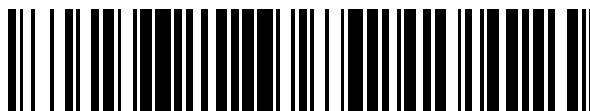


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 393**

51 Int. Cl.:

A61K 49/22 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2003 E 08008365 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2014310**

54 Título: **Péptidos de unión a KDR y a VEGF/KDR y su uso en diagnóstico y terapia**

30 Prioridad:

01.03.2002 US 360851 P

15.01.2003 US 440411 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.03.2013

73 Titular/es:

DYAX CORP. (50.0%)
300 Technology Square
Cambridge, MA 02139, US y
BRACCO SUISSE SA (50.0%)

72 Inventor/es:

SATO, AARON K.;
SEXTON, DANIEL J.;
LADNER, ROBERT C.;
DRANSFIELD, DANIEL T.;
SWENSON, ROLF E.;
MARINELLI, EDMUND R.;
RAMALINGAM, KONDAREDDIAR;
NUNN, ADRIAN D.;
VON WRONSKI, MATHEW A.;
SHRIVASTAVA, AJAY;
POCHON, SIBYLLE;
BUSSAT, PHILIPPE;
ARBOGAST, CHRISTOPHE;
PILLAI, RADHAKRISHNA;
FAN, HONG;
LINDER, KAREN E.;
SONG, BO;
NANJAPPAN, PALANIAPPA y
YAN, FENG

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 398 393 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos de unión a KDR y a VEGF/KDR y su uso en diagnóstico y terapia

5 Antecedentes de la invención

En el embrión en desarrollo, la principal red vascular se establece mediante diferenciación in situ de las células mesodérmicas en un proceso que se denomina vasculogénesis. No obstante, tras la vasculogénesis embrionaria se cree que toda la posterior generación de nuevos vasos sanguíneos, en el embrión o en adultos, está dirigida por el brote o nacimiento de nuevos capilares en la vasculatura preexistente en un proceso denominado angiogénesis (Pepper, M. y col., 1996. *Enzyme Protein*, 49: 138-162; Risau, W., 1997. *Nature*, 386: 671-674). La angiogénesis no solo está implicada en el desarrollo embrionario y el crecimiento y reparación normal de los tejidos, también está implicada en el ciclo reproductor femenino, establecimiento y mantenimiento del embarazo y en la reparación de heridas y fracturas. Además de la angiogénesis que tiene lugar en el individuo normal, los acontecimientos angiogénicos están implicados en una serie de procesos patológicos, principalmente crecimiento y metástasis tumoral y otras afecciones en la que aumenta la proliferación de vasos sanguíneos, tales como retinopatía diabética, psoriasis y artropatías. La angiogénesis es tan importante en la transición de un tumor desde crecimiento hiperplásico a neoplásico, que la inhibición de la angiogénesis se ha convertido en una terapia activa contra el cáncer (Kim, K. y col., 1993. *Nature*, 362: 841-844).

Se piensa que la angiogénesis inducida por tumores depende de la producción de factores de crecimiento proangiogénicos por las células tumorales, que superan otras fuerzas que tienden a mantener a los vasos existentes quiescentes y estables ((Hanahan, D. y Folkman, J., 1996. *Cell*, 86: 353-364). El mejor caracterizado de estos agentes proangiogénicos es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Neufeld, G. y col., 1999. *FASEB J.*, 13: 9-22).

El VEGF se produce de forma natural en varios tipos de células en respuesta a hipoxia y algunos otros estímulos. Muchos tumores también producen grandes cantidades de VEGF y/o inducen a las células estromales cercanas para que fabriquen VEGF (Fukumura, D. y col., 1998. *Cell*, 94: 715-725). El VEGF, también denominado VEGF-A, se sintetiza como cinco diferentes isoformas de corte y empalme de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos. El VEGF121 y el VEGF165 son las formas principales producidas, particularmente en tumores (véase Neufeld, G. y col., 1999, ant.). El VEGF121 carece de un dominio básico codificado por los exones 6 y 7 del gen de VEGF y no se une a la heparina o a la matriz extracelular, al contrario que el VEGF165.

Los miembros de la familia del VEGF actúan principalmente uniéndose a las tirosina cinasas receptoras. En general, las tirosina cinasas receptoras son glicoproteínas que tienen un dominio extracelular capaz de unirse a uno o más factores de crecimiento específicos, un dominio transmembrana (normalmente una hélice alfa), un dominio yuxtamembranal (en el que el receptor puede estar regulado mediante, por ejemplo, fosforilación), un dominio tirosina cinasa (el componente catalítico del receptor) y una cola carboxiterminal, que en muchos receptores, está implicada en el reconocimiento y unión de los sustratos por la tirosina cinasa. Existen tres tirosina cinasas receptoras específicas de las células endoteliales que se sabe que se unen al VEGF: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR o Flk-1) y VEGFR-3 (Flt4). Flt-1 y KDR se han identificado como los principales receptores de VEGF de alta afinidad. Aunque Flt-1 tiene una mayor afinidad por VEGF, KDR muestra una expresión más abundante en las células endoteliales (Bikfalvi, A. y col., 1991. *J. Cell. Physiol.*, 149: 50-59). Además, se piensa que el KDR domina la respuesta angiogénica y por tanto, es de mayor interés terapéutico y diagnóstico (véase Neufeld, G. y col., 1999, ant.). La expresión de KDR está muy regulada por incremento en los vasos angiogénicos, especialmente en tumores que inducen una fuerte respuesta angiogénica (Veikkola, T. y col., 2000. *Cancer Res.*, 60: 203-212).

El documento WO 99/58162 divulga agentes de contraste para ultrasonidos que se unen a KDR que comprenden un péptido cíclico. Por tanto, estos ligandos son estructuralmente diferentes de los de la presente invención.

KDR está formado por 1336 aminoácidos en su forma madura. Debido a la glucosilación, migra en un gel de SDS-PAGE con un peso molecular aparente de aproximadamente 205 kDa. KDR contiene siete dominios de tipo inmunoglobulina en su dominio extracelular, de los que los primeros tres son los más importantes en la unión a VEGF (Neufeld, G. y col., 1999, ant.). El propio VEGF es un dímero de omh capaz de unirse a dos moléculas de KDR de forma simultánea. El resultado es que dos moléculas de KDR se han dimerizado tras la unión y se autofosforilan, convirtiéndose en mucho más activas. El incremento de la actividad cinasa a su vez inicia una vía de señalización que media en los efectos biológicos específicos de KDR del VEGF.

A partir de lo anterior, se puede ver que la actividad de unión a VEGF de KDR in vivo no solo es crítica para la angiogénesis sino que la capacidad para detectar regulación por aumento de KDR sobre las células endoteliales o para detectar complejos de unión VEGF/KDR sería extremadamente beneficiosa en la detección o monitorización de la angiogénesis, con particulares aplicaciones diagnósticas tales como detectar el crecimiento de un tumor maligno. También sería beneficioso en aplicaciones terapéuticas, tales como agentes tumorocidas dirigidos o inhibidores de la angiogénesis en un sitio tumoral o dirigiendo KDR, VEGF/KDR, o agonistas de la angiogénesis a un sitio deseado.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un agente de contraste para ultrasonidos de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas útil para detectar y dirigir a receptores primarios sobre las células endoteliales para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es decir, el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2, también conocido como región del dominio cinasa (KDR) y cinasa 1 hepática fetal (Flk1)) y para obtener imágenes y dirigir complejos formados por VEGF y KDR. La implicación de VEGF y KDR en la angiogénesis hace de los polipéptidos de unión VEGF/KDR y KDR de la presente invención particularmente útiles para la obtención de imágenes de importantes sitios de la angiogénesis, por ejemplo tumores neoplásicos.

Se ha descubierto un grupo de polipéptidos que se unen a KDR o al complejo VEGF/KDR (en el presente documento denominados "polipéptidos de unión a KDR" o "restos de unión a KDR" y homólogos de los mismos). Tales polipéptidos de unión a KDR y VEGF/KDR se concentrarán en los sitios de angiogénesis, de modo que proporcionan un medio para detectar y obtener imágenes de sitios de angiogénesis activa, que pueden incluir sitios de crecimiento de tumores neoplásicos. Tales polipéptidos de unión a KDR y VEGF/KDR proporcionan nuevos productos terapéuticos para inhibir o estimular, por ejemplo, la angiogénesis. La preparación, uso y rastreo de dichos polipéptidos, por ejemplo como agentes de formación de imágenes o como parejas de fusión para productos terapéuticos de guiado a KDR o a VEGF/KDR se describen con detalle en el presente documento.

En respuesta a la necesidad de materiales y métodos mejorados para detectar, localizar, medir y posiblemente, inhibir afectando, por ejemplo, angiogénesis, los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente siete familias de polipéptidos que no se dan en la naturaleza que se unen específicamente a KDR o al complejo VEGF/KDR. El marcaje adecuado de dichos polipéptidos proporciona agentes de formación de imágenes detectables que se pueden unir a, por ejemplo, una concentración elevada, a células endoteliales que expresan KDR o células que exhiben complejos de VEGF/KDR, proporcionando agentes formación de imágenes específicos de la angiogénesis. Los polipéptidos de unión a KDR y VEGF/KDR de la presente invención pueden usarse así en la detección y diagnóstico de dichos trastornos relacionados con la angiogénesis. La conjugación o fusión de dichos polipéptidos con agentes eficaces tales como inhibidores de VEGF o agentes tumorocidas también se pueden usar para tratar tumores patogénicos, causando, por ejemplo, el conjugado o fusión para "guiar" al sitio de la angiogénesis activa, proporcionando de este modo un medio eficaz para tratar afecciones patogénicas asociadas con la angiogénesis.

Esta invención pertenece a un agente de contraste de ultrasonidos de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas que comprenden polipéptidos de unión a KDR y a VEGF/KDR e incluye el uso de un único polipéptido de unión como monómero o en una construcción multimérica o polimérica, así como el uso de más de un polipéptido de unión como se usa en la invención en construcciones multiméricas o poliméricas. Los polipéptidos de unión de acuerdo con la presente invención son útiles en cualquier aplicación en la que la unión, detección o aislamiento de KDR o complejo VEGF/KDR, o fragmentos de los mismos que conservan el sitio de unión al polipéptido, es ventajosa. Un uso particularmente ventajoso de los polipéptidos de unión como se divulga en el presente documento está en un método de obtención de imágenes de la angiogénesis in vivo. El método abarca el uso de polipéptidos de unión específica de acuerdo con la invención para detectar un sitio de angiogénesis, donde los polipéptidos de unión se han marcado de forma detectable para usar como agentes de imágenes para ultrasonidos.

Otro uso ventajoso de los polipéptidos de unión a KDR y a los complejos VEGF/KDR divulgados en el presente documento es dirigir los agentes terapéuticos (incluidos compuestos capaces de proporcionar un efecto terapéutico, radioterapéutico o citotóxico) o vehículos de liberación para productos terapéuticos (incluidos fármacos, material genético, etc.) a sitios de la angiogénesis u otro tejido que expresa KDR.

Las construcciones que comprenden dos o más polipéptidos de unión a KDR y a los complejos VEGF/KDR muestran capacidad mejorada para unirse a la molécula diana en comparación con los correspondientes polipéptidos de unión monoméricos. Por ejemplo, como se muestra en el experimento 5, las construcciones tetraméricas de los polipéptidos de unión a KDR proporcionados en el presente documento mostraron mejor capacidad para unirse a células 293H transfectadas con KDR. La combinación de dos o más polipéptidos de unión en una sola construcción molecular parece mejorar la avidéz de la construcción sobre los polipéptidos de unión monoméricos como se muestra mediante una disminución de la KD.

Además, como se ha demostrado en el presente documento, se fabricaron construcciones que comprenden dos o más polipéptidos de unión específicos por epítopos diferentes de KDR y/o KDR/VEGF (p. ej., construcciones "heteroméricas" o "heteromultiméricas", véase la solicitud de EE.UU. número 60/440.201). Cabe esperar que las construcciones que comprenden dos o más polipéptidos de unión proporcionados en el presente documento bloqueen múltiples sitios en KDR o VEGF/KDR. Las construcciones heterodiméricas muestran una capacidad de unión superior a la de ambos monómeros correspondientes, así como las construcciones multiméricas que comprenden múltiples copias del mismo polipéptido de unión. Además, las construcciones heterodiméricas que comprenden dos o más péptidos de unión específicos de diferentes epítopos, junto con un péptido control, también pudieron unirse con eficacia a las células 293H transfectadas con KDR. Por tanto, la inclusión de dos o más polipéptidos de unión que reconocen diferentes epítopos mejora además la avidéz de la construcción por la molécula

diana, como se demuestra mediante una disminución de la KD.

Por tanto, la presente invención está dirigida a construcciones que comprenden dos o más polipéptidos de unión. En una realización, las construcciones multiméricas comprenden dos o más copias de un único polipéptido de unión. En otra realización, las construcciones multiméricas de la presente invención comprenden dos o más polipéptidos de unión, de modo que al menos dos de los polipéptidos de unión en la construcción son específicos para diferentes epítomos de KDR y/o KDR/VEGF. Estas construcciones también se denominan en el presente documento "construcciones heterodiméricas", "heteromultímeros", etc. Las construcciones de la presente invención también pueden incluir péptido control o no relacionado. Las construcciones pueden incluir dos o más, tres o más, o cuatro o más polipéptidos de unión. En base a las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, un experto en la técnica puede ensamblar los polipéptidos de unión proporcionados en el presente documento en construcciones multiméricas y seleccionar construcciones multiméricas que tienen propiedades mejoradas, tales como mejor capacidad para unirse a la molécula diana. Tales construcciones multiméricas que tienen propiedades mejoradas están incluidas en la presente invención. El examen de la información de la secuencia y los datos de unión identifican una serie de polipéptidos de unión a KDR o a complejo VEGF/KDR que pueden formar estructuras de bucle.

Los polipéptidos de unión a KDR o a complejo VEGF/KDR descritos con anterioridad pueden tener opcionalmente aminoácidos adicionales unidos a uno o los dos extremos N y C-terminales.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a modificaciones de los polipéptidos anteriores para proporcionar agentes de formación de imágenes de angiogénesis específicos mediante marcaje detectable de un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Dicho marcaje detectable puede implicar radiomarcaje, marcaje enzimático o marcaje con quelatos paramagnéticos de RM o micropartículas: incorporación en burbujas de ultrasonidos, micropartículas microesferas, emulsiones o liposomas o conjugación con pigmentos ópticos.

