cardiovascular, en la que el péptido está asociado a un marcador.

Se sigue investigando una mejora de la calidad del diagnóstico *in vivo* de enfermedades cardiovasculares y cancerosas con la ayuda de nuevos marcadores muy específicos, destinados a las modalidades de formación de imágenes conocidas por el experto en la materia, especialmente IRM, rayos X, gammagrafía, escáner CT, ultrasonidos, PET y la formación de imágenes ópticas. Se recuerda que, en el caso de la IRM, se obtiene un contraste gracias a la administración de agentes de contraste que contienen metales paramagnéticos o superparamagnéticos que tienen efecto sobre la relaxividad de los protones del agua. En el caso de la gammagrafía, se obtiene el contraste mediante la localización específica de un compuesto radiofarmacéutico que emite rayos gamma o beta.

Se buscan compuestos cuya síntesis química no sea demasiado compleja, suficientemente estables *in vivo* para una utilización en la formación de imágenes médicas y cuyo precio de coste no sea demasiado elevado, y esto especialmente para IRM, con el fin de no utilizar elementos radiactivos complejos de utilizar.

La solicitante ha conseguido obtener unos compuestos que comprenden una parte de orientación a zonas de VCAM, eficaces no solo *in vitro* sino también y sobre todo en IRM *in vivo*. Dichos compuestos son efectivamente difíciles de obtener, pues hace falta no solo identificar un biovector eficaz *in vitro*, sino obtener un compuesto eficaz para la formación de imágenes de diagnóstico clínico humano. Este es particularmente el caso para IRM, que se reconoce que es una técnica muy solicitada por ser sin radiactividad, pero cuya sensibilidad es netamente muy inferior a la de la medicina nuclear.

El compuesto obtenido debe tener a la vez una afinidad suficiente para reconocer su diana, una alta especificidad para ser un indicador distintivo del estado patológico, una estabilidad apropiada para no degradarse ni modificarse *in vivo*; y además sin que parte de señal interfiera de manera molesta con estos diferentes parámetros (afinidad y estabilidad particularmente).

Después de numerosos intentos, la solicitante ha conseguido obtener unos compuestos eficaces.

La invención se refiere así a un compuesto de fórmula general (I) siguiente:

Señal-Nexo-Péptido (I)

en la que:

- Señal representa una entidad de señalización;
- Nexo, presente o no, representa un enlace químico; y
- Péptido representa un péptido que comprende un péptido orientado a VCAM, siendo el péptido orientado a VCAM seleccionado de entre los péptidos de la fórmula siguiente y sus equivalentes funcionales:

X10–X11–X12–X13–X14–X15–X16–X17–X18 (2) (SEC ID nº 4) siendo:

- X10 seleccionado de entre cisteína o metionina,
- X11 seleccionado de entre metionina o cisteína,
- X12 seleccionado de entre lisina, arginina o alanina,
- X13 seleccionado de entre treonina o serina,
- X14 seleccionado de entre ácido aspártico o ácido glutámico,
- X15 seleccionado de entre treonina o serina,
- X16 seleccionado de entre arginina, alanina o lisina,
- X17 seleccionado de entre leucina, isoleucina o valina,
- X18 cisteína o metionina;

preferentemente el péptido CMKTDTRLC (SEC ID nº 5) (Cys-Met-Lys-Thr-Asp-Thr-Arg-Leu-Cys);

y las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

La expresión "péptido orientado a VCAM" se designa igualmente péptido de VCAM en la solicitud. Ventajosamente, péptido representa un péptido de VCAM.

De forma ventajosa, el péptido de VCAM según la invención comprende como máximo 20 aminoácidos, ventajosamente como máximo 15 aminoácidos, ventajosamente como máximo 10 aminoácidos.

La proteína KIAA0137 se describe particularmente en la solicitud de patente WO 03/038130 y la proteína HPIV-3 se describe particularmente en la patente US nº 6.110.457.

Se entiende por la expresión CMKTDTRLC (SEC ID nº 5) y sus equivalentes funcionales, el péptido CMKTDTRLC (SEC ID nº 5), cuya eficacia ha demostrado la solicitante, y los péptidos de fórmula X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18 (2) (SEC ID nº 4) derivados eficaces. El péptido CMKTDTRLC (SEC ID nº 5) estudiado es un péptido cíclico y se ejemplifica con detalle en la solicitud.

La sustitución puede ser conservativa o no. La sustitución es conservativa cuando se sustituye un aminoácido por un aminoácido que tiene propiedades similares (por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, acidez, basicidad, hidrofobicidad, presencia de un grupo aromático, etc.). Un aminoácido natural puede ser reemplazado por un aminoácido no natural, tal como un aminoácido en configuración D, aminoácido beta o gamma. El péptido de VCAM se modifica, por ejemplo, utilizando las metodologías apropiadas descritas en la técnica anterior, por ejemplo, en el documento US 2005100963 (columnas 20-21, párrafos [529] a [541] en el caso de péptidos orientados a los receptores KDR), con el fin de seleccionar los compuestos (I) eficaces.

Se entiende por péptido que comprende al menos un péptido orientado a VCAM un péptido que presente esta secuencia peptídica de reconocimiento de la diana biológica, eventualmente flanqueado en el extremo N y/o C terminal por un grupo químico que no interfiera con la eficacia en la formación de imágenes de esta secuencia.

Se entiende por el término señal o entidad de señalización una entidad química que permita obtener una señal en la formación de imágenes médicas, particularmente:

- un quelato que puede acoplarse con un metal paramagnético,

- una nanopartícula metálica, especialmente una nanopartícula superparamagnética de óxido de hierro,

- una nanopartícula lipídica, ventajosamente en forma de emulsión, siendo dicha nanopartícula portadora de al menos un quelato que puede acoplarse con un metal paramagnético (en este caso, el péptido está injertado en la nanopartícula lipídica en emulsión que porta por sí misma quelatos; el enlace del péptido con la nanopartícula lipídica se realiza, por ejemplo, mediante un enlace químico).

Según un modo de realización, la entidad de señalización comprende al menos un quelato Ch (en forma que compleja un metal M). Ventajosamente, el quelato está acoplado con el metal M. Ventajosamente, el metal M es un ion de metal paramagnético, o un radionucleido. El complejo formado por el quelato y el metal M es estable en las condiciones fisiológicas de manera que se evita una liberación indeseada del metal M en el organismo. Ventajosamente, el quelato o entidad de señalización comprende al menos un grupo funcional que permite ligar la entidad de señalización con el nexo o directamente con el péptido. La invención se refiere asimismo a los compuestos de fórmula (I) en los que el quelato no está complejado con el metal.

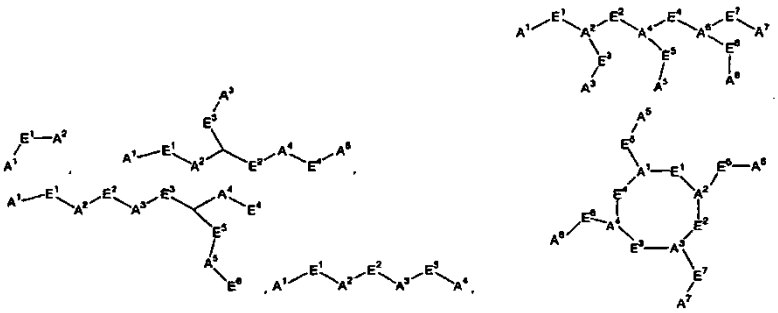
Ventajosamente, Ch es un quelato lineal seleccionado de entre: EDTA, DTPA= ácido dietilentriaminopentaacético, *N*-[2-[bis(carboximetil)amino]-3-(4-etoxifenil)propil]-*N*-i[2-[bis(carboximetil)amino]etil]-L-glicina (EOB-DTPA), derivados mono- o bisamida de DTPA, tales como *N,N*-bis[2-carboximetil[(metilcarbamoil)metil]amino]etil]glicina (DTPA-BMA), ácido 4-carboxi-5,8,11-tris(carboximetil)-1-fenil-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oico (BOPTA).

Ventajosamente, Ch es un quelato macrocíclico seleccionado de entre ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (DOSA), ácido 10-(2-hidroxipropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (HPDO3A), ácido 2-metil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (MCTA), ácido (α,α',α'',α''')-tetrametil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTMA), ácido 3,6,9,15-tetraazabiciclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trieno-3,6,9-triacético (PCTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-*N,N',N*-4,4-triacético (NOTA), AAZTA (descrito especialmente en el documento WO 2006/00273, fórmula III, página 120, y el documento US 2006/00118830, páginas 2 y 89), TETA, TETMA, PDTA y sus derivados benzoicos, LICAM, MECAM y HOPO (documento DE 102004062258).

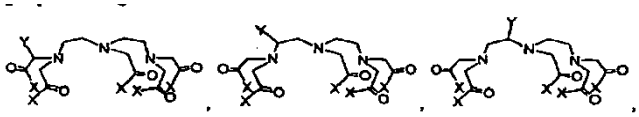
Ch puede ser igualmente un derivado de estos compuestos en los que uno o varios grupos carboxílicos están en forma de una sal, éster o amida correspondiente; o un compuesto correspondiente en el que uno o varios grupos carboxílicos están reemplazados por un grupo fosfónico y/o fosfínico.

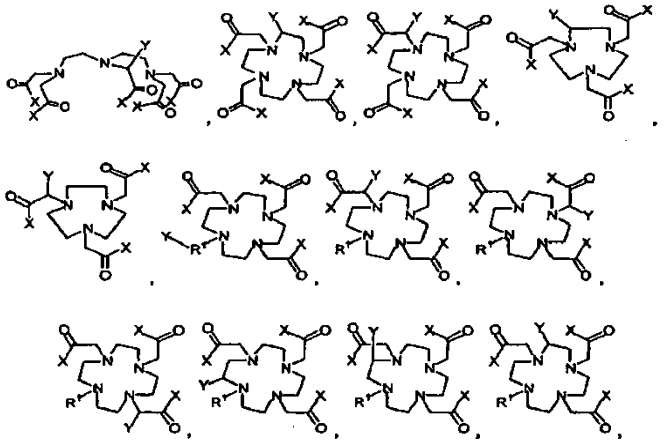
Se puede utilizar también un quelato seleccionado de entre: DOTA, gadofluorinas, DO3A, HPDO3A, TETA, TRITA, HETA, DOTA-NHS, M4DOTA, M4DO3A, PCTA y sus derivados, ventajosamente seleccionados de entre DOTA, DTPA, DO3A, HPDO3A, TRITA, TETA, BOPTA, NOTA, PCTA, DOTMA, AAZTA, HOPO y sus derivados.

Más ampliamente, el o los quelatos que forman la entidad de señalización podrán responder a la fórmula del documento WO 01/60416 siguiente:

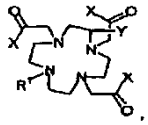


Se podrán utilizar particularmente los compuestos DTPA, DOTA, NOTA, DO3A y derivados. Se citarán también los quelatos recordados en el documento WO 03/011115, especialmente de las fórmulas siguientes:



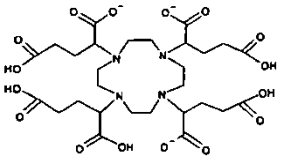


y

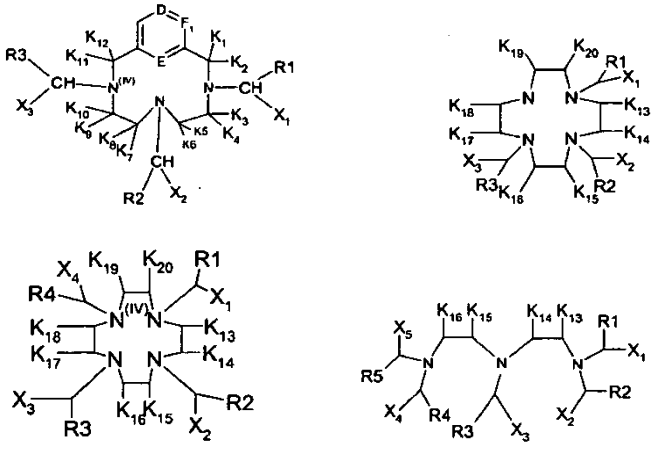


siendo X un grupo que puede coordinarse con un catión metálico, preferentemente O-, OH, NH_2, OPO_3-, NHR, siendo R una cadena alifática e Y un nexo químico.