Estos y otros aspectos de la presente invención y divulgación se pondrán de manifiesto por referencia a la siguientes descripción detallada.

Además, se describen métodos de rastreo selectivo de polipéptidos identificados mediante expresión en fagos según su capacidad para unirse a células que expresan la diana. Estos métodos permiten la detección selectiva rápida de la capacidad de unión de los polipéptidos, incluyendo polipéptidos con afinidades monoméricas que son demasiado bajas para evaluación en ensayos de unión celular estándar. Adicionalmente, estos métodos se pueden usar para evaluar rápidamente la estabilidad de los péptidos en presencia de suero.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 (paneles A y B) son gráficos que ilustran las curvas de unión de saturación de la unión de complejos péptido/neutravidina-HRP. La figura 1A ilustra la curva unión de saturación para la SEC ID N.º: 5 y la SEC ID N.º: 31. La figura 1B ilustra la curva de unión de saturación para la SEC ID N.º: 17 y la SEC ID N.º: 66. Todos los péptidos tenían una biotina C-terminal y un espaciador JJ.

La figura 2 es un gráfico que ilustra la unión de los complejos péptido/neutravidina-HRP: control (biotinilado con espaciador y las SEC ID N.º: 5, 31, 17 y 66) a células 293H transfectadas con KDR y transfectadas de forma simulada a una única concentración (5,55 nM). Todos los péptidos tenían una biotina en C-terminal y un espaciador JJ.

La figura 3 ilustra estructuras peptídicas con y sin espaciador (ácido di(8-amino-3,6-dioxaoctanoico) "JJ") y biotina analizada en el ejemplo 5((a) la SEC ID N.º: 5 biotinilada con un espaciador JJ; (b) la SEC ID N.º: 5 con una biotina en N-termina; (c) la SEC ID N.º: 31 biotinilada con el espaciador JJ (d) biotinilado SEC ID N.º: 31).

La figura 4 ilustra estructuras peptídicas con y sin espaciador (ácido di(2,78-amino-3,6-dioxaoctanoico) "JJ") y biotina analizada en el ejemplo 5((a) la SEC ID N.º: 5 biotinilada con un espaciador JJ; (b) la SEC ID N.º: 5 con una biotina en N-termina; (c) la SEC ID N.º: 31 biotinilada con el espaciador JJ (d) biotinilado SEC ID N.º: 31).

La figura 5 es un gráfico de barras que ilustra unión específica (unión a células transfectadas con KDR menos la unión a células transfectadas de forma simulada) de los complejos péptido/neutravidina-HRP con y sin suero de rata al 40 %. (a) SEC ID N.º: 31; (b) SEC ID N.º: 5; (c) SEC ID N.º: 17; (d) SEC ID N.º: 66. La concentración de soluciones de péptido/avidina HRP fue 6,66 nM para (a) y (b), 3,33 nM (c) y 2,22 nM para (d).). Todos los péptidos tenían una biotina en C-terminal y un espaciador JJ.

La figura 6 es un gráfico de barras que ilustra la unión de soluciones de polipéptido/avidina-HRP (SEC ID N.º: 31 y/o SEC ID N.º: 5) a células transfectadas simuladas o con KDR representada como la absorbancia a 450 nm. Las proporciones de los péptidos control y de unión a KDR usadas para formar cada complejo tetramérico están indicadas en la leyenda para cada multímero analizado.

- La figura 7 es un gráfico de barras que ilustra la unión específica de una SEC ID N.º: 5 biotinilada con un espaciador JJ/complejo avidina-HRP a células transfectadas con KDR (restada la unión de fondo a células transfectadas simuladas), representada como la absorbancia a 450 nm. Al ensayo se añadieron concentraciones crecientes (como se indica en el eje X) de péptidos sin forma complejos como se indica en la leyenda. Solo la SEC ID N.º: 5 libre fue capaz de disminuir la unión del complejo de la SEC ID N.º: 5 a las células transfectadas con KDR.
- La figura 8 ilustra estructuras de las secuencias polipeptídicas de unión analizadas en el ejemplo 6. SEC ID N.º: 31 y 76-80.
- La figura 9 es un gráfico de barras que ilustra la unión de perlas fluorescentes a células transfectadas con KDR o transfectadas de forma simulada. Las perlas recubiertas con neutravidina con los ligandos biotinilados indicados unidos se analizaron para detectar la unión a células 293H que expresan y que no expresan KDR.
- La figura 10 es un gráfico de barras que ilustra el porcentaje de inhibición de la unión de VEGF marcado con ^{125}I por polipéptidos de unión (a) SEC ID N.º: 31 acetilada (sin el extremo C modificado, "P6", GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDP; SEC ID N.º: 81; (b) SEC ID N.º: 4 (sin el extremo C modificado, "P4", AGDSWCSTEYTYCEMIGT; SEC ID N.º: 82); (c) SEC ID N.º: 5 biotinilada con un espaciador JJ y (d) SEC ID N.º: 17 (biotinilada con el espaciador JJ) a dos concentraciones (30 mM y 0,3 mM), a transfectantes 293H que expresan KDR.
- La figura 11 representa la detección quimioluminiscente sobre película que demuestra que la DR activada (fosforilada) no se detectaba en inmunoprecipitados de HUVEC no estimuladas (-V), pero fue abundante en inmunoprecipitados de HUVEC (+V) estimuladas con VEGF (panel superior). Volver a sondear la transferencia con anti-KDR demostró que las cantidades comparables del KDR total estaban presentes en ambos inmunoprecipitados (panel inferior).
- La figura 12 representa la detección quimioluminiscente sobre película que demuestra la capacidad de un anticuerpo anti-KDR (1 µg/ml) para bloquear parcialmente la fosforilación mediada por VEGF.
- La figura 13 representa la detección quimioluminiscente sobre película que demuestra la capacidad de un polipéptido de unión a KDR SEC ID N.º: 37 (10 mM) para bloquear la fosforilación de KDR mediada por VEGF.
- La figura 14 es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición de la unión a VEGF marcado con ^{125}I por los péptidos P12-XB (SEC ID N.º: 17) D2, D1, D3 y P13-D (AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGG; SEC ID N.º: 83) a tres concentraciones diferentes (10 µM, 0.3 µM y 0,03 µM) en las células 293H transfectadas con KDR. Los resultados proceden de un experimento llevado a cabo por triplicado $\pm$ S.D.
- La figura 15 es una fotografía que muestra la capacidad de D1 para bloquear completamente la fosforilación inducida por VEGF de KDR en HUVEC a 10 nM y la mayoría de la fosforilación a 1 nM. Volver a sondear la transferencia para el KDR total (panel inferior) demostró que los efectos de los compuestos analizados no se debían a la menor carga de la muestra. Los homodímeros compuestos por las dos secuencias de unión contenidas en D1 no interfirieron en la fosforilación a hasta 100 nM.
- La figura 16 es un gráfico que muestra que D1 bloquea de forma potente la migración/invasión de las células endoteliales inducida por VEGF. Las células en migración se cuantificaron por medición de la fluorescencia tras tinción de las células migradas con un pigmento fluorescente.
- La figura 17 es un gráfico del aclaramiento en plasma en forma de porcentaje de la dosis inyectada por ml frente al tiempo.
- La figura 18 muestra los perfiles de SE-HPLC de plasma de la columna peptídica Superdex. Panel superior, muestra inyectada; seguido por 0 minutos, 30 minutos y 90 minutos. El inserto dentro de cada panel muestra el punto de tiempo, el número de animal y el volumen inyectado para el análisis de HPLC.
- La figura 19 es un gráfico que muestra los resultados de analizar los péptidos KDR en un ensayo de proliferación HUVEC. A: D6; B: SEC ID N.º: 17; C: SEC ID N.º: 84 (AEGTGDLCYFPWVCSLDPGPEGGGK; control negativo); F: SEC ID N.º: 84; control negativo.
- La figura 20 muestra el análisis cinético de D1 (véase la figura 25), que se une a KDR-Fc murino. Todos los sensogramas se adaptan al modelo de analito bivalente.
- La figura 21 muestra el análisis cinético de D7, un heterodímero de SEC ID N.º: 5 y SEC ID N.º: 31. Todos los sensogramas se adaptan al modelo de analito bivalente.
- La figura 22 muestra el análisis cinético de la SEC ID N.º: 18 marcada con fluoresceína que se une a KDR-Fc murino. Todos los sensogramas se adaptan al modelo de Langmuir 1:1.

La figura 23 muestra un engarce oxima. Los aminoácidos que contienen una función aminoalcohol (4) y que contienen una función alcoxi-amino (5) se incorporan en la cadena peptídica, no necesariamente al final de la cadena peptídica.

5

La figura 24 muestra estructuras fosfolipídicas.

La figura 25 muestra el dímero 1 (D1; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) [(BiotinaJK-(O=)C(CH₂)₃C (=O)-JJ-NH(CH₂)₄-(S)-CH((Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG (SEC ID N.º: 78))-NH)CONH₂]-NH₂).

10

La figura 26 muestra el dímero 2 (D2; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) [(BiotinaJK-(O=)C(CH₂)₃C (=O)-JJ-NH(CH₂)₄-(S)-CH((Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJ (SEC ID N.º: 50))-NH)CONH₂]-NH₂).

La figura 27 muestra el dímero 3 (D3; Ac-AVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 49) [(BiotinaJK-(O=)C(CH₂)₃C (=O)-JJ-NH(CH₂)₄-(S)-CH((Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG (SEC ID N.º: 78))-NH)CONH₂]-NH₂).

15

La figura 28 muestra el dímero 4 (D4; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK (SEC ID N.º: 50) [(DOTA-JK-(O=)C(CH₂)₃C (=O)-JJ-NH(CH₂)₄-(S)-CH((Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG (SEC ID N.º: 78))-NH)CONH₂]-NH₂).

20

La figura 29 muestra el dímero 5 (D5; Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 49) (JJ-C(=O)(CH₂)₃C(=O)-K-NH (CH₂)₄-(S)-CH((Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGG (SEC ID N.º: 17))-NH)CONH₂]-NH₂).

La figura 30 muestra el dímero 8 (D8; Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK (SEC ID N.º: 66) {Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK (SEC ID N.º: 66) (J-Glut-)-NH₂} K(Biotina-JJ)-NH₂).

25

La figura 31 muestra el dímero 9 (D9; Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK (SEC ID N.º: 66) {[Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31) (JJ-Glut-)-NH₂} K-NH₂).

La figura 32 muestra el dímero 10 (D10; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) {[Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31) (JJ-Glut-NH(CH₂)₄-(S)-CH(PnAO₆-Glut-NH)(C=O)-]-NH₂]-NH₂).

30

La figura 33 muestra el dímero 11 (D11; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) {Ac-VCWEDSWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 97) (JJ-Glut-NH(CH₂)₄-(S)-CH(DOTA-JJ-NH-)(C=O)-]-NH₂]-NH₂).

35

La figura 34 muestra el dímero 12 (D12; Ac-AGPTWCEDDYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 98) {[PnAO₆-Glut-K(Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 49) (-C(=O)CH₂(OCH₂CH₂)₂OCH₂C(=O)-)-NH₂]-NH₂).

40

La figura 35 muestra el dímero 13 (D13; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) {Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 49) [JJ-Glut-K(BOA)-NH₂]-NH₂).

La figura 36 muestra el dímero 14 (D14; Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK (SEC ID N.º: 66) {PnAO₆-Glut-K[Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 99) (JJ-Glut)NH₂]-NH₂).

45

La figura 37 muestra el dímero 15 (D15; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) {[Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGKJJ (SEC ID N.º: 31)-Glut]-NH₂]-K(PnAO₆-Glut)-NH₂).

La figura 38 muestra el dímero 16 (D16; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGGK (SEC ID N.º: 17) {[PnAO₆-Glut-K(Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31) (-C(=O)CH₂O(CH₂CH₂O)₂OCH₂C(=O)-MH(CH₂)₃O.

50

(CH₂CH₂O)₂(CH₂)₃NH C(=O)CH₂O(CH₂CH₂O)₂CH₂C(=O)-]-NH₂]-NH₂).

La figura 39 muestra el dímero 17 (D17; Ac-AQDWYYDEILJGRGGRGGRGGK (SEC ID N.º: 100) {K[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31) (JJ-Glut)-NH₂]-NH₂).

55

La figura 40 muestra el dímero 18 (D18; Ac-AGPTWCDDYDWEYCWLGTGGGGK (SEC ID N.º: 101) {PnAO₆-Glut-K[Ac-GVDFRCEWSDWGEVGCSPDYGGGK (SEC ID N.º: 106) (JJ-Glut)-NH₂]-NH₂).

La figura 41 muestra el dímero 19 (D19; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 31) {Biotina-K[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (JJ-Glut)-NH₂]-NH₂ (SEC ID N.º: 49).

60

La figura 42 muestra el dímero 20 (D20; (-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGGK (SEC ID N.º: 102)-NH₂)-Glut-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG (SEC ID N.º: 78)-NH₂).

65

La figura 43 muestra el dímero 21 (D21; [-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGGK (SEC ID N.º: 102) (PnAO₆-Glut)-

NH₂]-Glut-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG (SEC ID N.º: 78)-NH₂).

La figura 44 muestra el dímero 22 (D22; Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31) {JJ-Glut-JJ-AGPTWCEDDWYYCWLFTGGGK (SEC ID N.º: 103) -NH₂}-NH₂).

La figura 45 muestra el dímero 23 (D23; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) {Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 49) [JJ-Glut-K(SATA)]-NH₂}-NH₂). D23 es también D5 funcionalizado con el grupo SATA (S-acetiltioacetilo).

La figura 46 muestra el dímero 24 (D22; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) {SATA-JJK[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(SEC ID N.º: 49)(JJ-Glut)-NH₂]-NH₂).

La figura 47 muestra el dímero 25 (D25; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) {Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31) (JJ-Glut-NH(CH₂)₄-(S)-CH(NH₂)C(=O)-]-NH₂)-NH₂).

La figura 48 muestra el dímero 26 (D26; AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) {(-Glut-JJ-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG (SEC ID N.º: 78) -NH₂)-K}-NH₂).