Se podrán utilizar particularmente los quelatos designados P730 de la solicitante, descritos en el documento EP 661 279 (US nº 5.919.432) de fórmula:



y los quelatos de esqueleto PCTA descritos por la solicitante especialmente en el documento US nº 6.440.956, sean estos quelatos o sus intermedios portadores o no de cadenas hidrófilas, y particularmente de cadenas aminoalcohólicas cortas o largas.



siendo X_1 a X_4 y K_1 a K_{16} unos quelatos anteriores que representan H o una cadena C_1-C_{20}, y representando R1, R2, R3, R4 y R5 independientemente -COOH o $-P(O)(OH)_2$; y siendo seleccionados de modo que el quelato comprenda al menos una función que pueda acoplarse con un péptido de VCAM directamente o a través del nexo.

Se citarán también los quelatos del documento US 2006/0018830, páginas 9 a 11 de la parte descriptiva [0150] a [0158].

Ventajosamente, en el marco de la presente invención, Ch es DTPA o DOTA o sus derivados.

En el caso de la IRM, la relaxividad r_1 de estos quelatos es típicamente del orden de 4 a 20 $s^{-1}mmol^{-1}Gd^{-1}$ con un campo de 0,5 a 1,5 T. Se recuerda que la relaxividad longitudinal r_1 de un producto de contraste paramagnético da la medida de su eficacia magnética y permite apreciar su influencia sobre la señal registrada.

En la formación de imágenes médicas IRM, los productos de contraste modifican el tiempo de relajación de los protones, y el aumento de la relaxividad obtenido permite obtener una señal más elevada.

Se entiende por el término enlace químico en la fórmula I un grupo de enlace o nexo L, es decir, un grupo químico:

- que permite ligar la señal con el o los péptidos de VCAM
- que no tiene por sí mismo la función de entidad de señalización, que está asegurada por la señal
- que no tiene por sí mismo la función de orientación que está asegurada por el péptido de VCAM.

El acoplamiento de quelatos con biovectores, particularmente peptídicos, se describe en la técnica anterior, y hace intervenir generalmente un enlace químico (nexo) tal como se describe en el documento WO01/60416. La estructura y la naturaleza química del enlace químico se definen para permitir el acoplamiento químico entre la parte peptídica del péptido de VCAM y el o los quelatos utilizados, de manera que se obtenga una afinidad de la parte del péptido de VCAM por su diana y una especificidad de reconocimiento apropiada para la utilización.

Pueden utilizarse un gran número de nexos, en la medida en que puedan interaccionar con al menos un grupo funcional de biovector y al menos un grupo funcional dl quelato.

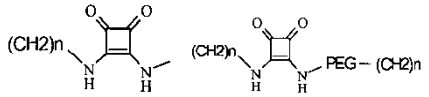
Ventajosamente, nexo representa:

a) un grupo de fórmula Q1-l-Q2,

en la que Q1 y Q2, idénticos o diferentes, representan O, S, NH, CO_2 -NHCO, CONH, NHCONH, NHCSNH, SO_2NH o $NHSO_2$-, y

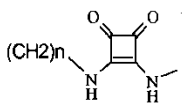
l representa un grupo alquilo (ventajosamente C_1-C_{10}), alcoxialquilo (ventajosamente C_1-C_{10}), alquenilo (ventajosamente C_2-C_6), alquinilo (ventajosamente C_2-C_6), polialcoxialquileno, alquilo interrumpido por uno o varios escuaratos, por uno o varios arilos, ventajosamente fenilo, o por uno o varios grupos seleccionados de entre -NH-, -O-, -CO-, -NH(CO)-, -(CO)NH-, -O(CO)-, o -(OC)O-;

b) un grupo $(CH_2)_n$, $(CH_2)_n$-CO-, -$(CH_2)_n$NH-CO-, siendo n = 1 a 10, $(CH_2CH_2O)_q(CH_2)_r$-CO-, $(CH_2CH_2O)_q(CH_2)_r$-NH-CO-, siendo q = 1-10 y r = 1-10, $(CH_2)_n$-CONH-, $(CH_2)_n$-CONH-PEG, $(CH_2)_n$-NH-,

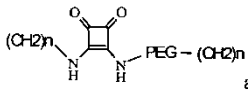


$(CH_2)_n$-escuarato-$(CH_2CH_2O)_q(CH_2)_r$-CO, siendo n = 1 a 5 y ventajosamente n = 3, 4, 5; HOOC-CH_2-O-(CH_2)-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-COOH, HOOC-$(CH_2)_2$-CO_2-$(CH_2)_2$-OCO-$(CH_2)_2$-COOH, HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOH, HOOC-$(CH_2)_n$-COOH, NH_2-$(CH_2)_n$-NH_2, siendo n = 1-20; NH_2-$(CH_2)_n$-CO_2H, NH_2-CH_2-$(CH_2$-O-$CH_2)_n$-CO_2H, siendo n = 1 a 10.

Especialmente:



siendo n = 1 a 4 y m = 0 a 5



siendo n = 1 a 4 y m = 0 a 5

$(CH2)_n$-CO, siendo n = 1 a 5

$(CH_2)_3$-escuarato-$(CH_2CH_2O)_2(CH_2)$-CO

c) los nexos descritos en la patente US nº 6.264.914, que pueden reaccionar con los grupos funcionales (del

biovector y del quelato) amino, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo, carbonilo, carbohidratos, tioéteres, 2-aminoalcoholes, 2-aminotioles, guanidinilo, imidazolilo, fenol; según las definiciones de este documento;

d) ciertos nexos descritos en la patente US nº 6.537.520 de fórmula $-(Cr_6r_7)_g-(W)_h-(Cr_{6a}r_{7a})_{g'}-(Z)_k-(W)_{h'}-(Cr_8r_9)_g-(W)_{h''}-(Cr_{8a}r_{9a})_{g'''}$, siendo: g+h+g'+k+h'+g"+h"+g"' diferente de 0; y siendo las definiciones idénticas a las de este documento en la columna 8;

e) ciertos nexos descritos en el documento WO 02/085908 (siendo las definiciones idénticas a las de este documento), por ejemplo, una cadena lineal o ramificada de enlace orgánico elegida de entre:

- CR6"'R7"'-, - (R6"')C=C(R7"')=, -CC-, -C(O)-, -O-, -S-, $-SO_2-$, - N(R3"')-, -(R6"')C=N-, -C(S)-, -P(O0(OR3"')-, -P(O)-(OR3"')O-, siendo R"'3 un grupo que puede reaccionar con un nitrógeno u oxígeno,
- una región cíclica (cicloalquilos divalantes, heterociclos divalentes),
- polialquilenos, polialquilenglicoles;

f) los nexos del documento WO03/011115, páginas 124-125;

g) los nexos del documento US 2006/0018830 (el nexo de la solicitante corresponde al nexo designado N-O-P en este documento US 2006/0018830):

- nexos que comprenden al menos un aminoácido no alfa (páginas 12 a 15, tabla 1 de este documento),
- nexos que comprenden al menos un aminoácido no alfa portador de un grupo cíclico (páginas 18 a 25, tabla 3 de este documento),
- nexos que no comprenden aminoácidos,
- otros nexos (páginas 27 y 28 de este documento).

La elección del nexo (estructura y tamaño) podrá realizarse especialmente de manera que se controle especialmente la carga, la lipofilia, la hidrofilia del producto de fórmula (I), para optimizar la orientación biológica y la biodistribución. Se podrán utilizar particularmente nexos biodegradables *in vivo*, nexos de PEG o mini-PEG.

La elección del nexo se efectúa de manera que no se altere de manera molesta la eficacia del compuesto de fórmula (I) según la invención, presentándose en la descripción detallada una prueba que permite verificar esta eficacia *in vitro* e *in vivo*.

Según otro modo de realización, señal representa un marcador para la formación de imágenes ópticas (molécula fluorescente utilizada en la formación de imágenes ópticas). Entre los marcadores para la formación de imágenes ópticas, se citarán especialmente los del documento US2006/0018830 y especialmente los citados en las páginas 11 y 12, párrafo 1.B, con unas modalidades precisas de formación de imágenes descritas en la columna 33 ([0259]) del párrafo 6 (técnicas y cromóforos y fluoróforos descritos con detalle).

Según otro modo de realización, señal representa los puntos cuánticos (fluoróforos inorgánicos que comprenden nanocristales).

Según otro modo de realización, señal representa una nanopartícula superparamagnética revestida de una capa orgánica, comúnmente designada SPIO o USPIO ("ultra small particles of iron oxide"). Ventajosamente, la nanopartícula comprende un núcleo de óxido o de hidróxido de hierro, especialmente de magnetita (Fe_3O_4) o magemita (γ-Fe_2O_3). Se utilizará ventajosamente una nanopartícula recubierta con un recubrimiento bisfosfonato, ventajosamente gem-bisfosfonato, descrita en el documento WO2004058275, estando la partícula y el procedimiento de acoplamiento entre el péptido y la nanopartícula detallados en los ejemplos de la presente solicitud. Las nanopartículas magnéticas utilizadas son nanopartículas ácidas basadas en un compuesto de hierro y recubiertas con una capa que comprende uno o varios compuestos de gem-bisfosfonato idénticos o diferentes, teniendo la capa de recubrimiento de la nanopartícula la fórmula (C) siguiente:

$$T\text{-}L2\text{-}CH(PO_3H_2)_2 \qquad (C)$$

en la que:

- el nexo L2 representa un agrupamiento orgánico que liga la función T con la función gem-bisfosfonato-$CH(PO_3H_2)_2$;
- T representa una función química acoplada con el péptido de VCAM o con el nexo de la presente solicitud. En un

modo de realización particular, T-L2 representa el nexo del compuesto de fórmula (I).

La composición se presenta en forma de una solución acuosa estable de nanopartículas. En estas composiciones, la tasa de complejación del compuesto (C) por partículas es superior al 50%, ventajosamente del 70%, y preferentemente superior al 80, 90 y 95%. Se prefiere particularmente que las partículas magnéticas ácidas (p) estén complejadas por al menos un 90% de sus sitios protonados con compuestos de fórmula (C). Según una variante, una parte de las funciones T de la capa está acoplada con un péptido de VCAM, y una parte de las funciones T está acoplada con un compuesto hidrófilo, especialmente un compuesto portador de grupos hidroxilo, y especialmente un compuesto aminoalcohólico hidrófilo designado AAG1AA28, descrito en el documento WO2004058275 (ejemplo 8) o un grupo PEG.

Las partículas magnéticas (p) poseen un diámetro hidrodinámico comprendido entre 5 y 300 nm, preferentemente entre 5 y 60 nm, aún más preferentemente entre 5 y 30 nm.

El nexo L2 permite ligar y/o espaciar la función gem-bisfosfonato y la entidad reactiva T que puede asegurar el injerto covalente del péptido de VCAM (el biovector) con la nanopartícula a través del nexo o no.

De modo preferido, el nexo L2 representa un agrupamiento divalente.

Preferentemente, el nexo L2 se selecciona de entre:

- un grupo alifático, alicíclico, aliciclico y alifático, aromático, aromático y alifático, pudiendo dichos grupos alifáticos, alicíclicos y aromáticos estar eventualmente sustituidos con un grupo metilo, hidroxilo, metoxilo, acetoxilo, amido o un átomo de halógeno, ventajosamente un átomo de cloro, yodo o bromo;

- un agrupamiento $-l_1-NHCO-l_2$ en el que l_1 y l_2, idénticos o diferentes, representan un grupo alifático, alicíclico, aromático, alicíclico aromático o aromático alifático, pudiendo dichos grupos estar eventualmente sustituidos con un grupo metilo, hidroxilo, metoxilo, acetoxilo, amido o un átomo de cloro, yodo o bromo.

Según unas formas de realización preferidas, L2 representa un grupo alifático sustituido o no, y más preferentemente un grupo $-(CH_2)p-$, en que p es un número entero de 1 a 5, o preferentemente un grupo $-(CH_2)_n-NHCO-(CH_2)_m-$ en el que n y m representan un número entero de 0 a 5.