La figura 49 muestra el dímero 27 (D27; Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) {Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 49) [S(GalNAc(Ac)3- α -D)-G-S(GalNAc(Ac)3- α -D)-Glut-S(GalNAc(Ac)3- α -D)-G-S(GalNAc(Ac)3- α -D)-NH(CH₂)₄-(S)-CH(Biotina-JJNH)-C(=O)-]-NH₂)-NH₂).

La figura 50 muestra un péptido de unión dimérico de la invención.

La figura 51 muestra un péptido de unión dimérico de la invención.

La figura 52 muestra que D26 (cuadrados) con su glicosilación y espaciador modificado puede bloquear los efectos del VEGF en el ensayo de migración para bloquear la migración estimulada por VEGF incluso con mayor potencia que D24 (rombos) que carece de dichas modificaciones químicas.

La figura 53 muestra que el Auxiliar A aumenta la potencia de D6 en el bloqueo de los efectos biológicos de VEGF en un ensayo de migración con HUVEC cultivados. Rombo: D6 solo a las concentraciones indicadas. Cuadrados: D6 a las concentraciones indicadas más Adjunto A 100 nM (constante).

La figura 54 es un diagrama que muestra el Esquema 1 (síntesis del péptido 2).

La figura 55 es un diagrama que muestra el Esquema 2 (síntesis del péptido 4).

La figura 56 es un diagrama que muestra el Esquema 3 (síntesis de D26).

Las figuras 57A-B muestran derivados de los péptidos de unión de la invención.

La figura 58 muestra la captación y la retención de burbujas de contraste en el tumor hasta 30 minutos después de la inyección para suspensiones de microburbujas estabilizadas con fosfolípidos conjugados con péptidos KDR como se usan en la invención preparadas de acuerdo con el ejemplo 38.

Las figuras 59 y 61 también muestran la captación y la retención de burbujas de contraste en matrigel o el tumor hasta 30 minutos después de la inyección para suspensiones de microburbujas conjugadas con péptidos KDR como se usan en la invención. Por el contrario, las mismas burbujas solo mostraron una visualización/contraste de burbujas transitoria (no más de 10 minutos) en la AOI situada fuera de la matrigel o el sitio del tumor.

La figura 62 muestra un ejemplo típico de agentes de contraste para ultrasonidos conjugados con péptidos unidos a células transfectadas con KDR o simuladas en presencia de 10 % de suero humano (aumento 100X).

La figura 63 muestra un péptido de unión dimérico de la invención.

Definiciones

En las secciones siguientes, el término "recombinante" se usa para describir ácidos nucleicos manipulados o alterados de un modo no natural, las células huésped transfectadas con ácidos nucleicos exógenos o polipéptidos expresados de un modo no natural a través de manipulación de ADN aislado y transformación de las células huésped. Recombinante es un término que abarca específicamente moléculas de ADN que se han construido in vitro usando técnicas de ingeniería genética y el uso del término "recombinante" como adjetivo para describir una molécula, construcción, vector, célula, polipéptido o polinucleótido excluye específicamente dichas moléculas, construcciones, vectores, células, polipéptidos o polinucleótidos naturales.

El término “bacteriófago” se define como un virus bacteriano que contiene un núcleo de ADN y una cubierta protectora creada por la agregación de una serie de moléculas proteicas diferentes. Los términos “bacteriófago” y “fago” se usan en el presente documento de forma intercambiable.

- 5 El término “polipéptido” se usa para hacer referencia a un compuesto de dos o más aminoácidos unidos a través de la cadena principal (en oposición a la cadena lateral) por un enlace amida peptídico ((-C(:O)NH-). El término “péptido” se usa en el presente documento de forma intercambiable con “polipéptido”, pero en general se usa para hacer referencia a polipéptidos que tienen menos de 40 y preferentemente, menos de 25 aminoácidos.
- 10 El término “polipéptido de unión”, como se usa en el presente documento se refiere a cualquier polipéptido capaz de formar un complejo de unión con otra molécula. Un término equivalente usado en ocasiones en el presente documento como “resto de unión”. “Polipéptido de unión a KDR” es un polipéptido que forma un complejo in vitro o in vivo con el receptor-2 del factor de crecimiento endotelial vascular (o KDR, Flk-1); “polipéptido de unión al complejo VEGF/KDR” es un polipéptido que forma un complejo in vitro o in vivo con un complejo de unión formado entre el
- 15 factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y KDR, en concreto el complejo de VEGF homodimérico y uno o dos moléculas KDR que se cree que se forman en la superficie de las células endoteliales durante la angiogénesis. Ejemplos específicos de polipéptidos de unión a KDR y VEGF/KDR incluyen, entre otros, los péptidos presentados en las tablas 1-7 a continuación e incluyen polipéptidos híbridos y quiméricos que incorporan dichos péptidos. También incluidos dentro de la definición de polipéptidos de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR son los
- 20 polipéptidos que están modificados u optimizadas como se divulga en el presente documento.

Ejemplos específicos de dichas modificaciones se tratan con detalle más adelante, pero incluyen la sustitución de aminoácidos por aquellos en la secuencia polipeptídica parental para optimizar las propiedades, obstruir un sitio de escisión enzimática etc.; sustituciones o elongaciones de aminoácidos en C o N terminal, por ejemplo para el fin de

25 unir el polipéptido a un marcador de formación de imágenes detectable u otro sustrato, ejemplos de los cuales incluyen, por ejemplo, la adición de una “cola” de polihistidina con el fin de ayudar a la purificación; truncamientos; cambios en los enlaces amida; translocaciones; péptidos retroinversos; peptoides, retroinverso-peptoides; el uso de modificaciones o engarces en N terminal o C terminal, tales como segmentos de poliglicina o polilisina; alteraciones para incluir grupos funcionales, principalmente funcionalidades hidracina ((-NH-NH2) o el engarce en C terminal - Gly-Gly-Gly-Lys, para ayudar a la inmovilización de los péptidos de unión de acuerdo con la presente invención sobre soportes sólidos o para la unión de pigmentos fluorescentes; modificaciones farmacocinéticas, modificaciones

30 estructurales para retener las características estructurales; formación de sales para aumentar la solubilidad en agua o facilitar la formulación y similares.

- 35 Además de los marcadores detectables descritos más adelante en el presente documento, otros sustratos adecuados para los polipéptidos de unión incluyen un agente tumorocida o enzima, un liposoma (p. ej., cargado con un agente terapéutico, un gas adecuado para ultrasonidos o ambos) o un soporte sólido, pocillo, placa, perla tubo, portaobjetos, filtro o placa. Además, se pueden formar dímeros o multímeros de uno o más polipéptidos de unión a KDR o VEGF/KDR. Dichas construcciones pueden exhibir, por ejemplo, una mayor capacidad para unirse a KDR.
- 40 Todos estos polipéptidos de unión modificados también se consideran polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR siempre que retengan la capacidad para unirse a las dianas de KDR o VEGF/KDR.

“Homólogos” de los polipéptidos de unión descritos en el presente documento se pueden producir usando cualquiera de las técnicas de modificación u optimización descritas en el presente documento o conocidos para los expertos en la técnica. Dichos polipéptidos homólogos se entenderá que entran dentro del alcance de la presente invención y la

45 definición de polipéptidos de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR siempre que la sustitución, adición o delección de aminoácidos u otra de estas modificaciones no elimine su capacidad para unirse a KDR o al complejo VEGF/KDR. El término “homólogo”, como se usa en el presente documento, se refiere al grado de similitud de secuencia entre dos polímeros (es decir, moléculas polipeptídicas o moléculas de ácido nucleico). Cuando el mismo residuo de nucleótido o de aminoácido o uno con propiedades sustancialmente similares (Es decir, una sustitución conservadora) ocupa una posición en la secuencia en los dos polímeros en comparación, los polímeros son

50 homólogos en dicha posición. Por ejemplo, si los residuos de aminoácidos en las posiciones 60 de 100 aminoácidos en dos secuencias polipeptídicas coinciden o son homólogos, las dos secuencias son homólogos e un 60 %. Las cifras de porcentaje de homología a las que se hace referencia en el presente documento reflejan la máxima

55 homología posible entre los dos polímeros, es decir el porcentaje de homología cuando los dos polímeros están tan alineados que tienen el mayor número de posiciones coincidentes (homólogas). Los polipéptidos homólogos dentro del alcance de la presente invención serán al menos un 70 % y preferentemente más del 80 %, homólogos con al menos una de las secuencias de unión a KDR o a VEGF/KDR divulgadas en el presente documento.

- 60 El término “unión” se refiere a la determinación mediante ensayos estándar, incluidos los descritos en el presente documento, de que un polipéptido de unión reconoce y se une de forma reversible a una diana dada. Dichos ensayos estándar incluyen, entre otros, diálisis en equilibrio, filtración en gel y la monitorización de cambios espectroscópicos que son el resultado de la unión.

- 65 El término “especificidad” se refiere a un polipéptido de unión que tiene una afinidad de unión mayor para una diana sobre otra. El término “especificidad por KDR” se refiere a un resto de unión a KDR que tiene una afinidad de unión

mayor para KDR sobre una diana irrelevante. El término "especificidad por VEGF/KDR " se refiere a un resto de unión al complejo VEGF/KDR que tiene una afinidad de unión mayor por un complejo VEGF/KDR sobre una diana dada. La especificidad de unión se puede caracterizar por una constante de disociación en equilibrio (K_D) o una constante de asociación en equilibrio (K_a) para los dos materiales diana dados o puede ser cualquier medida de fuerza de unión relativa. Los polipéptidos de unión de acuerdo con la presente invención son específicos de KDR o el complejo VEGF/KDR y tienen, preferentemente, una K_D por KDR o el complejo VEGF/KDR que es menor de 10 mM, más preferentemente menor de 10 mM, más preferentemente menor de 0,5 mM o incluso menor.

El término "paciente," como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier mamífero, especialmente seres humanos.

La expresión vehículo o excipiente "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o excipiente no tóxico que se pueden administrar a un paciente, junto con un compuesto de la presente invención y que no destruye la actividad biológica o farmacológica del mismo.

A lo largo de la presente memoria se usan las siguientes abreviaturas habituales: 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (fmoc o Fmoc), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), anhídrido acético (Ac_2O), (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo (ivDde), ácido trifluoroacético (TFA), Reactivo B (TFA:H₂O:fenol:triisopropilsilano, 88:5:5:2), N,N-diisopropiletilamina (DIEA), hexafluorofosfato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), N-hidroxisuccinimida (NHS), síntesis peptídica en fase sólida SPFS), dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF) y N-metilpirrolidinona (NMP).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un agente de contraste para ultrasonidos de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, que comprende nuevos restos de unión que se unen a KDR o a un complejo de VEGF y KDR. Dichos restos de unión hacen posible la detección eficiente, obtención de imágenes y localización de células endoteliales activadas que exhiben expresión de KDR regulada por aumento y unión a VEGF. Dichas células endoteliales son características de la angiogénesis activa y por tanto, los polipéptidos descritos en el presente documento proporcionan un medio de detección, monitorización y localización de sitios de angiogénesis. En particular, los polipéptidos de unión en los agentes de la presente invención, cuando se marcan adecuadamente, son útiles para detectar, obtener imágenes y localizar angiogénesis inducida por tumor. Por tanto, los polipéptidos de unión se usan para formar diversos agentes diagnósticos y terapéuticos para diagnosticar y tratar el crecimiento de tumores neoplásicos u otros casos patogénicos de la angiogénesis.

Polipéptidos de unión específicos de KDR y del complejo de VEGF y KDR en los agentes de contraste de acuerdo con la presente invención se aislaron inicialmente mediante detección selectiva de bibliotecas de expresión en fagos, es decir, poblaciones de bacteriófagos recombinantes transformados para expresar un péptido exógeno sobre su superficie. Con el fin de aislar nuevos restos de unión polipeptídica para una diana concreta, tal como KDR o VEGF/KDR, detección selectiva de bibliotecas peptídicas grandes, usando, por ejemplo, técnicas de expresión en fagos, es especialmente ventajosa, en cuanto a que se pueden analizar cifras muy grandes (p. ej., 5×10^9) de potenciales aglutinantes y aglutinantes satisfactorios aislados en un corto periodo de tiempo.

Con el fin de preparar una biblioteca de fagos de expresión de polipéptidos para detección selectiva de polipéptidos de unión tales como polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR, se selecciona un dominio de unión candidato para servir como molde estructural para los péptidos a expresarse en la biblioteca. La biblioteca de fagos está hecha de una multiplicidad de análogos del dominio parental o molde. El molde del dominio de unión puede ser una proteína natural o sintética, o una región o dominio de una proteína. El molde del dominio de unión puede seleccionarse en base a los conocimientos de una interacción conocida entre el molde del dominio de unión y la diana de unión, pero esto no es crítico. De hecho, no es esencial que el dominio seleccionado para actuar como molde para la biblioteca tenga cualquier afinidad por la diana: Su objetivo es proporcionar una estructura de la que se pueda generar una multiplicidad (biblioteca) de polipéptidos de estructura similar (análogos), en la que la multiplicidad de análogos incluirán uno o más análogos que exhiben las propiedades de unión deseadas (y cualquier otra propiedad por la que se detectan).

En la selección del dominio de unión parental o molde sobre el que basar las variadas secuencias de aminoácidos de la biblioteca, la consideración más importante es como los diversos dominios peptídicos se presentarán a la diana, es decir en qué conformación los análogos peptídicos entrarán en contacto con la diana. En las metodologías de expresión en fagos, por ejemplo, los análogos se generarán mediante inserción de ADN sintético que codifica los análogos en fagos, lo que tiene como resultado la expresión del análogo sobre las superficies del fago. Dichas bibliotecas de fagos, tal como el fago M13, que muestran una amplia variedad de polipéptidos diferentes, se pueden preparar usando técnicas como las descritas en, por ejemplo, Kay y col., Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego, 1996) y documento US 5.223.409 (Ladner y col.).

Al aislar los polipéptidos específicos en el agente de contraste de acuerdo con la presente invención se usaron

bibliotecas de péptidos cíclicos (o “bucles”), designadas TN8/IX, TN12/I y una biblioteca lineal, designada Lin20. Cada biblioteca se construyó para la expresión de diversos polipéptidos en el fago M13. Las bibliotecas que tienen una designación “TN” se diseñaron para expresar un bucle peptídico exógeno variegado corto de 8 o 12 aminoácidos, respectivamente, sobre la superficie del fago M13, en el extremo amino de la proteína III. Las bibliotecas se designan TN8/IX (que tienen una potencial de $2,2 \times 10^{15}$ diversidad de secuencia de aminoácidos), TN12/I (que tiene una diversidad de secuencia de $4,6 \times 10^{19}$) y Lin20 (que tiene una potencial diversidad de secuencia de aminoácidos de $3,8 \times 10^{25}$).