A modo de grupos T preferidos, se pueden citar especialmente los grupos COOH, $-NH_2$, -NCS, $-NH-NH_2$, -CHO, alquilpolicarbonilo (-CO-O-CO-alq), acilazidilo ($-CO-N_3$), iminocarbonato ($-O-C(NH)-NH_2$), vinilsulfurilo ($-S-CH=CH_2$), piridildisulfurilo, (-S-S-Py), haloacetilo, maleimidilo, diclorotriazinilo y halógeno, siendo particularmente preferidos los grupos -COOH y $-NH_2$.

Preferentemente, T representa un grupo -COOH o $-NH_2$ y L2 un grupo alifático sustituido o no, ventajosamente un grupo $-(CH_2)p-$, en que p es un número entero de 1 a 5.

Se prefiere muy particularmente la capa de fórmula (C1) siguiente

$$HOOC-(CH_2)_2-CH(PO_3H_2)_2$$

Se describen varios compuestos de tipo nanopartículas de óxido de hierro portadoras del péptido de VCAM en la descripción detallada (especialmente PEG-USPIO).

Según otro modo de realización, señal representa una nanopartícula lipídica que comprende al menos un quelato. Las nanopartículas lipídicas pueden encontrarse en forma de emulsión nanoparticulada, que contiene o no perfluorocarbonos, tales como las descritas en los documentos WO 03/062198, US nº 5.958.371, US nº 5.080.885, US nº 6.403.056.

Las nanopartículas lipídicas pueden ponerse en suspensión en un medio acuoso o hidrófilo. Estas nanopartículas tienen un diámetro del orden de 10 nm a 500 nm, especialmente de 20 a 250 nm. Las nanopartículas de emulsión pueden comprender o estar acopladas con un gran número de quelatos, por ejemplo, de 10.000 a 100.000 quelatos por nanopartícula. Las emulsiones comprenden suficientes compuestos de fórmula (I), y por tanto de péptido, para permitir el reconocimiento de la zona de apoptosis. Se citarán como posibles nanopartículas liposomas unilamelares o multilamelares, micelas, microgeles, gotitas de aceites, lipoproteínas tales como HDL, LDL, IDL o VLDL, quilomicrones, nanopartículas de fluorocarbono, nanoburbujas o análogos cuya superficie sea lipófila.

Ventajosamente, el quelato es lipófilo y está unido a la membrana de la nanopartícula.

De forma ventajosa, el nexo del compuesto de fórmula (I) es suficientemente lipófilo para acoplar el péptido con la membrana de la nanopartícula lipídica, expresándose suficientemente el péptido de VCAM en la parte externa de la nanopartícula para el reconocimiento específico de la diana apoptótica. El nexo es, por ejemplo, un grupo lipófilo tal

como una cadena alquileno C_{10}-C_{20}, insertándose esta cadena en la capa lipídica de la nanopartícula y permitiendo así unir el péptido a la nanopartícula.

Se describen con detalle numerosos quelatos lipofilizados para asociarse con una membrana lipídica, especialmente en los documentos US nº 6.045.821, WO 90/04943 y WO 2006/100305. Según unas formas de realización, el quelato porta una cadena larga lipófila (fosfolipídica, por ejemplo) que va a insertarse en la membrana de la nanopartícula lipídica (liposoma, micela, nanoemulsión). Igualmente, el péptido de VCAM porta ventajosamente una cadena lipófila (el nexo, por ejemplo, una cadena alquilo C_{10} a C_{20}) que va a insertarse en la membrana de la nanopartícula lipídica.

Según unas formas de realización ventajosas, la nanopartícula lipídica incluye perfluorocarbonos tales como los descritos en el documento US nº 5.958.371, conteniendo la emulsión líquida unas nanopartículas que comprenden un perfluorocarbono de punto de ebullición bastante elevado (por ejemplo, entre 50 y 90ºC) rodeadas por un recubrimiento compuesto por un lípido y/o un tensioactivo. El tensioactivo puede acoplarse directamente con un biovector de orientación o incluir un compuesto intermedio ligado de manera covalente con el biovector, llegado el caso con la ayuda de un agente de enlace químico.

Se recuerdan diferentes emulsiones de perfluorocarbonos en el documento US nº 6.676.963 (perfluorodecalina, perfluorooctano, perfluorodiclorooctano, bromuro de perfluoro-n-octilo, perfluoroheptano, perfluorodecano, perfluorociclohexano, perfluoromorfolina, perfluorotripropilamina, perfluorotributilamina, perfluorodimetilciclohexano, perfluorotrimetilciclohexano, perfluorodiciclohexiléter y perfluoro-n-butiltetrahidrofurano).

Se utilizan habitualmente como fosfolípidos que forman la membrana de nanopartículas los compuestos siguientes: fosfatidilcolina, dioleilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina.

Dichas composiciones se describen, por ejemplo, en los documentos US nº 5.989.520 y US nº 5.958.371, como se recuerda en el documento US 20040248856, que cita especialmente los compuestos perfluorocarbonados: perfluorodecalina, perfluooroctano, perfluorodiclorooctano, bromuro de perfluoro-n-octilo, perfluoroheptano y análogos.

Según unas formas de realización ventajosas, se utilizarán para preparar los agentes de contraste según la invención unos procedimientos y unas composiciones lipídicas apropiadas recordadas en el documento US nº 6.010.682, especialmente en lo que se refiere a la descripción detallada de la composición lipídica y la preparación de liposomas, micelas y emulsiones.

Se recuerda que las emulsiones son mezclas lipídicas heterogéneas obtenidas de manera apropiada mediante agitación mecánica y/o adición de agentes emulsionantes. Por ejemplo, se mezclan mecánicamente los quelatos lipofilizados con disolventes orgánicos tales como cloroformo. Después de evaporar el disolvente, se vuelven a poner en suspensión los lípidos en medio acuoso tal como PBS para obtener una emulsión, que experimenta típicamente a continuación una sonicación y una microfluidificación. Las emulsiones obtenidas pueden liofilizarse llegado el caso con la utilización de agentes antiaglutinación.

Para formular la emulsión de agente de contraste paramagnético deseado, se utilizan típicamente de 1 a 75% en peso de compuesto quelato lipófilo con respecto a los ingredientes totales de la emulsión. La composición que forma el agente de contraste se administra preferentemente por vía intravascular, según el paciente examinado, por ejemplo a razón de 0,1 mg a 1 g de compuesto quelato lipófilo y de 1 a 50 µmol de ion de metal paramagnético por kg de paciente.

Las composiciones lipídicas obtenidas se formulan llegado el caso con la ayuda de aditivos recordados en el documento US nº 6.010.682, especialmente para una administración por inyección intravenosa. Se citarán especialmente dextrosa, cloruro de sodio y antimicrobianos.

Ventajosamente, gracias a las composiciones según la invención, se puede obtener un aumento de la relaxividad por ion. Se obtienen típicamente las características siguientes, que pueden variar según las composiciones precisas de las emulsiones y sus procedimientos de preparación:

- índice de polidispersidad: 0,2 a 0,3,
- $[Gd^{3+}]$ = 2 a 10 mM, preferentemente 3 a 7 mM,
- concentración de partículas: 50 a 100 nM,
- r1 ($mM^{-1}s^{-1}Gd^{-1}$): 5 a 40, preferentemente 10 a 40,
- r2 ($mM^{-1}s^{-1}Gd^{-1}$): 20 a 40,
- r1 ($mM^{-1}s^{-1}$partícula^{-1}): 10^6 a $4x10^6$
- número de biovectores: 50 a 1000, especialmente 100 a 300.

La invención se refiere también a estos compuestos de fórmula (I) en la que el péptido contiene una secuencia

peptídica modificada, pero sin alterar la afinidad y la especificidad por la diana y la eficacia del compuesto *in vivo*. El péptido de VCAM se modifica, por ejemplo, utilizando las metodologías apropiadas descritas en la técnica anterior, por ejemplo, en el documento US 2005100963 (columnas 20-21, párrafos [529] a [541] en el caso de péptidos orientados a receptores KDR), con el fin de seleccionar los compuestos de fórmula (I) eficaces:

1) Sustitución de aminoácidos sin alterar su función, según el procedimiento recordado en este documento para aminoácidos hidrófobos, aromáticos y ácidos que contienen hidroxilos y que contienen cadenas laterales amida.

   Para la lisina, se utilizarán también otros aminoácidos dibásicos (arginina, histidina, ornitina) o derivados de lisina o de estos otros aminoácidos, especialmente derivados alquilo, alquenilo y arilo; tales como los derivados de *N*-épsilon-isopropil-lisina. Se podrán ensayar en particular los derivados citados en el párrafo [533] del documento US 2005100963.

2) Sustitución de enlaces amidas presentes en el esqueleto del polipéptido, especialmente para limitar la degradación del péptido y/o ajustar la flexibilidad del péptido (por ejemplo, inserción de α-N-metilamida o de una tiamida, o reemplazo de un aminoácido por un aza aminoácido).

3) Introducción de aminoácidos de la serie D, tales como D-alanina, con el fin de cambiar la accesibilidad del péptido a su diana mediante un efecto de modificación estérica sobre la orientación de las cadenas laterales.

4) Modificaciones químicas para ajustar la solubilidad y la farmacocinética del compuesto de fórmula (I), por ejemplo añadiendo un grupo hidrófilo o básico, o un grupo alquilo o aromático no polar, con la ayuda de un enlace en la parte C o N-terminal del péptido, o a nivel de una cadena lateral de aminoácidos del péptido, especialmente a nivel de la lisina que presenta una función amina libre (o de un derivado tal como un ácido 2,3-diaminopropiónico).

5) Glucosilación

6) Otras modificaciones:

   - formación de sales: *N*-metilglucamina (meglumina), acetato, oxalatos, ascorbatos, etc.;
   - manipulación de la secuencia peptídica (por ejemplo, retropéptidos o ciclación).

Los pruebas biológicas descritas con detalle en la solicitud permiten seleccionar los péptidos eficaces equivalentes o mejorados en términos de actividad de orientación a VCAM en comparación con los péptidos ejemplificados con detalle en la presente solicitud.

La invención se refiere, según otro aspecto, a los productos de contraste para IRM que comprenden un compuesto de fórmula (I) tal como se ha descrito anteriormente, cuyo ion de metal paramagnético M es de número atómico 21-29, 42-44 o 58, 70, preferentemente gadolinio. Los metales paramagnéticos M incluyen los lantánidos de número atómico 58-70 y los metales de transición de número atómico 21-29, 42 o 44, por ejemplo, escandio, titanio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, molibdeno, rutenio, cerio, praseodimio, neodimio, promecio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio e iterbio. Se prefieren particularmente los elementos Gd(III), Mn(II), europio y disprosio, ventajosamente M se selecciona de entre Gd, Mn, Fe, Dy y Tm.

Ventajosamente, se utilizarán los compuestos señal-nexo-péptido para una formación de imágenes por CEST (transferencia de saturación) integrándolos en compuestos de tipo partículas lipídicas tales como liposomas (como se describen con detalle en el documento WO 2006/032705). Se recuerda que la formación de imágenes por CEST con o sin partículas lipídicas y con o sin biovector puede efectuarse con quelatos de valor q = 1 o de valor q = 2.

La invención se refiere, según otro aspecto, a los productos de contraste para la formación de imágenes por rayos X o CT, que comprenden un compuesto (I) tal como se ha descrito anteriormente, cuyo ion de metal pesado M es de número atómico 21-31, 39-50, 56-80, 82, 83 o 90.