La biblioteca TN8/IX se construyó para expresar un único bucle de unión a microproteína contenido en un molde de 14 aminoácidos. La biblioteca TN8/IX usó una secuencia de molde de Xaa1-Xaa2-Xaa3-Cys-Xaa5- Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Xaa12-Xaa13-Xaa14. Los aminoácidos en la posición 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 y 14 en el molde se variaron para permitir cualquier aminoácido salvo cisteína (Cys).

La biblioteca TN12/I se construyó para expresar un único bucle de unión a microproteína contenido en un molde de 18 aminoácidos. La biblioteca TN12/I usó una secuencia de molde de Xaa1-Xaa2-Xaa3-Cys-Xaa5- Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Cys-Xaa16-Xaa17-Xaa18. Los aminoácidos en la posición 1, 2, 17 y 18 en el molde se variaron para permitir cualquier aminoácido seleccionado de un grupo de 12 aminoácidos. A, D, F, G, H, L, N, P, R, S, W o Y). Los aminoácidos en las posiciones 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 16 se variaron para permitir cualquier aminoácido salvo cisteína (Cys).

La biblioteca Lin20 se construyó para expresar un único péptido lineal en un molde de 20 aminoácidos. Los aminoácidos en cada posición en el molde se variaron para permitir cualquier aminoácido salvo cisteína (Cys).

Los polipéptidos de unión como se describe en el presente documento pueden incluir adiciones o truncamientos en los extremos N y/o C. Cabe esperar que dichos polipéptidos de unión modificados se unan a KDR o al complejo VEGF/KDR. Por ejemplo, el engarce -GGGK presente en el extremo N de algunos de los polipéptidos de unión proporcionados en el presente documento es un engarce opcional. Por tanto, los polipéptidos que tienen la misma secuencia, salvo sin las secuencias -GGGK terminales, siempre que se defina en las reivindicaciones también se abarcan en los agentes de la presente invención. Además, cabe esperar que los polipéptidos de unión que comprenden la porción en bucle de los moldes y secuencias como se ha descrito en el presente documento se unen a KDR o al complejo VEGF/KDR. La porción en bucle de los moldes y secuencias incluye las secuencias entre e incluidos los dos residuos de cisteína que cabe esperar que formen un enlace disulfuro, de modo que se genera una estructura de bucle peptídico. Además, los polipéptidos de unión de la presente invención pueden incluir residuos de aminoácidos adicionales en los extremos N y/o C.

Las bibliotecas de expresión en fagos se crearon fabricando una serie diseñada de mutaciones o variaciones dentro de una secuencia de codificación para el molde polipeptídico, codificando cada secuencia mutante un análogo peptídico correspondiente en estructura general al molde a excepción de que tiene una o más variaciones de aminoácidos en la secuencia del molde. El nuevo ADN variegado (mutado) proporciona una diversidad de secuencia y cada fago transformante muestra una variante de la secuencia de aminoácidos del molde inicial codificados por el ADN, que conduce a una población de fagos (biblioteca) que muestra un gran número de secuencias de aminoácidos diferentes pero relacionadas estructuralmente.

Como se ha indicado anteriormente, las técnicas tratadas en Kay y col., Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego, 1996) y el documento US 5.223.409 son particularmente útiles en la preparación de una biblioteca de aglutinantes potenciales correspondientes al molde parental seleccionado. Las bibliotecas a las que se ha hecho referencia anteriormente se prepararon de acuerdo con estas técnicas y se sometieron a detección selectiva de los polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR contra un agente inmovilizado, como se ha explicado en los ejemplos siguientes.

En una detección selectiva típica, se pone en contacto una biblioteca de fagos y se permite que se unan a la diana, o a un subcomponente concreto de la misma. Para facilitar la separación de los aglutinantes y no aglutinantes, es conveniente inmovilizar la diana sobre un soporte sólido. Los fagos portadores de un resto de unión a la diana forman un complejo con la diana sobre el soporte sólido, mientras que los fagos que no se unen permanecen en solución y se pueden lavar con exceso de tampón. Después, los fagos unidos se liberan de la diana cambiando el tampón a un pH extremo (pH 2 o pH 10), cambiando la fuerza iónica del tampón, añadiendo desnaturalizantes u otros medios conocidos. Para aislar el fago de unión que exhibe los polipéptidos como se usan en la presente invención se realizó una elución proteica, es decir se eluyó algunos fagos de la diana usando VEGF en solución (elución competitiva) y también, fagos de unión de afinidad muy alta que no podían eliminar por competición incubando con VEGF durante la noche se capturaron usando el fago todavía unido al sustrato para infección de las células *E. coli*.

El fago recuperado se puede amplificar después mediante infección de células bacterianas y se repite el proceso de detección selectiva con el nuevo grupo que ahora carece de no aglutinantes y está enriquecido en aglutinantes. La recuperación de incluso unos pocos fagos de unión es suficiente para completar el proceso. Después de unos pocos ciclos de selección, las secuencias génicas que codifican los restos de unión derivados de clones de fagos

seleccionados en el grupo de unión se determinan mediante métodos convencionales, que se describen más adelante, lo que revela la secuencia peptídica que imparte afinidad de unión del fago a la diana. Cuando el proceso de selección funciona, la diversidad de la secuencia de la población entra con cada ronda de selección hasta que permanecen los aglutinantes deseables. Las secuencias convergen en un número pequeño de aglutinantes relacionados, normalmente 10 - 50 de los más de 10 millones de candidatos originales de cada biblioteca. Un incremento en el número de fagos recuperados en cada ronda de selección y por supuesto, la recuperación de secuencias estrechamente relacionadas, son buenos indicadores de que la convergencia de la biblioteca se ha producido en un cribado. Después de identificar un conjunto de polipéptidos de unión, la información de la secuencia se puede usar para diseñar otras bibliotecas de fagos secundarias, sesgadas para los miembros que tienen propiedades deseadas adicionales.

La formación del bucle de unión disulfuro es ventajosa porque conduce a un incremento de la afinidad y la especificidad para dichos péptidos. No obstante, en suero, el enlace disulfuro se podría abrir mediante cisteínas libres u otras moléculas que contienen tiol. Por tanto, puede ser útil modificar los residuos de cisteína para sustituir la reticulación del disulfuro con otro enlace menos reactivo. La reticulación $-\text{CH}_2\text{-S-S-CH}_2-$ tiene una geometría preferida en la que el enlace diédrico entre azúfres es cercano a los 90 grados, pero la geometría exacta se determina mediante el contexto de otros grupos laterales y el estado de unión de la molécula. Modificaciones preferidas de la reticulación de cierre del bucle de unión conservarán las longitudes y los ángulos globales del enlace lo más posible. Dichas reticulaciones alternativas adecuadas incluyen enlaces tioéter tales como $-\text{CH}_2\text{-SCH}_2\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2-$; enlaces lactama tales como $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{-CO-NHCH}_2-$; enlaces éter tales como $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2-$; puentes de alquileo tales como $-(\text{CH}_2)_n-$ (en la que $n = 4, 5, \text{ o } 6$); el enlace $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-NH-CH}_2-$ y grupos similares conocidos en la técnica.

La síntesis directa de los polipéptidos como se usa en la invención se puede conseguir usando técnicas convencionales, incluida la síntesis peptídica en fase sólida, la síntesis en fase de solución etc. Se prefiere la síntesis en fase sólida. Véase Stewart y col., *Solid-Phase Peptide Synthesis* (W. H. Freeman Co., San Francisco, 1989); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963); Bodanszky y Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, Nueva York, 1984).

Los polipéptidos, como se usan en la invención, también se pueden preparar comercialmente a través de empresas que proporciona síntesis peptídica como servicio (p. ej., BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA). También se dispone de máquinas de síntesis peptídica automáticas, tales como las fabricadas por Perkin-Elmer Applied Biosystems.

El compuesto polipeptídico se purifica, preferentemente, una vez que se ha aislado o sintetizado mediante técnicas recombinantes o químicas. Con fines de purificación hay muchos métodos estándar que se pueden usar, incluida cromatografía líquida de alta presión y de fase inversa (RP-HPLC) usando una columna de sílice alquilada tal como sílice C_4 -, C_8 - o C_{18} . Generalmente se usa una fase móvil en gradiente de contenido orgánico creciente para alcanzar purificación, por ejemplo acetonitrilo en un tampón acuoso, que normalmente contiene una pequeña cantidad de ácido trifluoroacético. También se puede usar cromatografía de intercambio iónico para separar los péptidos en base a su carga. El grado de pureza del polipéptido se puede determinar mediante varios métodos, incluida la identificación de un gran pico principal en la HPLC. Se prefiere un polipéptido que produzca un único pico que sea al menos el 95 % del material de entrada en una columna HPLC. Incluso más preferible es un polipéptido que produzca un único pico que sea al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o incluso el 99,5 % o más del material de entrada en una columna HPLC.

Con el fin de garantizar que el péptido obtenido usando cualquiera de las técnicas descritas anteriormente es el péptido deseado para usar en composiciones de la presente invención se pueden llevar a cabo análisis de la composición peptídica. Dicho análisis de la composición se puede realizar usando espectrometría de masas de alta resolución para determinar el peso molecular del péptido. Como alternativa, el contenido en aminoácidos del péptido se puede confirmar hidrolizando el péptido en ácido acuoso y separando, identificando y cuantificando los componentes de la mezcla usando HPLC o un analizador de aminoácidos. También se pueden usar secuenciadores proteicos, que degradan secuencialmente el péptido e identifican los aminoácidos en orden, para determinar la secuencia del péptido.

Los polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR como se usan en la presente invención también se pueden producir usando técnicas de ADN recombinante, usando ácidos nucleicos (polinucleótidos) que codifican los polipéptidos como se usan en la presente invención y expresándolos después de forma recombinante, es decir manipulando células huésped mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico exógenas de modos conocidos para hacer que dichas células huésped produzcan los polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR deseados. Tales procedimientos entran dentro de la capacidad de los expertos en la técnica (véase Davis y col., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)). La producción recombinante de péptidos cortos, tales como los descritos en el presente documento, puede no ser práctica en comparación con la síntesis directa, no obstante, medios de producción recombinante pueden ser muy ventajosos cuando se incorpora un resto de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR de la presente invención en un polipéptido híbrido o proteína de fusión.

En la práctica de la presente invención, una determinación de la afinidad de resto de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR por KDR o el complejo VEGF/KDR respecto a otra proteína o diana es una medida útil y se denomina especificidad por KDR o por el complejo VEGF/KDR. Ensayos estándar para cuantificar la unión y determinar la afinidad incluyen diálisis en equilibrio, unión en equilibrio, filtración en gel o la monitorización de numerosos cambios espectroscópicos (tales como un cambio en la polarización de la fluorescencia) que puede ser el resultado de la interacción del resto de unión y su diana. Estas técnicas miden la concentración de ligando unido y libre como una función de la concentración del ligando (o proteína). La concentración del polipéptido unido ([Unido]) está relacionada con la concentración del polipéptido libre ([Libre]) y la concentración de los sitios de unión para el polipéptido, es decir sobre KDR o el complejo VEGF/KDR, (N), como se describe en la siguiente ecuación.

$$[\text{Unido}] = N \times [\text{Libre}] / ((1/K_a) + [\text{Libre}])$$

Una solución de los datos de esta ecuación da la constante de asociación, K_a , una medida cuantitativa de la afinidad de unión. La constante de asociación, K_a , es la recíproca de la constante de disociación, K_D . La K_D se notifica con mayor frecuencia en las mediciones de afinidad. Polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR preferidos tienen una K_D por KDR o al complejo VEGF/KDR en el intervalo de 1 nanomolar (nM) a 100 micromolar (μ M), que incluye los valores K_D de menos de 10 nM, menos de 20 nM, menos de 40 nM, menos de 60 nM, menos de 80 nM, menos de 1 μ M, menos de 5 μ M, menos de 1 μ M, menos de 20 μ M, menos de 40 μ M, menos de 60 μ M y menos de 80 μ M.

Cuando los polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR se usan como agentes de obtención de imágenes, otros aspectos de especificidad de unión pueden ser más importantes. Los agentes de obtención de imágenes operan en un sistema dinámico en el que la unión del agente obtención de imágenes a la diana (KDR o el complejo VEGF/KDR, por ejemplo en el endotelio activado) pueden no estar en un estado de equilibrio estable durante el procedimiento de obtención de imágenes. Por ejemplo, cuando el agente de obtención de imágenes se inyecta inicialmente, la concentración del agente de obtención de imágenes y del complejo agente-diana aumenta rápidamente. No obstante, poco después de la inyección, el agente de obtención de imágenes en circulación (libre) comienza a eliminarse por los riñones o el hígado y la concentración en plasma del agente de obtención de imágenes comienza a descender. Este descenso en la concentración del agente de obtención de imágenes libre en el plasma termina causando la disociación del complejo agente-diana. La utilidad de un agente de obtención de imágenes depende de la diferencia en la velocidad de disociación agente-diana respecto a la tasa de aclaramiento del agente. Idealmente, la velocidad de asociación será lenta en comparación con la tasa de aclaramiento, lo que tiene como resultado un largo tiempo de obtención de imágenes durante el que existe una elevada concentración del complejo agente-diana y una concentración baja del agente de obtención de imágenes libre (señal de fondo) en plasma.

La medición cuantitativa de las velocidades de disociación se puede realizar fácilmente usando varios métodos conocidos en la técnica, tal como fluorimetría de fibra óptica (véase, por ejemplo, Anderson & Miller, Clin. Chem., 34 (7): 1417-21 (1988)), resonancia de plasmón superficial (véase, Malmberg y col., J. Immunol. Methods, 198 (1): 51-7 (1996) y Schuck, Current Opinion in Biotechnology, 8: 498-502 (1997)), resonancia especular y guía de ondas planares acoplada a injerto (véase, por ejemplo, Hutchinson, Molec. Biotechnology, 3: 47-54 (1995)). Comercialmente se dispone de biosensores automáticos para medir la cinética de unión. Sensor de resonancia de plasmón superficial BIAcore (Biacore AB, Uppsala SE), sensor de resonancia especular IAsys (Fisons Applied Sensor Technology, Cambridge GB), sensor de guía de ondas planas acoplada a injerto BIOS-1 (Artificial Sensor Instruments, Zurich CH).