La invención se refiere, según otro aspecto, a unos productos radiofarmacéuticos que comprenden un compuesto de fórmula (I) tal como se ha descrito anteriormente, cuyo quelato está acoplado con un radionucleido o un radiohalógeno conocido por el especialista en la materia, típicamente gadolinio, tecnecio, cromo, galio, indio, iterbio, renio, lantano, itrio, disprosio, cobre o análogos. Los radionucleidos incluyen las formas radiactivas de los elementos Sm, Ho, Y, Pm, Gd, La, Lu, Yb, Sc, Pr, Tc, Re, Ru, Rh, Pd, Pt, Cu, Au, Ga In, Sn, Cr, Pb, especialmente ^{99}Tc, ^{117}Sn, ^{111}In, ^{97}Ru, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{89}Zr, ^{177}Lu, ^{47}Sc, ^{105}Rh; ^{188}Re, ^{60}Cu, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{159}Gd, ^{149}Pr, ^{166}Ho; ventajosamente ^{68}Ga. La preparación de compuestos utilizables como radiofármacos, especialmente utilizando el tecnecio ^{99}Tc, se recuerda en el documento US 2006/0018830, página 32, párrafo 4, estando descritas estas técnicas en este documento para compuestos que comprenden un quelato acoplado con un péptido de orientación a gastrina.

Para indicaciones en radioterapia, el acoplamiento de macrociclos de tipo DOTA, la selección de nucleidos apropiados y la preparación de compuestos radioterapéuticos se recuerda en el documento US 2006/0018830,

columnas 35 y 36 (incorporado como referencia).

La invención se refiere, según otro aspecto, a un procedimiento de diagnóstico y a un procedimiento de tratamiento radiofarmacéutico que utilizan un compuesto de fórmula (I) tal como se ha descrito anteriormente.

La presente invención se refiere además a una composición que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) tal como se ha descrito anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable, ventajosamente destinado a la administración por vía parenteral. Se refiere además a un procedimiento de preparación de dicha composición que comprende la adición de un compuesto de fórmula general (I) tal como se ha definido anteriormente a un medio inyectable que comprende el excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere a la utilización de una composición según la presente invención para el diagnóstico de una patología asociada a VCAM. Las composiciones de diagnóstico y radiofarmacéuticas según la invención pueden utilizarse como se describe en las solicitudes US 2002/0090342, US 2002/0098149 y WO 02/055111 para indicaciones anticancerosas. La invención se refiere además a los compuestos de fórmula general (I) tal como se han definido anteriormente para su utilización como agente de diagnóstico de enfermedades asociadas a VCAM, ventajosamente seleccionadas de entre enfermedades cardiovasculares, riesgos de accidente isquémico, colitis ulcerosa crónica, enfermedad de Crohn y/o cáncer, de forma ventajosa de entre enfermedades cardiovasculares y riesgos de accidente isquémico.

De forma ventajosa, la enfermedad cardiovascular se selecciona de entre: una enfermedad asociada con placas de ateroma, ventajosamente placas vulnerables y/o una enfermedad coronaria.

Ventajosamente, el riesgo de accidente isquémico se selecciona de entre: infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, embolia renal, isquemia aguda de un miembro y ruptura de aneurisma aórtico.

La invención se refiere también a la utilización de los compuestos descritos anteriormente para la preparación de una composición de diagnóstico o radiofarmacéutica destinada al diagnóstico y/o al tratamiento de enfermedades asociadas a la expresión de VCAM, de forma ventajosa seleccionadas de entre enfermedades cardiovasculares y/o riesgos de accidente isquémico.

Llegado el caso, los compuestos de fórmula (I) y los péptidos de VCAM de la solicitante se utilizarán como agente de diagnóstico, o como agente de tratamiento terapéutico a nivel de las zonas de expresión de VCAM, o como agente de diagnóstico y de tratamiento terapéutico, o de seguimiento diagnóstico de la eficacia terapéutica. Llegado el caso, el compuesto se coadministrará simultáneamente o de manera diferida con otros agentes de diagnóstico y/o terapéuticos orientados a las zonas de expresión de VCAM. La invención se refiere también a un procedimiento que comprende la síntesis de un compuesto que comprende un metal paramagnético según la invención que puede orientarse a una zona patológica, a su administración a un paciente y la formación de imágenes por IRM. La invención se refiere también a un procedimiento de diagnóstico que comprende la síntesis de un compuesto radiofarmacéutico según la invención que puede orientarse a una zona patológica, a su administración a un paciente, la formación de imágenes por gammagrafía SPECT o plana, o tomografía por emisión de positrones.

Para un radiodiagnóstico con IRM, la administración intravenosa por inyección habitualmente en solución salina se realiza típicamente a una dosis de ion metálico de 0,001 a 1,5 mmol/kg de peso corporal, por ejemplo, de 1 a 500 µmol de Gd/kg.

Para un diagnóstico radiofarmacéutico, la administración intravenosa por inyección habitualmente en solución salina se realiza típicamente a una dosis de 1 a 100 mCi por 70 kg de peso corporal, preferentemente de 5 a 50 mCi, con una formación de imágenes de diagnóstico de, por ejemplo, 30 a 180 minutos después de la inyección para ^{99}Tc.

Para la utilización como agentes de contraste de rayos X, la concentración de átomo pesado es típicamente de 0,1 M a 5 M, con concentraciones para administración intravenosa del orden de 0,5 a 1,5 mmol/kg.

La invención se refiere, según otro aspecto, a la utilización de un compuesto (I) tal como se ha descrito anteriormente para la preparación de una composición destinada a la formación de imágenes ópticas.

Se describen unos ejemplos de administración de composiciones para la formación de imágenes médicas en la técnica anterior, por ejemplo, en los documentos WO 0226776 y US 2006/0018830, columna 36 ([0282]), párrafo 8 (dosificaciones y aditivos).

Los vehículos farmacéutica y fisiológicamente aceptables que permiten formar unas composiciones de diagnóstico (productos de contraste) que comprenden los compuestos descritos anteriormente son conocidos en la técnica anterior. Se utilizarán, por ejemplo, sales (de sodio, calcio o meglumina) y agentes de control del pH (ácido acético, cítrico o fumárico) y antioxidantes.

La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de compuestos que comprende el acoplamiento

de un péptido de VCAM con al menos un quelato. Son aplicables varios procedimientos generales de preparación de compuestos de fórmula (I) descritos en el documento US2006/0018830 (Bracco) utilizando un péptido en lugar de los péptidos de estos documentos. Estos procedimientos elegidos especialmente en función del quelato elegido se recuerdan en el documento 2006/0018830, columna 37 ([0288] a ([0291]) ("Preparación general de compuestos" y "Preparación alternativa de compuestos mediante acoplamiento de segmentos"), por ejemplo, los procedimientos SPPS y FMOC (carbamato-9-fluorenilmetilo).

La invención se refiere también a un procedimiento de diagnóstico o tratamiento radiofarmacéutico que comprende la administración de un compuesto (I), la realización de un examen de la formación de imágenes con la ayuda de un equipamiento apropiado y el análisis de los resultados.

La invención cubre, salvo indicación contraria, todas las formas quirales, diastereoisoméricas, racémicas, especialmente cis-trans y L-D, de los compuestos descritos.

La solicitante ha estudiado también las posibilidades de asociación de un péptido de VCAM acoplado con varios quelatos en el compuesto de fórmula (I). La solicitante ha estudiado por otro lado compuestos de fórmula (I) que presentan un ensamblaje entre uno o varios péptidos del compuesto de fórmula (I) orientados a VCAM y uno o varios quelatos; y de manera que el acceso a la diana no esté impedido a pesar de la presencia del o de los quelatos. Por ejemplo, el quelato está espaciado del o de los péptidos P por un nexo de un tamaño suficiente y con una estructura química tal que el reconocimiento del o de los péptidos por su diana no sea alterado.

Entres las asociaciones de biovectores (péptidos o eventualmente otros biovectores) y quelatos, se pueden citar especialmente:

- un péptido biovector central ligado con varios quelatos idénticos o diferentes,

- un quelato central ligado con varios péptidos idénticos o diferentes,

- un primer conjunto [péptido portador de quelato(s)] acoplado a través de un nexo hidrófobo o hidrófilo con un segundo conjunto [péptido portador de quelato(s)], que se escribe, por ejemplo: Ch1-péptido1-nexo-péptido2-Ch2, representando Ch quelatos idénticos o diferentes y representando péptido1 y péptido2 unos péptidos idénticos o diferentes,

- un conjunto de péptido1-(nexo portador de Ch)-péptido2-Ch

Se utilizará, por ejemplo, el procedimiento de construcción de compuestos multiméricos descrito en el documento US 2005/0100963 (WO 2006/031885, página 66, línea 25 a página 69, línea 30) en el caso de péptidos orientados a receptores KDR (por ejemplo, con la ayuda del procedimiento 13 de los ejemplos: "Preparación de homodímeros y heterodímeros"), pero utilizando el péptido de VCAM (se reemplazarán, por ejemplo, los péptidos de los compuestos de las figuras 44 a 47 del documento US 2005100963 por los péptidos de VCAM). El compuesto puede comprender así ventajosamente un péptido acoplado con varios quelatos, o un quelato acoplado con varios péptidos idénticos o diferentes. La invención se refiere también a compuestos mixtos que comprenden, además del péptido de VCAM, al menos otro biovector orientado a VCAM, siendo el biovector otro péptido o bien otro biovector, pero no peptídico.

Se podrá acoplar, llegado el caso, la parte de péptido o la parte de quelato con agrupamientos químicos que permitan favorecer la biodistribución o la vida media del producto en la sangre.

La especificidad del producto hace referencia a su afinidad específica por al menos un marcador de VCAM o de cualquier trastorno patológico asociado, estando la especificidad de enlace expresada típicamente por las constantes Kd y Ka, siendo el valor de Kd para los marcadores diana inferior a 10 µM, preferentemente inferior a 1 µM.

Entre las sales farmacéuticamente aceptables, se citarán especialmente las sales de cationes de bases inorgánicas (potasio, sodio, calcio, magnesio, etc.), cationes de bases orgánicas (etanolamina, dietanolamina, morfolina, glucamina, *N*- metilglucamina, *N,N*-dimetilglucamina, etc.), aniones de ácidos inorgánicos (especialmente cloruros, bromuros, yoduros, sulfatos, etc.), aniones de ácidos orgánicos (acetato, succinato, citrato, fumarato, maleato, oxalato, trifluoroacetato, etc.), iones de aminoácidos (taurina, glicina, lisina, arginina, ornitina, ácido aspártico, ácido glutámico, etc.).

La invención se refiere también a la utilización de un péptido de VCAM para un diagnóstico *in vitro* (dosificación de VCAM-1 soluble en plasma sanguíneo) y para la terapia antiinflamatoria (una multimerización del péptido puede aumentar su eficacia por el efecto de la polivalencia).

Definiciones:

Se retoman aquí las definiciones de patologías cuyo diagnóstico es objeto de la presente invención expuestas en el

documento WO 200603788.

Se designa por "péptido orientado a VCAM" o "péptido de VCAM" una molécula que puede ligarse selectivamente con VCAM (más especialmente, VCAM-1).

Se incluyen en "enfermedad cardiovascular" especialmente los estados que señalan el desarrollo de una placa y las complicaciones que se derivan de la formación de una placa de ateroma (estenosis, isquemia) y/o de su evolución hacia un accidente isquémico agudo (trombosis, embolia, infarto, ruptura arterial). Enfermedades cardiovasculares designa, por ejemplo, aterosclerosis, placa de ateroma, en particular placa vulnerable, enfermedad coronaria, angina, trombosis, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, estenosis vascular e infarto.

La "enfermedad coronaria" es la manifestación más corriente de enfermedad cardiovascular. Se trata de una enfermedad progresiva debida a una mala irrigación del músculo cardiaco, consecuencia de una constricción (estenosis) o una calcificación (esclerosis) de una o de las arterias coronarias. El síntoma principal de la enfermedad coronaria se manifiesta en forma de dolores que constituyen una angina (estable o inestable), también llamada angina de pecho. La obstrucción completa de una o de las arterias coronarias conduce al infarto.

El "infarto" designa un foco limitado de necrosis debido a una obstrucción arterial. Más específicamente, el infarto de miocardio es una necrosis del miocardio que es generalmente el resultado de una trombosis coronaria aguda, consecuencia de una ruptura de placa (generalmente una placa inestable o placa vulnerable) que conlleva agregación plaquetaria y entonces oclusión coronaria.

La "trombosis" corresponde a la coagulación de la sangre en las cavidades vasculares (arterias, venas, capilares o cavidades cardiacas), que conduce a la formación de un trombo.