Métodos de detección selectiva de polipéptidos identificados mediante expresión en fagos por su capacidad para unirse a células que expresan la diana:

Además, se describen métodos de detección selectiva de polipéptidos de unión identificados mediante expresión en fagos según su capacidad para unirse a células que expresan la diana (y no a células que no expresan la diana). Estos métodos abordan un problema significativo asociado con la detección selectiva de péptidos identificados mediante expresión en fagos: Con frecuencia, los péptidos identificados de este modo no tienen una afinidad suficiente para la detección selectiva de la diana contra células que expresan la diana en ensayos convencionales. No obstante, determinar si un péptido identificado en fago concreto se une a las células que expresan la diana (y no se une a las células que no la expresan) es una información esencial para la identificación de péptidos de unión que son potenciales restos de unión in vivo. El método aprovecha el incremento de afinidad y de avidéz asociado con la unión multivalente y permite la detección selectiva de polipéptidos con bajas afinidades contra las células que expresan la diana.

El método generalmente consiste en la preparación y detección selectiva de construcciones multiméricas, incluidos uno o más polipéptidos de unión. Por ejemplo, los polipéptidos identificados mediante expresión en fagos como de unión a una diana se biotinilan y forman complejos con avidina, estreptavidina o neutravidina para formar construcciones tetraméricas. Estas construcciones tetraméricas se incuban después con células que expresan la diana deseada y las células que no lo hacen y se detecta la unión de la construcción tetramérica. La unión se puede detectar usando cualquier método de detección conocido en la técnica. Por ejemplo, para detectar la unión, la

avidina, estreptavidina o neutravidina se pueden conjugar a un marcador detectable (p. ej., un marcador radioactivo, un marcador fluorescente o un marcador enzimático que sufre un cambio de color, tal como HRP (peroxidasa de rábano), TMB (tetrametilbencidina) o fosfatasa alcalina.

5 Los péptidos biotinilados preferentemente forman complejos con neutravidina-HRP. La neutravidina exhibe menor unión inespecífica a las moléculas que las otras alternativas debido a la ausencia de restos carbohidratos de unión a lectinas y el dominio RYD de unión al receptor de adhesión celular en neutravidina. Véanse Hiller y col., *Biochem. J.*, 248:167-171 (1987); Alon y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170:1236-41 (1990).

10 Las construcciones tetraméricas se pueden someter a detección selectiva contra las células que expresan de forma natural la diana o las células que se han sometido a ingeniería mediante tecnologías de ADN recombinante para expresar la diana (p. ej., transfectantes, transformantes etc.). Si se usan las células que se han transfectado para expresar la diana, las células transfectadas de forma simulada (es decir, las células transfectadas sin el material genético que codifica la diana) se pueden usar como control.

15 Los complejos tetraméricos se pueden someter a detección selectiva opcionalmente en presencia de suero. Por tanto, el ensayo también puede usarse para evaluar rápidamente el efecto del suero sobre la unión de los péptidos a la diana.

20 Los métodos divulgados en el presente documento son particularmente útiles en la preparación y evaluación de combinaciones de distintos polipéptidos de unión para usar en construcciones dirigidas diméricas o multiméricas que contienen dos o más polipéptidos de unión. El uso de complejos de biotina/avidina permite una preparación relativamente fácil de las construcciones tetraméricas que contienen de uno a cuatro péptidos de unión diferentes. Además, ahora se ha descubierto que la afinidad y la aidez de una construcción dirigida se pueden aumentar
25 mediante la inclusión de dos o más restos dirigidos que se unen a diferentes epítomos en la misma diana. Los métodos de detección selectiva descritos en el presente documento son útiles en la identificación de combinaciones de polipéptidos de unión que pueden tener una mayor afinidad cuando se incluyen en dichas construcciones multiméricas.

30 Como se describe con más detalle en el ejemplo 5 más adelante, estos métodos se pueden usar para evaluar la unión específica de los polipéptidos de unión a KDR a las células que expresan KDR o que se han sometido a ingeniería para expresar KDR. Los complejos tetraméricos de los polipéptidos de unión a KDR biotinilados como se usa en la invención y neutravidina-HRP se pueden preparar y someter a detección selectiva contra células transfectadas para expresar KDR así como células transfectadas de forma simulada (sin ningún KDR).

35 Como se muestra en el ejemplo 5, el ensayo se puede usar para identificar los polipéptidos unión a KDR que se unen específicamente a las células que expresan KDR (y que no se unen a células que no expresan KDR), incluso cuando la Kd monodentada del polipéptidos es del orden de 200nM-300nM. El ensayo se puede usar para la detección selectiva de construcciones homotetraméricas que contienen cuatro copias de un único polipéptido de
40 unión a KDR como se usa en la invención, así como construcciones heterotetraméricas que contienen dos o más polipéptidos de unión a KDR diferentes. Los métodos descritos en el presente documento son particularmente útiles para evaluar combinaciones de polipéptidos de unión a KDR para usar en construcciones multiméricas, particularmente construcciones que contienen dos o más polipéptidos de unión a KDR que se unen a diferentes epítomos de KDR.

45 El ensayo también puede usarse para evaluar el efecto del suero rápidamente el efecto del suero en los polipéptidos de unión a KDR. De hecho, usando los métodos de detección selectiva divulgados en el presente documento, se identificaron polipéptidos de unión a KDR, tales como las SEC ID N1 5, 31 y 66 cuya unión no se ve afectada significativamente por el suero.

50 Sustitución de enlaces amida

Un tipo de modificación es sustituir los enlaces amida dentro de la estructura del polipéptido. Por ejemplo, para reducir o eliminar la proteólisis indeseada u otras vías de degradación que disminuyen la estabilidad en suero, lo que
55 tiene como resultado una reducción o anulación de la bioactividad o para restringir o incrementar la flexibilidad conformacional, es frecuente sustituir los enlaces amida dentro de la estructura de los péptidos con una funcionalidad que imite la conformación existente o altere la conformación del modo deseado. Dichas modificaciones pueden producir un incremento de la afinidad de unión o un mejor comportamiento farmacocinético. Se entiende que los que conocen la técnica de la síntesis peptídica pueden realizar los siguientes cambios del enlace amida para
60 cualquier enlace amida que conecta dos aminoácidos con la expectativa de que los péptidos resultantes puedan tener la misma o mejor actividad: Inserción de alfa-N-metilamidas o de tioamidas en la estructura de la amida peptídica, eliminación del carbonilo para producir las aminas secundarias afines, sustitución de un aminoácido con un aza-aminoácido para producir derivados de semicarbazona y uso de E-olefinas y E-olefinas sustituidas como sustitutos del enlace amida.

65 Modificaciones para mejorar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas

También se entiende que el uso del polipéptido de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR en una aplicación concreta puede requerir modificaciones del péptido o formulaciones del péptido para mejorar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico. Cabe esperar que las propiedades del péptido se puedan modificar mediante unión de los restos que se piensa que den lugar a las propiedades físicas o químicas deseadas. Dichos restos pueden añadirse al péptido usando ácidos o aminas, mediante enlaces amida o enlaces de urea, respectivamente, al extremo N o C del péptido, o al grupo amino colgante de una lisina o derivado de lisina localizada adecuadamente, ácido 2,3-diaminopropiónico, ornitina u otro aminoácido en el péptido que posee un grupo amina colgante o un grupo alcoxiamina o hidracina colgante. Los restos introducidos pueden ser grupos que son grupos aromáticos o alquilo hidrófilos, básicos o no polares dependiendo de péptido de interés y los requisitos existentes para la modificación de sus propiedades.

Glicosilación de los residuos de aminoácidos

Otra modificación más dentro del alcance de la invención es emplear residuos de aminoácidos glicosilados (p. ej., residuos de serina, treonina o asparragina), solos o en combinación en cualquiera de los restos de unión o del resto engarce o ambos. La glicosilación, que se puede llevar a cabo usando condiciones convencionales, se puede usar para potenciar la solubilidad, alterar la farmacocinética y la farmacodinámica o para potenciar la unión mediante una interacción específica o no específica que implica el resto glicosídico. En otro enfoque, los aminoácidos glicosilados tales como O-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosil) serina o el derivado análogo de treonina (los aminoácidos D o L) se pueden incorporar en el péptido durante la síntesis peptídica en fase sólida manual o automática o en síntesis peptídica en fase sólida manual o automática. De un modo similar se puede usar la D o L-N^r-(2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosilo)asparragina. Se ha previsto el uso de aminoácidos glicosilados en una función colgante de oxígeno, nitrógeno o azufre colgante mediante la agencia de restos de hidratos de carbono activados y adecuadamente funcionalizados que se pueden emplear en glicosilación. Dichas funciones de hidratos de carbono podrían ser monosacáridos, disacáridos o incluso ensamblajes más grandes de oligosacáridos (Kihlberg, Jan. (2000) Glycopeptide synthesis. En: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis -A Practical Approach (Chan, W.C. and White, P.D. Eds) Oxford University Press, Nueva York, NY Cap. 8, pág.195-213).

También se ha previsto la anexión de las funciones carbohidrato a los aminoácidos por otros medios distintos a la glicosilación mediante la activación de un grupo saliente del carbono anomérico. La unión del aminoácido al glicósido no se limita a la formación de un enlace con el carbono anomérico del la función carbohidrato. En su lugar, la unión del resto carbohidrato al aminoácido podría producirse a través de cualquier átomo de oxígeno, átomo de nitrógeno, átomo de carbono suficientemente reactivo u otro átomo colgante de la función carbohidrato mediante métodos empleados para la formación de enlaces C-heteroátomo, C-C o heteroátomo-heteroátomo (ejemplos son S-S, O-N, N-N, P-O, P-N) conocidos en la técnica.

Formación de sales

También entra dentro del alcance de la invención formar diferentes sales que pueden incrementar la solubilidad en agua o la facilidad de la formulación de estos péptidos. Estas pueden incluir, entre oteas, N-metilglucamina (meglumina), acetato, oxalatos, ascorbatos etc.

1.) Engarce oxima

El resto oxima se ha usado como engarce por los investigadores en una serie de contextos. De los más interesantes es el trabajo realizado por Mutter y col., (Wahl y Mutter, Tetrahedron Lett., 37:6861-6864 (1996)). Los aminoácidos 4 que contienen una función aminoalcohol y 5 que contienen una función alcoxi-amino se incorporan en la cadena peptídica, no necesariamente al final de la cadena peptídica (figura 23). Tras la formación del péptido se eliminan los grupos protectores de la cadena lateral. El grupo aldehído está desenmascarado y se forma un enlace oxima.

2.) Engarce de lantionina

Las lantioninas son sulfuros cíclicos en los que el enlace disulfuro (S-S) está sustituido por un enlace carbono-azufre (C-S). Por tanto, la labilidad a la reducción es mucho menor. Las lantioninas se han preparado mediante varios métodos desde 1971.

Engarces

Modificaciones adicionales dentro del alcance de la invención incluyen la introducción de engarces o espaciadores entre la secuencia diana del péptido de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR y el marcador detectable. El uso de estos engarces/espaciadores puede mejorar las propiedades relevantes del péptido de unión (p. ej., incrementar la estabilidad en el suero, etc.). Estos engarces pueden incluir, entre otros, cadenas alquilo sustituidas o insustituidas, derivados de polietilenglicol, espaciadores aminoácidos, azúcares o espaciadores alifáticos o aromáticos comunes en la técnica. Además, los engarces que son combinaciones de los restos descritos anteriormente también se pueden usar para conferir una ventaja especial a las propiedades del péptido. Las moléculas lipídicas con engarces

se pueden unir para permitir la formulación de burbujas de ultrasonidos, liposomas u otras construcciones basadas en agregación. Dichas construcciones podrían usarse como agentes para dirigir y liberar un indicador diagnóstico, un agente terapéutico (p. ej., "misil" químico para terapia) o una combinación de estos.

5 Construcciones multiméricas de polipéptidos de unión a KDR y VEGF/KDR

También se contemplan construcciones que usan dímeros, multímeros o polímeros de uno o más polipéptidos de unión a VEGF o VEGF/KDR como se usan en la invención. De hecho, existen muchas pruebas en la literatura de que la unión de péptidos o de moléculas pequeñas de baja potencia o se puede aumentar sustancialmente mediante la formación de dímeros y multímeros. Por tanto, el uso de construcciones diméricas y multiméricas (tanto homogéneas como heterogéneas) está dentro del alcance de la presente invención. De hecho, como se ha tratado con más detalle en los ejemplos, entra dentro del alcance de la presente invención incluir múltiples secuencias de polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR en una construcción dimérica o multimérica. Además, como se muestra en el ejemplo 4 más adelante, estas construcciones pueden exhibir una unión mejorada en comparación con una construcción monomérica. Las secuencias polipeptídicas en las construcciones diméricas se pueden unir por su extremo N o C o en el nitrógeno N-épsilon de un resto lisina colocado adecuadamente (u otra función portadora de un grupo derivable selectivamente tal como un grupo oxiamino colgante u otro nucleofílico) o se pueden unir mediante uno o más engarces que usan la química de unión adecuada. Esta química de acoplamiento puede incluir amida, urea, tiourea, oxima o aminoacetilamida (de derivados de cloro o bromoacetamida, pero no limitados a estos). Por ejemplo, se puede usar cualquiera de los métodos siguientes para preparar construcciones diméricas o multiméricas de KDR o del complejo VEGF/KDR como se usan en la invención.

Método A

Los péptidos de unión a KDR completamente protegidos se pueden crear en una resina de captura de seguridad de tipo EIman usando protocolos de síntesis peptídica de Fmoc automática o manual. Backes y col., J. Am. Chem. Soc., 118(12):3055-56 (1996). Por separado, usando métodos estándar conocidos en la técnica de la síntesis peptídica se puede construir un derivado de di-lisina sobre resina de 2-clorotritilo. Véanse, por ejemplo, Fields y col., "Principles and Practice of Solid Phase Synthesis" in Synthetic Peptides, A Users Guide, Grant, Ed. (W.H. Freeman Co., Nueva York, 1992), Cap. 3, pág. 77-183; Barlos y col., "Convergent Peptide Synthesis" in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Chan, W.C. and White, P.D., Eds. (Oxford University Press, Nueva York, 2000), Capt. 9, pág. 215-228. La liberación de este de la resina de 2-clorotritilo sin eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral, activación del grupo carboxilo y acoplamiento a cualquier grupo de marcaje funcionalizado con amina proporciona un derivado de di-lisina cuyos átomos de nitrógeno colgantes protegidos pueden desenmascarse para dar dos grupos amino libres. La resina de captura de seguridad mencionada anteriormente se activa y el derivado de di-lisina funcionalizado con un grupo de marcaje N-desprotegido deseado se añade a la resina de captura de seguridad activada. Los grupos amino colgantes se acilan mediante el extremo carboxi del péptido unido a la resina de captura de seguridad que ahora se suelta de la resina y una parte integral de la estructura de la di-lisina. Se puede usar un exceso del péptido unido a la resina de captura de seguridad para garantizar una reacción completa de los grupos amino de la construcción de di-lisina. La optimización de la proporción de las parejas de reacción en este esquema optimiza el rendimiento. Los grupos protectores en los péptidos de unión a KDR se eliminan usando protocolos de escisión a base de ácido trifluoroacético.

La síntesis de construcciones diméricas y multiméricas en las que dos o más péptidos de unión a KDR están presentes en una construcción se consigue con facilidad. Se pueden usar esquemas de protección ortogonal (tales como un grupo aliloxycarbonilo en un nitrógeno y un grupo Fmoc en el otro o usando el grupo Fmoc junto con el grupo protector t-Bu en el otro, por ejemplo) para distinguir los átomos de nitrógeno colgantes de los derivados de di-lisina descritos anteriormente. Desenmascarar uno de los grupos amino, seguido de la reacción del producto resultante con un péptido de unión a KDR unido a la resina de captura de seguridad como se ha descrito anteriormente proporciona una construcción de di-lisina que tiene un único péptido de unión a KDR unido. La eliminación del segundo grupo protector desenmascara el nitrógeno que queda. Véase también, Mellor y col., "Synthesis of Modified Peptides" in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Chan, W.C. and White, P.D., Eds. (Oxford University Press, Nueva York, 2000), Capt. 6, pág. 169-176. El producto resultante se puede hacer reaccionar con una segunda resina de captura de seguridad portadora de otro péptido de unión a KDR para proporcionar una construcción homodimérica completamente protegida que, después de la eliminación de los grupos protectores con ácido trifluoroacético, proporciona el material deseado.

Método B

Un péptido de unión a KDR se ensambla en una resina de Rink-amida mediante métodos de acoplamiento peptídico automáticos o manuales que normalmente emplean protocolos de síntesis peptídica de Fmoc. El péptido puede poseer un extremo C o un extremo N funcionalizado con un engarce o una construcción de engarce-grupo de marcaje que puede poseer un grupo nucleofílico adicional tal como el grupo ϵ -amino de un resto lisina, por ejemplo. La escisión de los grupos protectores se consigue usando ácido trifluoroacético con los modificadores adecuados dependiendo de la naturaleza del péptido. El péptido completamente desprotegido se hace reaccionar con un gran exceso de un electrófilo bifuncional, tal como el bis-N-hidroxisuccinimida éster de ácido glutárico disponible

comercialmente (Tyger Scientific, Inc.). El éster de mono-N-hidroxisuccinimidilo monoamidado resultante de ácido glutárico se trata después con un equivalente adicional del mismo péptido, o un equivalente de un péptido de unión a KDR diferente. La purificación del material resultante mediante HPLC da la construcción homodimérica deseada portadora de un grupo marcador adecuado.

5 Método C

Se puede usar un esquema modular para preparar construcciones diméricas o multiméricas superiores portadores de grupos marcadores adecuados como se ha definido anteriormente. En una sencilla ilustración, la resina fmoc-lisina (IC-Dde) de Rink se trata con piperidina para eliminar el resto fmoc. Después, una función marcadora, tal como biotina, 5-carboxifluoresceína o N,N-dimetil-Gly-Ser(O-t-Bu)-Cys(Acm)-Gly-OH está acoplada al átomo de nitrógeno. Después, la resina se trata con hidracina para eliminar el grupo iV-Dde. Después de un lavado exhaustivo, la resina se trata con cloruro cianúrico y una base impedida tal como diisopropiletilamina en un disolvente adecuado, tal como DMF, NMP o diclorometano, para proporcionar una diclorotriazina monofuncionalizada unida a la resina. El desplazamiento sucesivo posterior de los átomos de cloro que quedan por dos equivalentes de un péptido de unión a KDR proporciona una construcción funcionalizada con grupo marcador homodimérico unido a la resina. Falorni y col., Tetrahedron Lett., 39(41):7607-7610 (1998); Johnson y col., Tetrahedron Lett., 54(16):4097-4106 (1998); Stankova y col., Mol. Diversity, 2(1/2):75-80 (1996). Los péptidos entrantes pueden estar protegidos o desprotegidos según la situación lo justifique. La escisión de los grupos protectores se consigue usando reactivos de desprotección basados en ácido trifluoroacético como se ha descrito anteriormente y los materiales deseados se purifican mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

Se entiende que en cada uno de estos métodos se puede usar en serie derivados de lisina para aumentar la multiplicidad de los multímeros. El uso de moléculas relacionadas más rígidas portadoras del número requerido de átomos de nitrógeno enmascarados o protegidos ortogonalmente para que actúen como armazones para variar la distancia entre los péptidos de unión a KDR, para incrementar la rigidez de la construcción (restringiendo el movimiento y las posiciones relativas de los péptidos de unión a KDR unos respecto de otros y el indicador) está enteramente dentro del alcance de los métodos A-C y todos los demás métodos descritos en el presente documento.

30 Usos de polipéptidos de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR

Los restos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR de acuerdo con la presente invención son extremadamente útiles para la obtención de imágenes de KDR o al complejo VEGF/KDR in vitro o in vivo y particularmente, para la obtención de imágenes de sitios de angiogénesis, en los que el VEGF y el KDR están íntimamente implicados, como se ha explicado anteriormente.

In vitro:

Para la detección de KDR o al complejo VEGF/KDR en solución, un polipéptido de unión como se usa en la invención se puede marcar de forma detectable, después poner en contacto con la solución y después, se puede detectar la formación de un complejo entre el polipéptido de unión y la diana KDR o al complejo VEGF/KDR.

In vivo:

45 OBTENCIÓN DE IMÁGENES DIAGNÓSTICAS

Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención se usan para crear imágenes visualmente legibles de tejido que expresa KDR, tal como, por ejemplo, tumores neoplásicos, que requieren angiogénesis para supervivencia y metástasis, u otros sitios de actividad angiogénica. Los polipéptidos de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR divulgados en el presente documento se pueden convertir en reactivos de formación de imágenes conjugando los polipéptidos con un marcador adecuado para detección diagnóstica, opcionalmente con un engarce. Preferentemente, un péptido que exhibe especificidad mucho mayor para KDR o el complejo VEGF/KDR que para otras proteínas séricas se conjuga o une a un marcador adecuado para la metodología de detección que se va a usar. Por ejemplo, el polipéptido de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR se puede conjugar con o sin un engarce a un agente de contraste de ultrasonidos (p. ej., una microburbuja estabilizada, un agente de contraste para ultrasonidos, una microesfera o lo que se ha denominado un "liposoma" lleno de gas) adecuado para la detección con ultrasonidos.

Los engarces adecuados pueden ser cadenas alquilo sustituido o insustituido, cadenas de aminoácidos (p. ej., poliglicina), polietilenglicoles, poliamidas y otros simples engarces poliméricos conocidos en la técnica.

En general, la técnica de usar un resto de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR marcado de forma detectable se basa en la condición de que el marcador genera una señal que se puede detectar fuera del cuerpo del paciente. Por ejemplo, cuando el resto de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR marcado de forma detectable se administra al paciente en el que es deseable detectar, por ejemplo, angiogénesis, la elevada afinidad del resto de unión a KDR o

al complejo VEGF/KDR hace que el resto de unión se una al sitio de la angiogénesis y se acumule en el sitio de la angiogénesis. Se permite suficiente tiempo para que el resto de unión marcado localice en el sitio de la angiogénesis. La señal generada por el péptido marcado se detecta mediante un dispositivo de barrido que variará de acuerdo con el tipo marcador usado y la señal se convierte después en una imagen del sitio de la angiogénesis.

5

OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE ULTRASONIDOS

10 Cuando los ultrasonidos se transmiten a través de una sustancia, las propiedades acústicas de la sustancia dependerán de la velocidad de las transmisiones y la densidad de la sustancia. Los cambios en las propiedades acústicas serán más prominentes en la interfaz de diferentes sustancias (sólidos, líquidos, gases). Los agentes de contraste de ultrasonidos son reflectoras de ondas de sonido intensas por las diferencias acústicas entre el agente y el tejido circundante. Los agentes de contraste de ultrasonidos que contienen gas o que generan gas son particularmente útiles por la diferencia acústica entre el agente de contraste de ultrasonidos líquido (p. ej., sangre) y que contiene gas o que genera gas. Por su tamaño, los agentes de contraste de ultrasonidos que comprenden 15 microburbujas, agentes de contraste de ultrasonidos y similares pueden permanecer durante más tiempo en la circulación sanguínea tras la inyección que el de otros restos detectables; por tanto, un agente de ultrasonidos dirigido a KDR o específico del complejo VEGF/KDR puede demostrar una obtención de imágenes de sitios de angiogénesis superior.

20 El resto de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR está unido a un material que es útil para la obtención de imágenes de ultrasonidos. Por ejemplo, los polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR pueden estar unidos a materiales usados para formar vesículas (p. ej., microburbujas, agentes de contraste de ultrasonidos, microesferas etc.) o emulsiones que contienen un líquido o gas que funciona como el marcador detectable (p. ej., un gas ecogénico o material capaz de generar un gas ecogénico). Materiales para la preparación de dichas vesículas 25 incluyen tensioactivos, lípidos, esfingolípidos, oligolípidos, fosfolípidos, proteínas, polipéptidos, hidratos de carbono y materiales poliméricos sintéticos o naturales. Véase, por ejemplo, los documentos WO 98/53857, WO 98/18498, WO 98/18495, WO 98/18497, WO 98/18496 y WO 98/18501.

30 Para los agentes de contraste que comprenden suspensiones de microburbujas estabilizadas (una realización preferida) se prefieren fosfolípidos y fosfolípidos particularmente saturados. Las microburbujas rellenas de gas preferidas de la invención se pueden preparar por medios conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante un método descrito en una cualquiera de las patentes siguientes: EP 554213, US 5.413.774, US 5.578.292, EP 744962, EP 682530, US 5.556.610, US 5.846.518, US 6.183.725, EP 474833, US 5.271.928, US 5.380.519, US 5.531.980, US 5.567.414, US 5.658.551, US 5.643.553, US 5.911.972, US 6.110.443, US 6.136.293, 35 EP 619743, US 5.445.813, US 5.597.549, US 5.686.060, US 6.187.288 y US 5.908.610. En una realización preferida, al menos uno de los restos de fosfolípidos tiene la estructura 18 o 19 (figura 24) y se describe en el documento US 5.686.060.

40 Ejemplos de fosfolípidos adecuados incluyen ésteres de glicerol con una o dos moléculas de ácidos grasos (la misma o diferente) y ácido fósfórico, en el que el residuo de ácido fósfórico está a su vez unido a un grupo hidrófilo, tal como colina, serina, inositol, glicerol, etanolamina y grupos similares. Los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos son, en general, ácidos alifáticos de cadena larga, que normalmente contienen de 12 a 24 átomos de carbono, preferentemente de 14 a 22, que pueden estar saturados o pueden contener una o más saturaciones. Ejemplos de ácidos grasos adecuados son ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido 45 araquídico, ácido behénico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. En la técnica también se conocen monoésteres de fosfolípidos como las formas "liso" de los fosfolípidos.

Otros ejemplos de fosfolípidos son los ácidos fosfatídicos, es decir los diésteres de ácido glicerol-fosfórico con ácidos grasos, esfingomielinas, es decir los análogos de fosfatidilcolina en los que el residuo de glicerol diéster con 50 ácidos grasos está sustituido con una cadena de ceramida, cardiolipinas, es decir los ésteres de 1,3-difosfatodoliglicerol con un ácido graso, gangliósidos, cerebrósidos, etc. Como se usa en el presente documento, el término fosfolípidos incluye productos naturales o preparados de forma sintética o semisintética que se pueden usar de forma individual o como mezclas. Ejemplos de fosfolípidos naturales son lecitinas naturales (derivados de fosfatidilcolina (PC)), tales como, normalmente, lecitinas de soja o de yema de huevo.

55 Ejemplos de fosfolípidos semisintéticos son los derivados parcial o completamente hidrogenados de las lecitinas naturales.

60 Ejemplos de fosfolípidos sintéticos son, por ejemplo, dilauriloil-fosfatidilcolina ("DLPC"), dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPG"), dipalmitoil-fosfatidilcolina ("DPPC"), diaracidoilfosfatidilcolina ("DAPC"), distearoilfosfatidilcolina ("DSPC"), 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina ("MPPC"), 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina ("PMPC"), 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina ("PSPC"), 1-estearoil-2-palmitoil-fosfatidilcolina ("SPPC"), dioleoilfosfatidilcolina ("DOPC"), 1,2 Distearoil-sn-glicero-3-Etilfosfocolina (Etil-DSPC), dilauriloil-fosfatidilglicerol ("DLPG") y sus sales de metales alcalinos, diaracidoilfosfatidilglicerol ("DAPG") y sus sales de metales alcalinos, dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG") 65 y sus sales de metales alcalinos, dipalmitoil-fosfatidilglicerol ("DPPG") y sus sales de metales alcalinos, diestearoilfosfatidilglicerol ("DSPG") y sus sales de metales alcalinos, dioleoilfosfatidilglicerol ("DOPG") y sus sales

de metales alcalinos, ácido dimiristoilfosfatídico ("DMPA") y sus sales de metales alcalinos, ácido dipalmitoilfosfatídico ("DPPA") y sus sales de metales alcalinos, ácido distearoilfosfatídico ("DSPA"), ácido diaracidoilfosfatídico ("DAPA") y sus sales de metales alcalinos, dimiristoilfosfatidil-etanolamina ("DMPE"), dipalmitoilfosfatidil-etanolamina ("DPPE"), distearoilfosfatidil-etanolamina ("DSPE"), dimiristoilfosfatidilserina ("DMPS"), diaracidoilfosfatidilserina ("DAPS"), dipalmitoilfosfatidilserina ("DPPS"), distearoilfosfatidilserina ("DSPS"), dioleoilfosfatidilserina ("DOPS"), dipalmitoilesfingomielina ("DPSP") y distearoilesfingomielina ("DSSP").