La "embolia" es la migración intravascular de un cuerpo extraño, constituido lo más a menudo por un coágulo sanguíneo (trombo), y su detención brusca en un vaso cuyo calibre sea insuficiente para dejarlo pasar. Las consecuencias locales de la embolia son alteraciones circulatorias ligadas a la obstrucción vascular, que conducen lo más a menudo a un infarto.

La "isquemia" designa la reducción del aporte de sangre arterial a una zona del organismo. Sus causas locales principales son trombosis y embolia. La expresión "placa vulnerable" designa una placa de ateroma que presenta una capa protectora fina (aproximadamente 65 a 150 µm de grosor) y un núcleo lipídico extenso. Estas placas inestables, que presentan tendencia a la ruptura, se encuentran a nivel de las arterias coronarias y a nivel de la aorta y sus ramificaciones. La ruptura de las placas coronarias vulnerables provoca "síndromes coronarios agudos": en el caso de trombosis oclusiva completa, se trata de infarto de miocardio, cuando la trombosis arterial queda incompleta, se trata de angina inestable. A nivel de la carótida, las placas vulnerables son más estenóticas y menos inflamatorias. Expresan igualmente VCAM-1. En la presente solicitud, se utiliza la tabla de correspondencia siguiente:

Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Aspartato	D	Asp
Cisteína	c	Cys
Glutamato	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	w	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	v	Val

Como se ilustra más adelante, la solicitante ha demostrado especialmente la eficacia de productos para IRM que comprenden un quelato ligado al péptido de VCAM, especialmente NNSKSHT.

Así, aun cuando un péptido fuera conocido en la técnica anterior, la identificación de su utilidad en un mecanismo de

orientación a VCAM, particularmente VCAM-1, entre el número extremadamente elevado de dianas biológicas posibles, está lejos de ser evidente. Además, no es para nada evidente que, identificada esta diana biológica, los compuestos acoplados (péptido de VCAM-entidad de señalización) permitan resolver los problemas técnicos resueltos por la solicitante, especialmente:

- la conservación de la afinidad *in vivo* por el sitio de reconocimiento biológico, a pesar del impedimento estérico y la posible modificación de la conformación *in vivo* del acoplamiento con una entidad de señalización,

- la posibilidad de acoplamiento químico con las entidades de señalización; el acoplamiento con los derivados de PCTA particularmente ha implicado la puesta a punto de una síntesis química dedicada,

- la estabilidad fisicoquímica *in vivo*, que constituye una limitación importante para numerosos péptidos,

- la capacidad de ser reconocido en la formación de imágenes *in vivo*, y esto particularmente en IRM, técnica cuyo nivel de sensibilidad es casi 1000 veces inferior a la formación de imágenes por PET.

Globalmente, no era por tanto en absoluto evidente para el especialista en la materia:

- por una parte, seleccionar los péptidos objeto de la presente invención,
- por otra parte, que los productos que integran estos péptidos fueran realmente eficaces *in vivo*.

En la descripción detallada siguiente, se describen unos péptidos de los que se ha mostrado la eficacia con variantes de realización de diferentes entidades de señalización (parte I) y los resultados biológicos (parte II).

La figura 1 ilustra el cálculo del valor de Kd^* (constante aparente de disociación) de VCAM-1.

La figura 2 representa la medida de la afinidad del péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) (constante de inhibición-50 o CI_{50} evaluada)

Las figuras 3 y 4 ilustran la potenciación en IRM de un producto de DOTA-NNSKSHT.

La figura 5 muestra imágenes por IRM de ratón ApoE/c obtenidas con un producto de DOTA-NNSKSHT.

Ejemplos Parte I: Preparación de compuestos que incluyen péptidos de VCAM

Generalidades

M:	concentración molar (mol/l).
M/z:	masa por carga determinada por espectrometría de masas.
ES^+:	electropulverización en modo positivo.
ES^-:	electropulverización en modo negativo.
kDa:	unidad de masa molecular (kilodalton)
CCM:	cromatografía en capa fina
Z medio:	diámetro hidrodinámico medido por PCS

Dosificación de hierro total:

Se dosifica el hierro mediante espectroscopia de absorción atómica (espectrofotómetro VARIAN AA10) después de mineralización con HCl concentrado y dilución con relación a una serie escalonada de iones férricos (0, 5, 10, 15 y 20 ppm).

Tamaño de las partículas:

Diámetro hidrodinámico de la partícula injertada (Z medio):

Determinado mediante PCS (aparato Malvern 4700, láser de 488 nm a 90°) en una muestra diluida a ~1 mM con agua PPI filtrada por 0,22 µm.

PCS = Photon Correlation Spectroscopy = técnica por difusión de luz dinámica - referencia: R. Pecora en J. of Nano. Res. (2000), 2, pág. 123-131.

Análisis estructurales:

Mediante espectroscopia de masas (aparato MICROMASS VG Quattro II) con una fuente de electropulverización.

Mediciones de relaxividad:

Se determinaron los tiempos de relajación T1 y T2 mediante procedimientos estándares en un aparato Minispec 120 (Bruker) a 20 Mhz (0,47T) y 37ºC. Se mide el tiempo de relajación longitudinal T1 utilizando una secuencia de inversión y recuperación, y se mide el tiempo de relajación transversal T2 mediante una técnica de CPMG.

Se calcularon las velocidades de relajación R1 (=1/T1) y R2 (=1/T2) para diferentes concentraciones de metal total (variable de $0,1x10^{-3}$ a $1x10^{-3}$ mol/l) en solución acuosa a 37ºC. La correlación entre R1 o R2 en función de la concentración es lineal, y la pendiente representa la relaxividad r1 (R1/C) o r2 (R2/C) expresadas en (1/s) x (1/mmol/l) o bien ($s^{-1}mM^{-1}$).

Se prepararon las nanopartículas según los procedimientos descritos en la patente WO2004/058275 (US 2004/253181), ejemplos 8 y 9 para la preparación de soluciones coloidales de partículas magnéticas, y ejemplos 10 a 12 para la complejación de partículas magnéticas mediante un recubrimiento de gem-bisfosfonato del ejemplo 1 del documento WO2004/058275.

Ejemplo 1: Acoplamiento de los péptidos con partícula de óxido de hierro (producto PEG - USPIO - PÉPTIDO DE VCAM)

Se presentan en la tabla siguiente las secuencias peptídicas de interés:

N°	Código	Péptido	Secuencia
1	COMPUESTO A (péptido CNNSKSHTC, nexo L de tipo escuarato)	8-Amino-3,6-dioxaoctanoilciclo-[Cys-Asn-Asn-Ser-Lys-Ser-His-Thr-Cys]-OH	CNNSKSHTC* (SEC ID nº 2)
2	COMPUESTO B (compuesto A con secuencia mezclada)	8-amino-3,6-dioxaoctanoil-His-Ser-ciclo-[Cys-Asn-Lys-Asn-Ser-Cys]-Thr-OH	HSCNKNSCT*
3	COMPUESTO C	8-amino-3,6-dioxaoctanoilciclo-[Cys-Met-Lys-Thr-Asp-Thr-Arg-Leu-Cys]-OH	CMKTDTRLC (SEC ID nº 5)

* a modo de ilustración

Acoplamiento del péptido nº 1 con una partícula de óxido de hierro (a modo de ilustración)

Protocolos:

N°	código	Péptido	Masa implicada
1	COMPUESTO A	8-Amino-3,6-dioxaoctanoilciclo-[Cys-Asn-Asn-Ser-Lys(tfa)-Ser-His-Thr-Cys]-OH	20 mg

Acoplamiento:

Se agitan 15 ml de nanopartículas ([Fe]=0,338 M) a temperatura ambiente, con el pH igual a 7,2. Se añade una solución del péptido protegido (N°1, -Lys(tfa)-, 20mg) en 1 ml de agua por porción de 100 µl con 2,25 mg de EDCI cada 15 minutos. Al final de la adición, se mantiene la solución con agitación durante 1 noche. Se ajusta el pH a 7 con una solución de NaOH 0,1 M.

Se filtra a continuación la solución por 0,22 µm (filtro Durapore Millipore®), se ultrafiltra por una membrana de 30 kDa y entonces se concentra hasta un volumen final de 15 ml.

Acoplamiento del PEG:

Se añaden 2,5 ml de una solución de 1,060 g de aminoPEG (O-(2-aminoetil)-O'-metilpolietilenglicol 750, Aldrich, RN [80506-64-5]) en 5 ml de agua a 15 ml de la solución anterior. Se ajusta el pH de la solución a 8 con HCl 1 M, se añaden entonces 0,325 g de EDCI y se agita la mezcla durante 3 h. Se repite otra vez la adición de la solución de aminoPEG (2,5 ml) y de EDCI (0,325 g) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante una noche. Se lleva el pH a 7,5 con HCl 1 M. Se filtra la solución por 0,22 µm y se ultrafiltra por membrana de 30 kDa. El volumen final de la solución es de 15 ml.

Desprotección:

Se ajusta la solución a pH 10,1 con NaOH 1 M y se agita a temperatura ambiente durante 6 h. Se lleva a continuación el pH a 7,5 mediante HCl 1 M, se filtra la solución por 0,22 µm y se ultrafiltra por membrana de umbral

de corte de 12 kDa.

Caracterización: PCS: Z medio = 26 nm

Concentración de hierro: 137,61 mM
r_1 (20 MHz, 37ºC): 30,54 $s^{-1}mM^{-1}$
r_2 (20 MHz, 37ºC): 76 $s^{-1}mM^{-1}$
r_1 (60 MHz, 37ºC): 14,94 $s^{-1}mM^{-1}$
r_2 (60 MHz, 37ºC): 85,06 $s^{-1}mM^{-1}$

Muestras	Diámetro magnético	Imantación a saturación (magn.)	Diámetro de relaj.	Imantación a saturación (relaj.)
PEG750-COMPUESTO A	9,94 nm	63,1 Am^2/Kg	11,2 nm	48,9 Am^2/Kg

Se siguió el mismo protocolo para la obtención de otros productos.

Acoplamiento de péptido nº 2 con una partícula de óxido de hierro (a modo de ilustración)

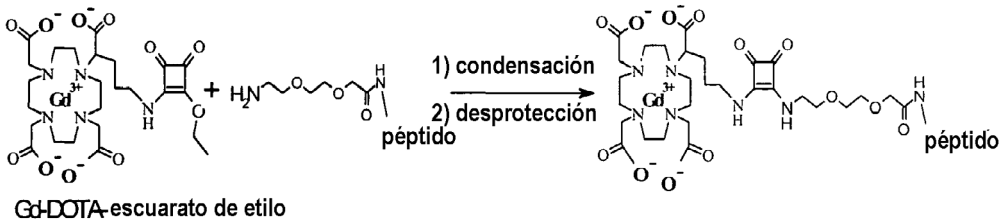
N°	Código	Péptido	Masa implicada
2	COMPUESTO B	8-amino-3,6-dioxaoctanoil-His-Ser-ciclo-[Cys-Ans-Lys(tfa)-Asn-Ser-Cys]-Thr-OH	20 mg

Caracterización:

PCS: Z medio = 29 nm
Concentración de hierro: 118,60 mM
r_1 (20 MHz, 37ºC): 31,34 s^{-1} mM^{-1}
r_2 (20 MHz, 37ºC): 79,61 s^{-1} mM^{-1}
r_1 (60 MHz, 37ºC): 14,30 s^{-1} mM^{-1}
r_2 (60 MHz, 37ºC): 78,05 s^{-1} mM^{-1}

Ejemplo 2: Acoplamiento de péptidos con quelatos de gadolinio

Esquema general:



Gd-DOTA-escuarato de etilo

Secuencia de los péptidos acoplados:

N°	Código	Péptido	Secuencia
1	COMPUESTO A	8-Amino-3,6-dioxaoctanoilciclo-[Cys-Asn-Asn-Ser-Lys-Ser-His-Thr-Cys]-OH	CNNSKSHTC* (SEC ID nº 2)
2	COMPUESTO B	8-amino-3,6-dioxaoctanoil-His-Ser-ciclo-[Cys-Asn-Lys-Asn-Ser-Cys]-Thr-OH	HSCNKNSCT*
3	COMPUESTO C	8-amino-3,6-dioxaoctanoilciclo-[Cys-Met-Lys-Thr-Asp-Thr-Arg-Leu-Cys]-OH	CMKTDTRLC (SEC ID nº 5)