Otros fosfolípidos preferidos incluyen dipalmitoilfosfatidilcolina, ácido dipalmitoilfosfatídico y dipalmitoilfosfatidilserina. Las composiciones también pueden contener PEG-4000 y/o ácido palmítico. Cualquiera de los gases divulgados en el presente documento o conocidos para el experto en la técnica se puede usar; no obstante, se prefieren los gases inertes, tales como SF₆ o fluorocarbonos como CF₄, C₃F₈ y C₄F₁₀,

Las suspensiones de microburbujas preferidas de la presente invención se pueden preparar a partir de fosfolípidos usando procesos conocidos tales como liofilización o secado mediante pulverización de los fosfolípidos brutos en un disolvente adecuado o usando los procesos expuestos en los documentos EP 554213; US 5.413.774; US 5.578.292; EP 744962; EP 682530; US 5.556.610; US 5.846.518; US 6.183.725; EP 474833; US 5.271.928; US 5.380.519; US 5.531.980; US 5.567.414; US 5.658.551; US 5.643.553; US 5.911.972; US 6.110.443; US 6.136.293; EP 619743; US 5.445.813; US 5.597.549; US 5.686.060; US 6.187.288; y US 5.908.610. Más preferentemente, los fosfolípidos se disuelven en un disolvente orgánico y la solución se seca sin pasar por una etapa de formación de liposoma. Esto se puede realizar disolviendo los fosfolípidos en un disolvente orgánico adecuado junto con una sustancia estabilizante hidrófila o un compuesto soluble tanto en el disolvente orgánico como en agua y liofilizando o secando por pulverización la solución. En esta realización, los criterios usados para la selección del estabilizante hidrófilo es su solubilidad en el disolvente orgánico de elección. Ejemplos de compuestos estabilizantes hidrófilos solubles en agua y el disolvente orgánico son, por ejemplo, un polímero, como polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), polietilenglicol (PEG) etc., ácido málico, ácido glicólico, maltol y similares. Dichos compuestos hidrófilos también pueden ayuda a homogeneizar la distribución por tamaño de las microburbujas y potenciar la estabilidad durante el almacenamiento. Se puede usar cualquier disolvente orgánico siempre que su punto de ebullición sea lo bastante bajo y su punto de fusión se lo bastante alto para facilitar el posterior secado. Disolventes orgánicos típicos incluyen, por ejemplo, dioxanos, ciclohexanol, butanol terciario, tetraclorodifluoroetileno (C₂Cl₄F₂) o 2-metil-2-butanol. Se prefiere 2-metil-2-butanol y C₂Cl₄F₂.

Antes de la formación de la suspensión de microburbujas mediante dispersión en un vehículo acuoso, los polvos de fosfolípidos liofilizados o secados por pulverización se ponen en contacto con aire o con otro gas. Cuando se pone en contacto con el vehículo acuoso, los fosfolípidos en polvo cuya estructura se ha alterado formarán segmentos lamelarizados o laminarizados que estabilizarán las microburbujas del gas disperso en las mismas. Este método permite la producción de suspensiones de microburbujas que son estables incluso cuando se almacenan durante periodos prolongados de tiempo y se obtienen mediante simple disolución de los fosfolípidos laminarizados secados (que se han almacenado en un gas deseado) sin agitación ni ninguna agitación violenta.

Como alternativa, las microburbujas se pueden preparar suspendiendo un gas en una solución acuosa a una velocidad de agitación elevada, como se divulga en, por ejemplo, el documento WO 97/29783. Otro proceso para preparar microburbujas se divulga en la solicitud de patente europea nº 03002373 en tramitación conjunta, que comprende preparar una emulsión de un disolvente orgánico en un medio acuoso en presencia de un fosfolípido y después, liofilizar dicha emulsión después de etapas opcionales de lavado y/o filtración.

Aditivos conocidos para los expertos en la técnica se pueden incluir en las suspensiones de microburbujas estabilizadas. Por ejemplo, se pueden añadir tensioactivos no formadores de película, incluidos polioxipropilenglicol y polioxietilenglicol y compuestos similares, así como varios copolímeros de los mismos; ácidos grasos tales como ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico o sus derivados, ergosterol, fitosterol, sitosterol, lanosterol, tocoferol, propilgalato, palmitato de ascorbilo e hidroxitolueno butilado. La cantidad de estos tensioactivos no formadores de película normalmente es de hasta 50 % en peso de la cantidad total de tensioactivos, pero, preferentemente, entre 0 y 30 %.

Otras suspensiones que contienen gases incluyen las divulgadas en, por ejemplo, los documentos US 5.798.091, WO 97/29783, también EP 881 915. Estos agentes se pueden preparar como se describe en los documentos US 5.798.091 o WO 97/29783.

Otro agente de contraste para ultrasonidos preferido comprende agentes de contraste de ultrasonidos. El término "microglobo" se refiere a cuerpos rellenos de gas con un límite material o cubierta. Más sobre las formulaciones y métodos de preparación de microglobos se pueden encontrar en los documentos EP 324 938 (US 4.844.882); US 5.711.933; US 5.840.275; US 5.863.520; US 6.123.922; US 6.200.548; US 4.900.540; US 5.123.414; US 5.230.882; US 5.469.854; US 5.585.112; US 4.718.433; US 4.774.958; WO 95/01187; US 5.529.766; US 5.536.490; y US 5.990.263.

Los microglobos preferidos tienen una cubierta que incluye un polímero biodegradable fisiológicamente compatible o un lípido sólido biodegradable. Los polímeros útiles para la preparación de los microglobos de la presente invención

se pueden seleccionar de los polímeros biodegradables fisiológicamente compatibles, tales como cualquiera de los descritos en cualquiera de las patentes siguientes: EP 458745, US 5.711.933, US 5.840.275, EP 554213, US 5.413.774 y US 5.578.292. En particular, el polímero puede seleccionarse de polímeros biodegradables fisiológicamente compatibles, tales como polisacáridos de baja solubilidad en agua, poliláctidas y poliglicólidos y sus copolímeros, copolímeros de láctidas y lactomas tales como ϵ -caprolactona, γ -valerolactona y polipéptidos. Otros polímeros adecuados incluyen poli(orto)ésteres (véase, por ejemplo, los documentos US 4.093.709; US 4.131.648; US 4.138.344; US 4.180.646); ácido poliláctico y ácido poliglicólico y sus copolímeros, por ejemplo DEXON (véase J. Heller, Biomaterials 1 (1980), 51; poli(DL-láctida-co- ϵ -caprolactona), poli(DL-láctida-co- γ -valerolactona), poli(DL-láctida-co- γ -butirolactona), polialquilcianoacriatis; poliamidas, polihidroxibutirato; polidioxanona; poli- β -aminocetonas (A. S. Angeloni, P. Ferruti, M. Tramontini y M. Casolaro, The Mannich bases in polymer synthesis: 3. Reduction of poly(beta-aminoketone)s to poly(gamma-aminoalcohol)s and their N-alkylation to poly(gamma-hydroxyquaternary ammonium salt)s, Polymer 23, pp 1693-1697, 1982.); polifosfacenos (Allcock, Harry R. Polyphosphazenes: new polymers with inorganic backbone atoms (Science 193(4259), 1214-19 (1976)) y polianhídridos. Los microglobos de la presente invención también se pueden preparar de acuerdo con los métodos del documento WO -A-96/15815, en el que los microglobos están hechos de una membrana biodegradable que comprende lípidos biodegradables, preferentemente seleccionados de mono, di, tri-glicéridos, ácidos grasos, esteroides, ceras y mezclas de los mismos. Lípidos preferidos son di o triglicéridos, por ejemplo di o tri-miristina, -palmitina o estearona, en particular tripalmitina o triestearina. Los microglobos pueden usar cualquiera de los gases divulgados en el presente documento o conocidos para el experto en la técnica; no obstante, se prefieren los gases inertes, tales como los gases fluorados. Los microglobos se pueden suspender en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable con aditivos opcionales conocidos por los expertos en la técnica y estabilizantes.

Otras formulaciones de agentes de contraste que contienen gas incluyen micropartículas (especialmente agregados de micropartículas) que tienen gas contenido en las mismas o asociado con las mismas (por ejemplo, que se han adsorbido sobre la superficie de las mismas y/o contenido dentro de huecos, cavidades o poros de las mismas). Métodos para la preparación de estos agentes son como se ha descrito en los documentos EP 0122624; EP 0123235; EP 0365467; US 5.558.857; US 5.607.661; US 5.637.289; US 5.558.856; US 5.137.928; WO 95/21631 o WO 93/13809.

Todas estas composiciones para ultrasonidos deberán ser, lo más posible, isotónicas con la sangre. Por tanto, antes de la inyección se pueden añadir pequeñas cantidades de agentes isotónicos a cualquiera de las suspensiones de agente de contraste para ultrasonidos. Los agentes isotónicos son soluciones fisiológicas de uso habitual en medicina y comprenden solución salina acuosa (NaCl al 0,9 %), solución de glicerol 2,6 %, 5 % de solución de dextrosa etc. Adicionalmente, las composiciones para ultrasonidos pueden incluir aditivos estándar farmacéuticamente aceptables, incluidos, por ejemplo, agentes emulsionantes, viscosidad, modificadores, crioprotectores, lioprotectores, agentes espesantes etc.

Se puede usar cualquier gas biocompatible en los agentes de contraste para ultrasonidos útiles en la invención. El término "gas", como se usa en el presente documento, incluye cualquier sustancia (incluidas mezclas) sustancialmente en forma gaseosa a la temperatura normal del cuerpo humano. Por tanto, el gas puede incluir, por ejemplo, aire, nitrógeno, oxígeno, CO₂, argón, xenón o criptón, gases fluorados (incluidos, por ejemplo, perfluorocarbonos, SF₆, SeF₆), un hidrocarburo de bajo peso molecular (p. ej., que contiene de 1 a 7 átomos de carbono), por ejemplo un alcano tal como metano, etano, propano, butano, o pentano, o cicloalcano tal como ciclopropano, ciclobutano o ciclopenteno, un alqueno tal como etileno, propeno, propadieno o buteno, o una alquina tal como acetileno o propino y/o mezclas de los mismos. No obstante, se prefieren los gases fluorados. Los gases fluorados incluyen materiales que contienen al menos un átomo de flúor tal como SF₆, freones (compuestos orgánicos que contienen uno o más átomos de carbono y flúor, es decir, CF₄, C₂F₆, C₃F₈, C₄F₈, C₄F₁₀, CBrF₃, CClF₂, C₂ClF₅ y CBrClF₂) y perfluorocarbonos. El término perfluorocarbono se refiere a compuestos que solo contienen átomos de carbono y de flúor e incluye, en concreto, perfluorocarbonos saturados, insaturados y cíclicos. Los perfluorocarbonos saturados, que normalmente se prefieren, tienen la fórmula C_nF_{n+2}, en la que n es de 1 a 12, preferentemente de 2 a 10, más preferentemente de 3 a 8 e incluso más preferentemente de 3 a 6.

Perfluorocarbonos adecuados incluyen, por ejemplo, CF₄, C₂F₆, C₃F₈, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₂, C₆F₁₂, C₇F₁₄, C₈F₁₈ y C₉F₂₀. Más preferentemente, el gas o mezcla de gases comprende SF₆ o un Perfluorocarbono seleccionado del grupo que consiste en C₃F₈, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₂, C₆F₁₂, C₇F₁₄, C₈F₁₈, siendo C₄F₁₀ particularmente preferido. Véase también los documentos WO 97/29783, WO 98/53857, WO 98/18498, WO 98/18495, WO 98/18496, WO 98/18497, WO 98/18501, WO 98/05364, WO 98/17324.

En ciertas circunstancias puede ser deseable incluir un precursor de una sustancia gaseosa (p. ej., un material que es capaz de convertirse en un gas *in vivo*, a menudo denominado "precursor de gas"). Preferentemente, el precursor de gas y el gas que produce son fisiológicamente aceptables. El precursor de gas puede activarse por pH, fotoactivarse, activarse por temperatura etc. Por ejemplo, ciertos perfluorocarbonos se pueden usar como precursores de gas activados por temperatura. Estos perfluorocarbonos, tales como perfluoropentano, tienen una temperatura de transición a fase líquida/gas por encima de la temperatura ambiente (o la temperatura a la que los agentes se producen y/o se almacenan), pero por debajo de la temperatura corporal; por tanto, sufren un cambio de fase y se convierten en un gas dentro del cuerpo humano-

Como se ha comentado, el gas puede comprender una mezcla de gases. Las siguientes combinaciones son mezclas de gases particularmente preferidas: una mezcla de gases (A) y (B) en la que al menos uno de los gases (B), presente en una cantidad de entre 0,5 - 41 % en vol., tiene un peso molecular superior a 80 dalton y es un gas fluorado y (A) se selecciona del grupo que consiste en aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono y mezclas de los mismos, siendo el equilibrio de la mezcla gas A.

Dado que las vesículas de ultrasonidos pueden ser más grandes que los otros marcadores detectables descritos en el presente documento, pueden estar unidos o conjugados a una pluralidad de polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR con el fin de aumentar la eficiencia por la diana del agente. La unión a los agentes de contraste de ultrasonidos descritos anteriormente (o conocidos por los expertos en la técnica) puede ser mediante enlace covalente directo entre el polipéptido de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR y el material usado para fabricar la vesícula o mediante un engarce, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, véase el documento WO 98/53857 generalmente para una descripción de la unión de un péptido a un engarce de PEG bifuncional, que después se hace reaccionar con una composición de liposomas. Véase también Lanza y col., *Ultrasound in Med. & Bio.*, 23(6):863-870 (1997).