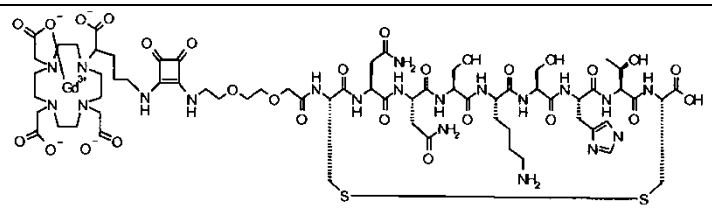
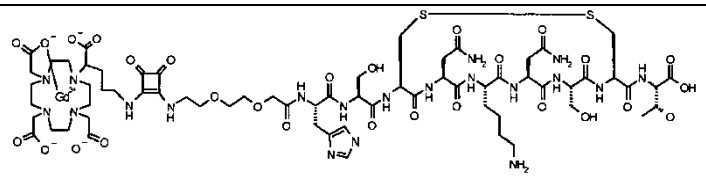
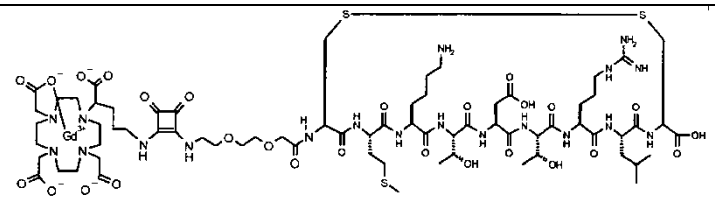
* a modo de ilustración

Condensación, desprotección:

Se disuelven 210 mg de Gd-DOTA-escuarato de dietilo (preparado según el protocolo detallado en el ejemplo 3) en 20 ml de agua. Se ajusta el pH a 9 con una solución saturada de Na_2CO_3. Se añaden 350 mg de péptido protegido nº 1 (-Lys(tfa)-) y se ajusta el pH a 9,2. Se deja reaccionar durante 4 horas. Se dializa la solución por membranas de umbral de corte de 1000 Da durante 48 h y entonces se someten a cromatografía en columna RP-18 (eluyente: MeOH/agua (50/50)).

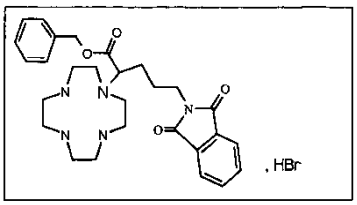
Los péptidos nº 2 y 3 se condensan según el mismo modo de operación.

Los productos obtenidos tienen como estructura:

N°	Estructura	PM	Espectro de masas
4		1829,0	conforme
5		1829,0	conforme
6		1906,23	conforme

Ejemplo 3: Síntesis de un quelato bifuncional derivado de DOTA

Etapa 1: Éster bencílico del ácido 5-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)-2-(1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico



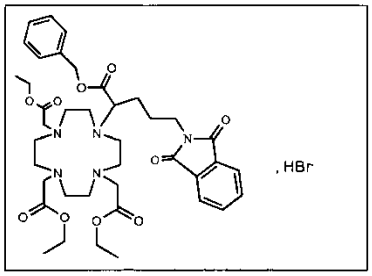
Se disuelven 55 g de cicleno base (320 mmol) en 550 ml de CH_3CN, a los que se añaden gota a gota 119,8 g de derivado bromado (éster bencílico del ácido 2-bromo-5-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)pentanoico, 288 mmol) disuelto en 550 ml de CH_3CN. Se agita el medio a temperatura ambiente durante 1 noche. Se filtra el precipitado y se lava abundantemente con acetonitrilo. Obtención de 138 g de producto en forma de un polvo blanco (rendimiento corregido de 81,3%).

CCM: CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH al 25% (80/40/3)

Revelado por UV y $CuSO_4$

Rf: 0,3

Etapa 2: Éster bencílico del ácido 5-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-il)-2-(4,7,10-trisetoxicarbonilmetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico

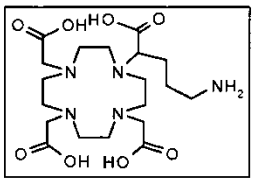


Se añaden 60 g del compuesto obtenido en la etapa 1 (102 mmol) y 50,1 g de Na_2CO_3 (464 mmol) a una solución de 59,1 g de bromoacetato de etilo (Aldrich®, 358 mmol) en CH_3CN (1,1 l). Se calienta el medio de reacción a 80ºC en atmósfera de argón durante una noche. Después de eliminar el precipitado, se concentra el filtrado y se lava abundantemente con CH_3CN. Se cristaliza el producto con CH_3CN mediante la adición gota a gota de Et_2O. Obtención de 89,8 g de producto en forma de un sólido blanco (rendimiento corregido de 100%).

CCM: CH_2Cl_2/MeOH (9/1)

Revelado por UV y $KMnO_4$; Rf: 0,4

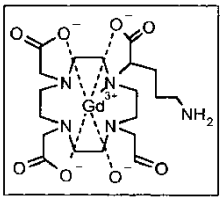
Etapa 3: Ácido 5-amino-2-(4,7,10-triscarboximetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico



Se calienta a reflujo en reactor de 5 l una solución de 54 g del compuesto obtenido en la etapa 2 (64 mmol) en ácido clorhídrico al 37% (1,8 l) durante una noche. Después de enfriar y filtrar, se concentra el filtrado y se purifica por silicio silanizado (elución con agua). Después de evaporar a presión reducida, se lava el producto con éter. Obtención de 45 g de producto en forma de un sólido blanco. Se desalifica el producto mediante pasada por resina de OH^-. Se aíslan 30 g de producto en forma de cristales blancos (rendimiento de 100%).

HPLC: Hypercarb® 5µ, 200X4.6, 250 Å; disolvente A: ácido sulfúrico 0,037 N; disolvente B: CH_3CN; detección UV a 201 nm; Tr: 18 min.

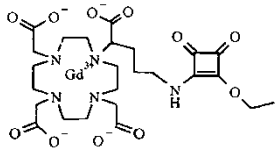
Etapa 4: Complejo de gadolinio del ácido 5-amino-2-(4,7,10-triscarboximetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico



Se disuelven 7,2 g del compuesto obtenido en la etapa 3 (16 mmol) en 70 ml de agua y se ajusta el pH a 5,5 mediante la adición de ácido clorhídrico 6 N. Se añaden 2,9 g de Gd_2O_3 (8 mmol) y se calienta a 80ºC el medio de reacción. El pH de la solución aumenta regularmente, y debe mantenerse a entre 5,2 y 5,7 mediante la adición gota a gota de ácido clorhídrico 6 N. Después de 2 horas, se estabiliza el pH a 5,7. Se filtra la ligera turbidez por un filtro Whatman® y se concentra el filtrado. Obtención de 11,1 g de producto en forma de lentejas blancas (rendimiento corregido de 100%).

HPLC: Hypercarb® 5µ, 200X 4,6, 250Å; disolvente A: ácido sulfúrico 0,037 N; disolvente B: CH_3CN; detección UV a 201 nm; Tr: 10 min.

Etapa 5: Complejo de gadolinio del ácido 5-(2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-enilamino)-2-(4,7,10-triscarboximetil-1,4,7,10-tetraazaciclododec-1-il)pentanoico



Se secan por destilación azeotrópica con tolueno 8 g del compuesto obtenido en la etapa 4, y se pone entonces en suspensión en 90 ml de DMSO anhidro en atmósfera de argón. Se añaden a continuación 2,8 ml de Et_3N secado sobre tamiz (1,7 eq.) y 5 g de escuarato de dietilo (Aldrich®, 2,5 eq.). Se agita el medio a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 1 hora. Se precipita la mezcla con 600 ml de éter. Se filtra el sólido obtenido y se lava entonces con diclorometano. Después de filtrar y secar, se recuperan 7,5 g de un sólido blanco (rendimiento de 81,5%).

HPLC: Symmetry C18, 5µ, 250X 4,6, 100Å: agua-TFA, pH = 2,7; B: CH_3CN; Detección a 201 y 254 nm; Tr: 19,8 min.

Ejemplos Parte II: Demostración de la eficacia de los péptidos de VCAM

En toda la parte II siguiente, así como en las figuras asociadas, el péptido cíclico CNNSKSHTC (SEC ID nº 2) se escribe en la forma NNSKSHT (SEC ID nº 3) que muestra la secuencia.

II.1 Péptido NNSKSHT(SEC ID nº 3) (a modo de ilustración)

Se evalúa la interacción entre el péptido y VCAM-1 con la ayuda de una prueba ELISA. Se inmoviliza el péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) sobre placa a una concentración 50 µg/ml (3 µg/pocillo) durante toda una noche a 4ºC. Se saturan a continuación los sitios no específicos con un tampón enriquecido en BSA durante 2 horas a 4ºC. Después de varios aclarados, se incuba la molécula de VCAM-1 (VCAM-1/Fc quimérica recombinante humana) a concentraciones crecientes ($3,9 \times 10^{-9}$ - $4,9 \times 10^{-7}$ M) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se detecta la proteína VCAM-1 ligada con el péptido mediante la adición de una solución de anticuerpo monoclonal de ratón anti-VCAM-1 humana diluido 1/500 en un tampón TBS. La incubación se prolonga durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de eliminar los anticuerpos no ligados, se efectúa el revelado mediante la adición de un anticuerpo (secundario) anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1/200 en tampón fosfato (1 hora a 4C) y de una solución de sustrato ABTS enriquecida en H_2O_2. La medida de la DO a 405 nm permite el cálculo del valor de K^*_d de VCAM-1.

Se calcula la afinidad del péptido por VCAM-1 directamente a partir de una prueba funcional celular que consiste en medir la inhibición de la adhesión celular.

Se inmoviliza la proteína VCAM-1 sobre placa ELISA a una concentración 20 µg/ml (1,2 µg/pocillo) durante una noche a 4ºC. Se preincuba entonces el péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) a concentraciones crecientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, se incuban las células Jurkat preestimuladas con PMA 50 ng/ml durante 3 horas (10^5 células/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de varios aclarados, se fijan las células ligadas con VCAM-1 en una solución de glutaraldehído al 1% (45 minutos a 4ºC). Después de los lavados, se incuba una solución de violeta de cresilo al 1% durante 30 minutos. Se aclaran de nuevo los pocillos y se incuban entonces durante toda una noche a temperatura ambiente con una solución de etanol. La coloración azul de las células adherentes permite la medida de la DO a 630 nm. La inhibición de la adhesión celular por el péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) permite calcular el valor de CI_{50}.

II.2 Producto de contraste Gd-DOTA-NNSKSHT (a modo de ilustración)

Se acopla con DOTA el péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) protegido con TFA. Se realiza la desprotección de las lisinas una vez se efectúa el acoplamiento.

Antes de la adquisición de IRM, se anestesian los ratones con pentobarbital. Se realizan todos los experimentos con un espectrómetro Bruker de 200 MHz (4,7 T) equipado con un imán vertical y un sistema de formación de microimágenes.

Se ensayan los productos de contraste en dos modelos diferentes.

II.2.1 Prueba del modelo de hepatitis inducida por concanavalina A (Con-A) en ratón

Se induce la hepatitis mediante la inyección i.v. de Con-A 20 mg/kg en ratones Balb/c de aproximadamente 26 g. La bibliografía reseña que VCAM-1 se expresa masivamente en el hígado entre 4 y 8 horas después de la inyección de Con-A. El protocolo de IRM es el siguiente: (1) la IRM precontraste comienza 4 h y 30 min después de la inyección de Con-A; (2) se inyecta el producto de contraste a la dosis de 100 µmol Gd/kg aproximadamente 5 h después de la inyección de Con-A; (3) se realizan varias adquisiciones postcontraste durante 1 h y 30 min cada 7 minutos. Se

adquieren las imágenes con la ayuda de una secuencia MSME (multisección mutieco) cuyos parámetros son los siguientes: TR/TE = 307,4/14,7 ms, matriz = 256, FOV = 5 cm, grosor del corte = 3 mm, 8 cortes axiales (que cubren completamente la región abdominal incluyendo los riñones), TA = 5 minutos y 14 segundos.

II.2.2 Prueba del modelo de aterosclerosis en ratón apoE$^{-/-}$

Se someten ratones hembra C57B16 ApoE$^{-/-}$ de aproximadamente 15 meses de edad a un régimen rico en colesterol durante 3 meses antes de los estudios de IRM. Para la adquisición de IRM, se anestesian los animales. Se inyecta el agente de contraste Gd-DOTA-NNSKSHT a una dosis de 100 µmol de Gd/kg. Se adquieren todas las imágenes a nivel de la aorta abdominal, particularmente la región cercana al riñón, que es conocida por desarrollar placas de ateroma debido a la presencia de ramificaciones arteriales.

Se adquieren las imágenes con la ayuda de dos secuencias:

- MSME> (multisección multieco) con los parámetros siguientes: TR/TE = 695,8/8,9 ms, NEX = 2, amplitud del espectro = 50 kHz, matriz = 256x256, FOV = 2,3x2,3 cm, grosor del corte= 1 mm, 20 cortes axiales, resolución espacial = 90x90 µm, TA = 5 minutos 56 segundos.

- Se ajustan los parámetros de la secuencia de RARE (adquisición rápida con potenciación de la relajación) utilizando un tubo de referencia lleno de una solución de Gd-DOTA 1 mM. Los parámetros de adquisición de imágenes son los siguientes: TR = 470,9-1048,5 ms, TE = 4 ms, factor RARE = 1-4, NEX = 4, matriz = 256 x 256, FOV = 2,3 cm, amplitud espectral = 33,33 kHz, grosor del corte= 0,8 mm, resolución espacial = 90 µm.

II.2.3 Tratamiento de la señal

Para los dos modelos, se miden los valores de SI en diferentes regiones de interés (a nivel de la pared arterial de la aorta abdominal o todo el hígado) con la ayuda del software de análisis de imágenes OSIRIS. Al principio, se diseñan las regiones sobre las imágenes postcontraste y se duplican entonces sobre las imágenes precontraste. Se mide el valor de SI en todos los cortes de imágenes en que la pared arterial y el hígado sean visibles. Finalmente, se promedian para cada animal los valores de SI obtenidos para los cortes en serie de la aorta con una longitud de 3,2-8 mm. Se calcula el aumento de la relación de señal/ruido (ΔSNR %) según la ecuación siguiente:

$$\Delta SNR\% = [(SI_{post}/DE_{ruido}) - (SI_{pre}/DE_{ruido})]/[SI_{pre}/DE_{ruido}] \times 100$$

en la que DE_{ruido} es la desviación estándar del ruido medido en una región fuera del animal.

Referencias

Wolf D, Hallmann R, Sass G, Sixt M, Küsters S, Fregien B, Trautwein C y Tiegs G (2001) "TNF-α-induced expression of adhesion molécules in the liver is under the control of TNFR1-relevance for concanavalin A-induced hepatitis" 1, J. Immunol. 166: 1300 - 1307.

Burtea C, Laurent S, Vander Elst L, Toubeau G y Muller RN (2006) "Molecular imaging of angiogenic blood vessels in vulnerable atherosclerotic plaques with a mimetic of RGD peptide grafted to Gd-DTPA", ESMRMB (Annual Meeting of the European Society of Magnetic Résonance in Medicine and Biology), Varsovia, Polonia.

II.3 Resultados

II.3.1 Péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) (a modo de ilustración)

La prueba ELISA (figura 1), basada en la inmovilización del péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) en presencia de concentraciones crecientes de VCAM-1, permite calcular un valor de la constante de disociación aparente K*d (VCAM-1) igual a 1,35 x 10^{-7} M, lo que demuestra la buena interacción entre el péptido y la molécula de VCAM-1.

La prueba funcional de inhibición de la adhesión celular por el péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) (figura 2) permite calcular un valor de CI_{50} (péptido) igual a 6,3 x 10^{-5} M, lo que manifiesta la interacción específica entre el péptido y VCAM-1.

II.3.2 Producto de contraste Gd-DOTA-NNSKSHT (a modo de ilustración)

II.3.2.1 IRM *in vivo* en el modelo de hepatitis inducida por Con-A en ratón

La evolución de la relación de señal/ruido (ΔSNR %) en el transcurso del tiempo muestra que la inyección i.v. de Gd-DOTA-NNSKSHT induce una mayor potenciación de la señal de IRM en el modelo de hepatitis con relación al hígado en el ratón sano. Los perfiles cinéticos de ΔSNR son notablemente idénticos en ratón aquejados de hepatitis

y en ratón sano después de la inyección de Gd-DOTA 100 µmol de Gd/kg. La señal registrada después de la inyección de Gd-DOTA-NNSKSHT en ratón aquejado de hepatitis es mayor desde los primeros minutos de adquisición y se mantiene más tiempo (al menos 70 minutos) que las señales registradas en ratón sano, o las adquiridas después de la inyección de Gd-DOTA (bajada de la señal desde el minuto 10 para las tres condiciones).

(Figura 3: Seguimiento temporal de la orientación al hígado en ratones sanos o aquejados de hepatitis inducida por Con-A (n = 6) después de la inyección i.v. de Gd-DOTA o Gd-DOTA-NNSKSHT 100 µmol de Gd/kg.)

Estos resultados demuestran que el injerto del péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) en Gd-DOTA permite orientar específicamente a la hepatitis inducida por Con-A en ratón mediante la orientación a VCAM-1.

II.3.2.2 IRM *in vivo* en ratón ApoE$^{-/-}$ (a modo de ilustración)

El seguimiento dinámico de la señal de IRM en un modelo de aterosclerosis (ratón apoE$^{-/-}$) muestra que el injerto del péptido NNSKSHT (SEC ID nº 3) en Gd-DOTA permite orientar específicamente a la placa de ateroma mediante una probable orientación a VCAM-1. Efectivamente, la inyección i.v. de Gd-DOTA-NNSKSHT a una dosis de 100 µmol de Gd/kg permite detectar una potenciación de señal superior a la medida con el producto no injertado Gd-DOTA a nivel de la aorta abdominal. Esta diferencia se observa con las dos secuencias de IRM (RARE y MSME) para todos los tiempos de adquisición (7-60 min después de la inyección del producto de contraste).

Figura 4: Seguimiento dinámico de la orientación a la placa de ateroma en ratones apoE$^{-/-}$ (n = 4-6) después de la inyección de Gd-DOTA o Gd-DOTA-NNSKSHT (100 µmol de Gd/kg i.v.). Secuencias RARE y MSME

Figura 5: Orientación a la placa de ateroma en ratón apoE$^{-/-}$ después de la inyección de Gd-DOTA o Gd-DOTA-NNSKSHT (100 µmol de Gd/kg i.v.). IRM de los cortes en serie de la aorta abdominal (zona englobada) en una longitud de 3,2 mm. Secuencia RARE, 27 minutos después de la inyección de producto de contraste. La potenciación (blanco) de la zona englobada corresponde a la placa de ateroma.

Listado de secuencias

<110> Guerbet

<120> Compuestos para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la expresión de VCAM
PORT Marc
ROUSSEAUX Olivier
MULLER Robert
BURTEA Carmen

<130> D25382

<150> FR0754087
<151> 2007-03-28

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de VCAM

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)…(1)
<223> Xaa representa cisteína o metionina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)…(3)
<223> Xaa representa asparagina o glutamina

<220>

<221> VARIANTE
<222> (4)…(4)
<223> Xaa representa serina o treonina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)…(5)
<223> Xaa representa lisina, arginina, histidina u ornitina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)…(6)
<223> Xaa representa serina o treonina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)…(7)
<223> Xaa representa histidina, arginina o lisina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)…(8)
<223> Xaa representa treonina o serina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)…(9)
<223> Xaa representa cisteína o metionina

<400> 1

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5
```

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de VCAM

<400> 2

```
Cys Asn Asn Ser Lys Ser His Thr Cys
1               5
```

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de VCAM

<400> 3

```
Asn Asn Ser Lys Ser His Thr
1               5
```

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de VCAM

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)…(2)
<223> Xaa representa cisteína o metionina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)…(3)
<223> Xaa representa lisina, arginina o alanina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)…(4)
<223> Xaa representa treonina o serina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)…(5)
<223> Xaa representa ácido aspártico o ácido glutámico

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)…(6)
<223> Xaa representa treonina o serina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)…(7)
<223> Xaa representa arginina, alanina o lisina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)…(8)
<223> Xaa representa leucina, isoleucina o valina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)…(9)
<223> Xaa representa cisteína o metionina

<400> 4

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5
```

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de VCAM

<400> 5

```
Cys Met Lys Thr Asp Thr Arg Leu Cys
1               5
```

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula general (I) siguiente:

Señal-Nexo-Péptido (I)

en la que:

- Señal representa una entidad de señalización,
- Nexo, presente o no, representa un enlace químico, y
- Péptido representa un péptido que comprende un péptido orientado a VCAM, siendo el péptido orientado a VCAM seleccionado de entre los péptidos de fórmula siguiente y sus equivalentes funcionales:

X10–X11–X12–X13–X14–X15–X16–X17–X18 (2) (SEC ID nº 4) siendo:

- X10 seleccionado de entre cisteína y metionina,
- X11 seleccionado de entre metionina y metionina,
- X12 seleccionado de entre lisina, arginina y alanina,
- X13 seleccionado de entre treonina y serina,
- X14 seleccionado de entre ácido aspártico y ácido glutámico,
- X15 seleccionado de entre treonina y serina,
- X16 seleccionado de entre arginina, alanina y lisina,
- X17 seleccionado de entre leucina, isoleucina y valina,
- X18 es cisteína y metionina

preferentemente el péptido CMKTDTRLC (SEC ID nº 5);

y las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque Péptido representa un péptido orientado a VCAM que comprende como máximo 20 aminoácidos.

3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido orientado a VCAM es un péptido de fórmula CMKTDTRLC (SEC ID nº 5).

4. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 3, en el que Señal es un quelato acoplado o no con un metal paramagnético M, siendo M seleccionado ventajosamente de entre Gd, Mn, Fe, Dy y Tm.

5. Compuesto según la reivindicación 1 a 3, en el que Señal es un quelato acoplado o no con un radionucleido.

6. Compuesto según la reivindicación 5, en el que el radionucleido es Ga68 para la formación de imágenes PET.

7. Compuesto según las reivindicaciones 3 a 6, en el que el quelato se selecciona de entre: DOTA, DTPA, DO3A, HPDO3A, TRITA, TETA, BOPTA, NOTA, PCTA, DOTMA, AAZTA, HOPO y sus derivados.

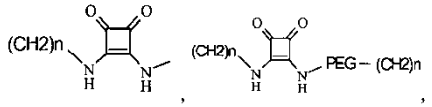
8. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 7, en el que Nexo representa:

a) un grupo de fórmula Q1-I-Q2,

en la que Q1 y Q2, idénticos o diferentes, representan O, S, NH, CO_2 -NHCO, CONH, NHCONH, NHCSNH, SO_2NH o $NHSO_2$-, y

I representa un grupo alquilo, alcoxialquilo, polialcoxialquileno, alquenilo, alquinilo, alquilo interrumpido por uno o varios escuaratos, por uno o varios arilos, ventajosamente fenilo, o por uno o varios grupos seleccionados de entre -NH-, -O-, -CO-, -NH(CO)-, -(CO)NH-, -O(CO)-, o -(OC)O-;

b) un grupo $(CH_2)_n$, $(CH_2)_n$-CO-, -$(CH_2)_n$NH-CO-, siendo n = 2 a 10, $(CH_2CH_2O)_q(CH_2)_r$-CO-, $(CH_2CH_2O)_q(CH_2)_r$-NH-CO-, siendo q = 1-10 y r = 2-10, $(CH_2)_n$-CONH-, $(CH_2)_n$-CONH-PEG, $(CH_2)_n$-NH-,



siendo n = 1 a 5 y ventajosamente n = 4 o 5; HOOC-CH_2-O-(CH_2)-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-COOH, HOOC-$(CH_2)_2$-CO_2-$(CH_2)_2$-OCO-$(CH_2)_2$-COOH, HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOH, HOOC-$(CH_2)_n$-COOH, NH_2-$(CH_2)_n$-NH_2, siendo n = 1-20; NH_2-$(CH_2)_n$-CO_2H o NH_2-CH_2-$(CH_2$-O-$CH_2)_n$-CO_2H, siendo n = 1 a 10.

9. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 3, en el que Señal representa una nanopartícula superparamagnética revestida de una capa orgánica, preferentemente que tiene un núcleo de óxido de hierro, siendo ventajosamente la capa orgánica una capa de gem-bisfosfonato.

10. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 3, en el que Señal representa un marcador para la formación de imágenes ópticas.

11. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 3, en el que Señal representa una nanopartícula lipídica que comprende al menos un quelato, siendo ventajosamente el quelato es tal como se define en la reivindicación 6.

12. Composición para la formación de imágenes médicas que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 11 y un excipiente farmacéuticamente aceptable ventajosamente destinado a la administración por vía parenteral.

13. Procedimiento de preparación de la composición según la reivindicación 12, que comprende la adición de un compuesto de fórmula general (I) según una de las reivindicaciones 1 a 11 a un medio inyectable que comprende el excipiente farmacéuticamente aceptable.

14. Utilización de un compuesto (I) según una de las reivindicaciones 1 a 11, para la preparación de una composición de diagnóstico de enfermedades cardiovasculares, ventajosamente seleccionada de entre: una enfermedad asociada a placas de ateroma, particularmente a placas vulnerables, una enfermedad coronaria y/o un riesgo de accidente isquémico, ventajosamente seleccionado de entre: infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, embolia renal, isquemia aguda de un miembro y ruptura de aneurisma aórtico.

15. Utilización de un compuesto (I) según una de las reivindicaciones 1 a 11, para la preparación de una composición de diagnóstico destinada al seguimiento de un tratamiento terapéutico de enfermedades como enfermedad cardiovascular y/o riesgo de accidente isquémico.

16. Utilización de un péptido definido en una de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento terapéutico o preventivo de una enfermedad cardiovascular, llegado el caso en asociación con otro tratamiento terapéutico o preventivo de una enfermedad cardiovascular.

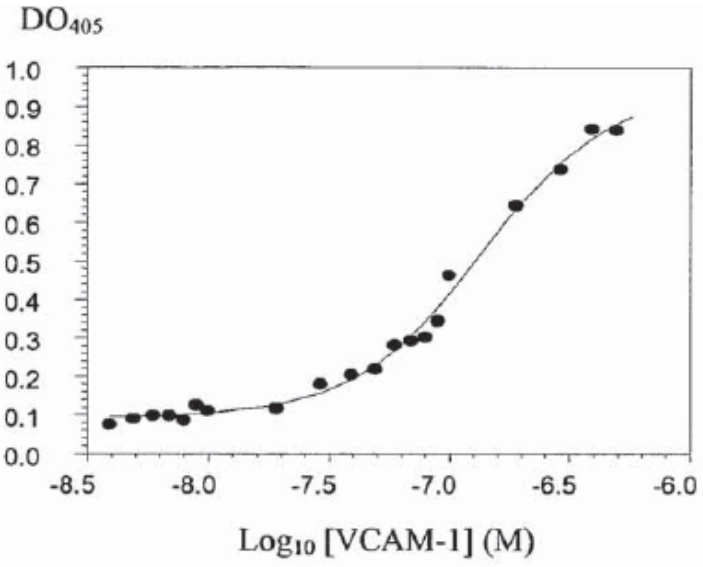


FIGURA 1

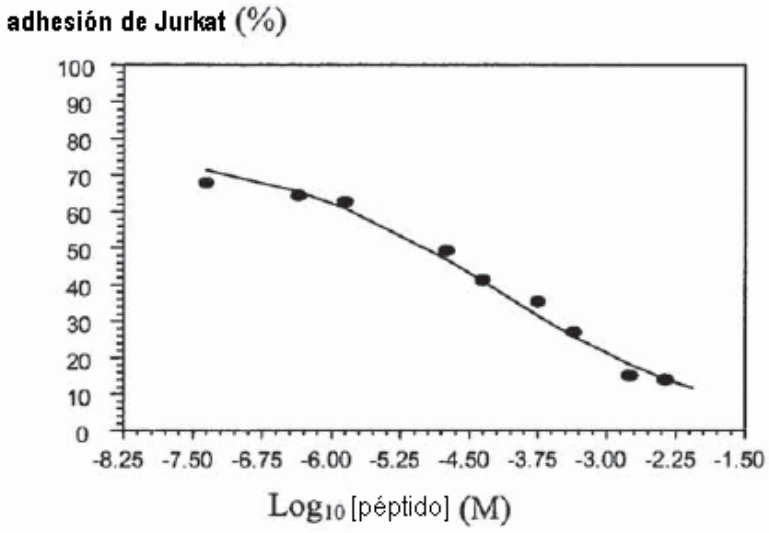


FIGURA 2

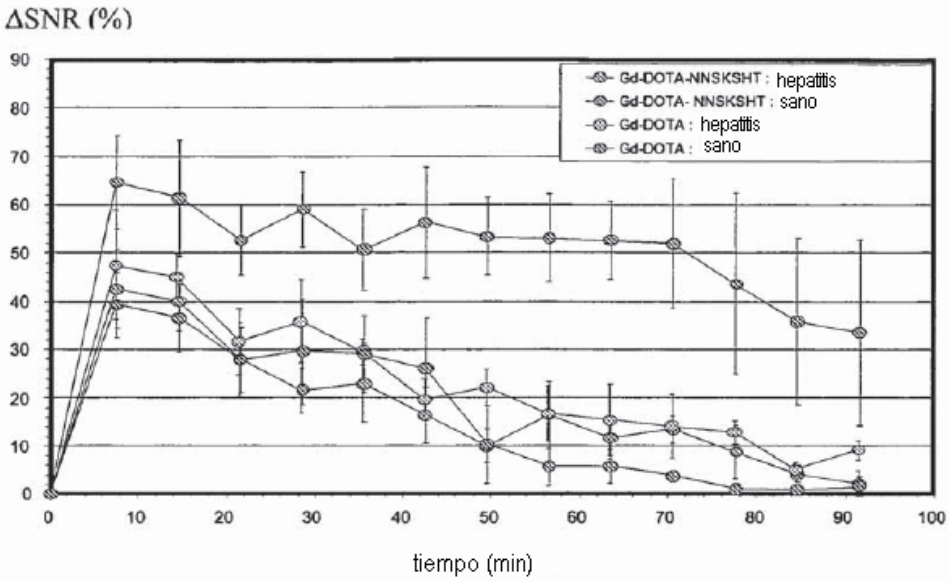


FIGURA 3

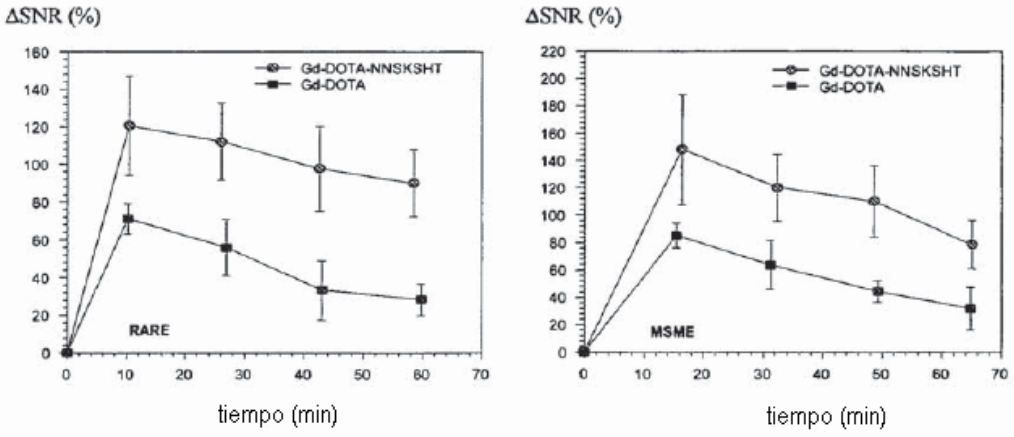


FIGURA 4

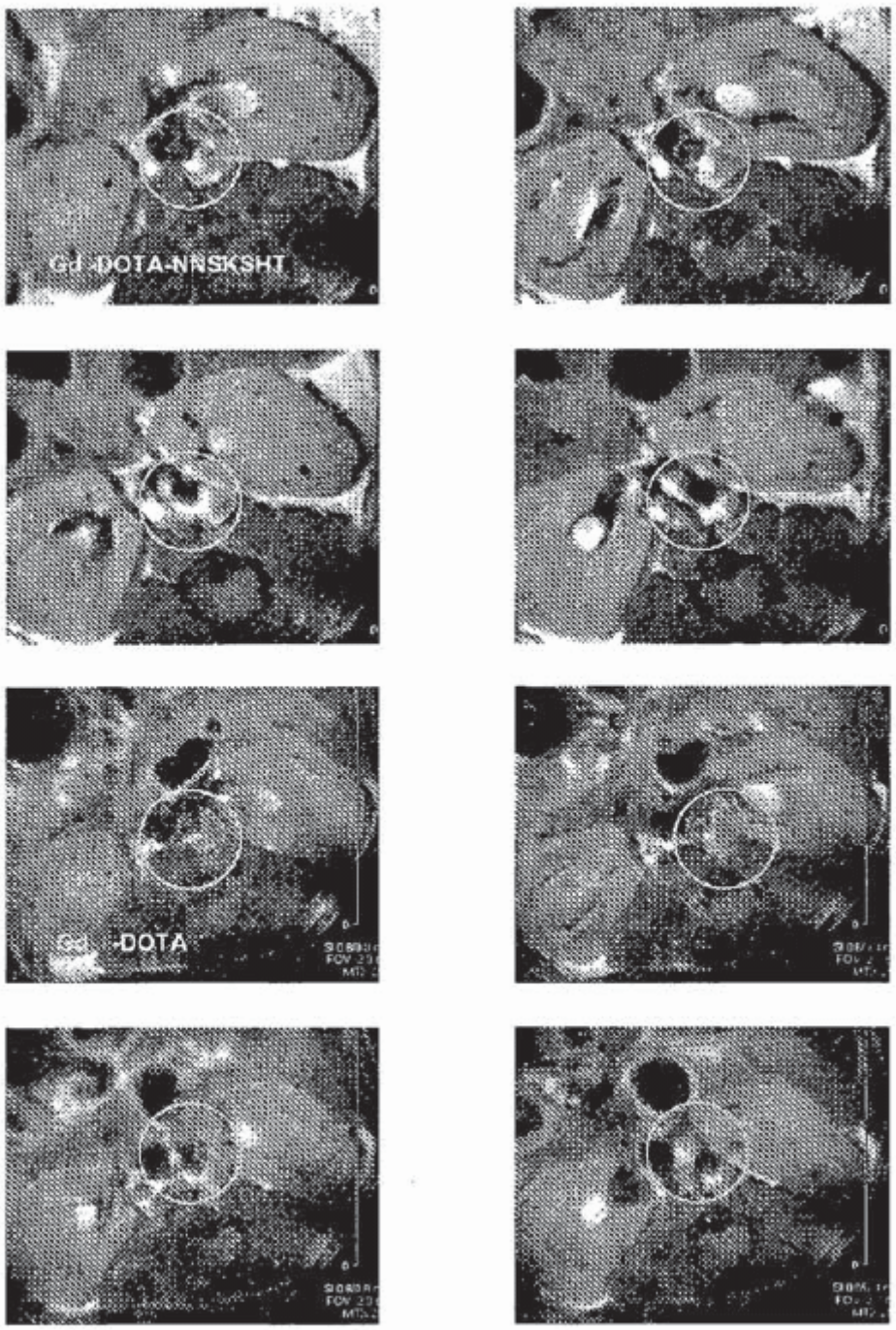


FIGURA 5