Se pueden usar numerosos métodos para preparar suspensiones de microburbujas conjugadas a polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR. Por ejemplo, se puede preparar microburbujas derivatizadas de maleimida incorporando 5 % (p/p) de N-MPB-PE (1, 2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-4-(p-maleimido-fenilbutiramida), (Avanti Polar-Lipids, Inc) en la formulación de fosfolípidos. Después, las soluciones de péptidos de unión a KDR mercaptoacetilados (10 mg/ml en DMF), que se han incubado en solución de desacetilación (fosfato sódico 50 mM, EDTA 25 Mm, hidroxilamina.HCl 0,5M, pH 7,5) se añaden a la suspensión de microburbujas activadas por maleimida. Tras incubación en oscuridad, en agitación suave, las microburbujas conjugadas a péptidos se pueden purificar mediante centrifugación.

Los compuestos que se pueden usar para derivatización de microburbujas normalmente incluyen los componentes siguientes: (a) una porción hidrofóbica compatible con el material que forma la cubierta de la microburbuja o del microglobo, con el fin de permitir una incorporación eficaz del compuesto en la cubierta de la vesícula; dicha porción normalmente está representada por un resto lipídico (dipamitina, diestearoilo); y (b) un espaciador (normalmente PEG de diferentes pesos moleculares), que pueden ser opcionales en algunos casos (p. ej., las microburbujas pueden presentar dificultades para liofilizar si el espaciador es demasiado largo) o preferirse en algunos otros (p. ej., los péptidos pueden ser menos activos cuando se conjugan con un microglobo con espaciadores cortos) y (c) un grupo reactivo capaz de reaccionar con un resto de reacción correspondiente en el péptido que se va a conjugar (p. ej., maleimido con el grupo -SH de la cisteína).

Como alternativa, el polipéptido de unión a KDR conjugado con microburbujas puede prepararse usando biotina/avidina. Por ejemplo, las microburbujas conjugadas con avidina se pueden preparar usando una suspensión de microburbujas de fosfolípidos activadas con maleimida, preparadas como se ha descrito anteriormente, que se añaden a avidina mercaptoacetilada (que se ha incubado con solución de desacetilación). Los péptidos biotinilados de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR (preparados como se describe en el presente documento) se añaden después a la suspensión de microburbujas conjugadas con avidina, dando una suspensión de microburbujas conjugadas con péptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR.

A menos que contenga un gas hiperpolarizado, que se sabe que requiere condiciones de almacenamiento especiales, el residuo liofilizado se puede almacenar y transportar sin necesidad de controlar la temperatura de su entorno y en particular, se puede suministrar a hospitales y médicos para formular en el sitio en una suspensión administrable lista para usar sin que requiera que estos usuarios tengan instalaciones especiales de almacenamiento. Preferentemente, en este caso se puede suministrar en forma de un kit de dos componentes que pueden incluir dos contenedores aparte o un contenedor de doble cámara. En el primer caso, preferentemente, el contenedor es un vial sellado dividido convencional, en el que el vial que contienen el residuo liofilizado de la etapa b) se sella con un tabique a través del que se puede inyectar el vehículo líquido usando una jeringuilla preferentemente precargada. En este caso, la jeringuilla usada como contenedor del segundo componente también se usa para inyectar el agente de contraste después. En el último caso, preferentemente, el contenedor de doble cámara es una jeringuilla de doble cámara y una vez que el liofilizado se ha reconstituido y después se ha mezclado adecuadamente o agitado suavemente, el contenedor se puede usar directamente para inyectar el agente de contraste. En ambos casos se proporcionan medios para dirigir o permitir la aplicación de suficientes burbujas que forman energía en los contenidos del contenedor. No obstante, como se ha indicado anteriormente, en los agentes de contraste estabilizados de acuerdo con la invención, el tamaño de las microburbujas de gas es sustancialmente independiente de la cantidad de energía de agitación aplicada al producto desecado reconstituido. De acuerdo con esto, en general no se requiere más que la suave agitación manual para dar productos reproducibles con un tamaño de microburbuja consistente.

Un experto en la técnica apreciará que otros dos sistemas de reconstitución de doble cámara capaces de combinar el polvo desecado con la solución acuosa de un modo estéril también entran dentro del alcance de la presente invención. En dichos sistemas, es particularmente ventajoso si la fase acuosa se puede interponer entre el gas

insoluble en agua y el ambiente, para incrementar el almacenamiento del producto. Cuando un material necesario para formar el agente de contraste ya no está presente en el contenedor (p. ej., un ligando dirigido que se va a unir al fosfolípido durante la reconstitución), se puede envasar con los otros componentes del kit, preferentemente en una forma o contenedor adaptado para facilitar la combinación fácil con los otros componentes del kit

No se requiere contenedores, viales o sistemas de conexión específicos; la presente invención puede usar contenedores, viales y adaptadores convencionales. El único requisito es un buen sello entre la tapa y el contenedor. La calidad del sello, por tanto, se convierte en objeto de preocupación importante, cualquier degradación de la integridad del sello podría permitir que sustancias no deseables entraran en el vial. Además, para garantizar la esterilidad, la retención del vacío es esencial para los productos tapados a presiones ambientales o reducidas para garantizar una reconstitución segura y adecuada. En cuanto al tapón, puede ser un compuesto o una formulación de múltiples componentes en base a un elastómero, tal como poli(isobutileno) o caucho de butilo.

Las técnicas de obtención de imágenes de ultrasonidos se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen técnicas conocidas, tales como técnicas de obtención de imágenes en Doppler color, Doppler en polvo, amplitud en Doppler, imágenes acústicas estimuladas y técnicas bi o tridimensionales. Las imágenes se pueden tomar en modo de armónicos (frecuencia resonante) o fundamental, prefiriéndose el segundo armónico.

En aplicaciones para ultrasonidos, los agentes de contraste formados por microburbujas estabilizadas con fosfolípidos pueden administrarse, por ejemplo, a dosis tales que la cantidad de fosfolípidos inyectado está en el intervalo de 0,1 a 200 mg/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 0,1 a 30 mg/kg. Los agentes de contraste que contienen microglobos normalmente se administran a dosis tales que la cantidad de polímero o lípido formador de pared es de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal.

Otras aplicaciones terapéuticas (solo para referencia)

Los polipéptidos de unión a KDR o VEGF/KDR como se usan en la presente invención se pueden usar para mejorar la actividad de los agentes terapéuticos tales como agentes antiangiogénicos o tumorocidas contra angiogénesis indeseada, tal como la que se produce en los tumores neoplásicos, proporcionando o mejorando su afinidad por KDR o por el complejo VEGF/KDR y su tiempo de residencia en KDR o el complejo VEGF/KDR sobre el endotelio sufre angiogénesis. En este aspecto, los agentes híbridos se proporcionan conjugando un polipéptido de unión a KDR o el complejo VEGF/KDR como se usa en la presente invención con un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser un radioterapéutico, tratado anteriormente, un fármaco, quimioterapéutico o agente tumorocida, material genético o vehículo de liberación génica etc. La porción del polipéptido de unión a KDR o el complejo VEGF/KDR del conjugado hace que el terapéutico se "aloje" en los sitios de KDR o el complejo VEGF/KDR (es decir, endotelio activado) y para mejorar la afinidad del conjugado por el endotelio, de modo que la actividad terapéutica del conjugado está más localizada y concentrada en los sitios de la angiogénesis. Dichos conjugados serán útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas con angiogénesis, especialmente crecimiento de tumor neoplásico y metástasis, en mamíferos, incluidos seres humanos, en el que el método comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido de unión a KDR o el complejo VEGF/KDR de acuerdo con la invención conjugado con un agente terapéutico.

Agentes terapéuticos adecuados para uso en este aspecto son, entre otros: Agentes antineoplásicos, tales como compuestos de platino (p. ej., espiroplatino, cisplatino y carboplatino), metotrexato, adriamicina, mitomicina, ansamitocina, bleomicina, citosina, arabinósido, arabinosiladenina, mercaptopolilisina, vincristina, busulfán, clorambucilo, melfalán (p. ej., PALM, L-PAM, o mostaza de fenilalanina), mercaptopurina, mitotano, procarbazona clorhidrato, dactinomomicina (actinomomicina D), clorhidrato de daunorubicina, clorhidrato de doxorubicina, taxol, mitomicina, plicamicina (mitramicina), aminoglutetimida, estramustina fosfato sódico flutamida, leuprólido acetato, megestrol acetato tamoxifeno citrato, testolactona, trilostana, amsacrina (m-AMSA), asparraginasas (L-asparraginasas), asparraginasas de Erwinia, etopósido (VP-16), interferón α -2a, Interferón α -2b, tenipósido (VM-26, vinblastina sulfato (VLB), vincristina sulfato, bleomicina sulfato, adriamicina y arabinosilo; agentes antiangiogénicos tales como inhibidores de la tirosina quinas con actividad frente a las moléculas de señalización importantes en la angiogénesis y/o el crecimiento del tumor, tal como SU5416 y SU6668 (Sugen/Pharmacia & Upjohn), endostatina (EntreMed), angiostatina (EntreMed), Combrestatina (Oxigene), ciclosporina, 5-fluorouracilo, vinblastina, doxorubicina, paclitaxel, daunorubicina, inmunotoxinas; factores de coagulación, antivirales, tales como aciclovir, amantadina azidotimidina (AZT o Zidovudina), ribavirina y monohidrato de vidarabina (adenina arabinósido, ara-A); antibióticos, antipalúdicos, antiprotos, tales como cloroquina, hidroxicloroquina, quimina y antimonio de meglumina, antiinflamatorios tales como diflunisal, ibuprofeno, indometacina, meclofenamato, ácido nefenámico, naproxeno, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, ácido acetilsalicílico y salicilatos

Los polipéptidos de unión a KDR o el complejo VEGF/KDR como se usan en la presente invención también se pueden usar para apuntar al material genético a las células que expresan KDR. Por tanto, pueden ser útiles en terapia génica, en particular para el tratamiento de enfermedades asociadas con la angiogénesis. En este aspecto, el material genético o uno o más vehículos de liberación que contienen material genético útil en el tratamiento de la enfermedad relacionada con la angiogénesis se pueden conjugar con uno o más restos de unión a KDR como se usa en la invención y se administra a un paciente. El material genético puede incluir ácidos nucleicos, tales como

ARN o ADN, de origen natural o sintético, incluido ARN y ADN recombinante y ARN y ADN antisentido. Tipos de material genético que se pueden usar incluyen, por ejemplo, genes portados en vectores de expresión tales como plásmidos, fagémidos, cósmicos, cromosomas artificiales en levadura (YAC) y virus defectuosos o “colaboradores”, ácidos nucleicos de antígenos, ARN y ADN mono y bicatenarios y análogos de los mismos, tales como fosforotioato y oligodesoxinucleótidos de fosforoditioato. Adicionalmente, el material genético se puede combinar con, por ejemplo, lípidos, proteínas u otros polímeros.

Se pueden usar construcciones que incluyan material genético y los polipéptidos de unión a KDR, en particular para introducir de forma selectiva genes en células endoteliales angiogénicas que pueden ser útiles no solo para tratar el cáncer sino también tras una angioplastia, en la que la inhibición de la angiogénesis puede inhibir la restenosis.

Los agentes terapéuticos y los restos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR como se usan en la invención se pueden unir o condensar de formas conocidas usando el mismo tipo de engarces tratados en otro lugar en esta solicitud. Engarces preferidos serán cadenas de alquilo sustituido o insustituido, cadenas de aminoácidos, cadenas de polietilenglicol y otros engarces poliméricos simples conocidos en la técnica. Más preferentemente, si el agente terapéutico es en sí mismo una proteína, para la que se conoce la secuencia de ADN que la codifica, la proteína terapéutica y el polipéptido de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR, se puede coexpresar a partir del mismo gen sintético, crear usando técnicas de ADN recombinante, como se ha descrito anteriormente. La secuencia de codificación para el polipéptido de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR se puede condensar en un marco con la de la proteína terapéutica, de un modo tal que el péptido se expresa en el extremo amino o carboxi de la proteína terapéutica, o en un lugar entre los extremos, si se determina que dicha colocación no destruiría la función biológica requerida de la proteína terapéutica o el polipéptido de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR. Una ventaja concreta de este enfoque general es que es posible la concatemerización de múltiples polipéptidos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR distribuidos en tándem, de modo que se incrementa el número y la concentración de los sitios de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR asociados con cada proteína terapéutica. De este modo, la avidéz de la unión a KDR o al complejo VEGF/KDR aumenta, lo que cabría esperar que mejorara la eficacia de la proteína de fusión terapéutica recombinante.

Proteínas recombinantes similares que contienen una o más secuencias de codificación para un polipéptido de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR pueden ser útiles en la obtención de imágenes o en aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en una variación de las aplicaciones predirigidas tratadas más adelante, la secuencia de codificación para un péptido de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR se puede condensar en un marco con una secuencia que codifica un anticuerpo (o un fragmento de anticuerpo o construcción de ADN recombinante que incluye un anticuerpo etc.) Adicionalmente, la secuencia de codificación para un péptido de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR se puede condensar en un marco con una secuencia que codifica, por ejemplo proteínas séricas u otras proteínas que producen efectos biológicos (tal como apoptosis, coagulación, internalización, diferenciación, estasis celular, estimulación o supresión del sistema inmunitario o combinaciones de los mismos). Las proteínas recombinantes resultantes son útiles en la obtención de imágenes, radioterapia y terapias dirigidas contra el cáncer y otras enfermedades que implican angiogénesis o enfermedades asociadas con los patógenos tratados en el presente documento.

Un heteromultímero particularmente preferido para usar es la construcción D1 que contiene el heterodímero (estructuras proporcionados por los ejemplos). Otras construcciones heterodiméricas preferidas para usar incluyen D4, D5 y D6 (estructuras proporcionadas en los ejemplos 12 y 18 más adelante). Dado que una función importante de las células endoteliales es la angiogénesis o la formación de vasos sanguíneos, los polipéptidos y construcciones de los mismos son particularmente útiles para tratar afecciones que implican angiogénesis. Entre las afecciones que implican angiogénesis se incluyen, por ejemplo, tumores sólidos, metástasis tumorales y tumores benignos. Dichos tumores y trastornos relacionados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, melanoma, tumores del sistema nervioso central, tumores neuroendocrinos, sarcoma, mieloma múltiple, así como cáncer de mama, de pulmón, de próstata, de colon, de cabeza y cuello y de ovarios. Tumores adicionales y trastornos relacionados se indican en la tabla I de la patente de EE.UU. N.º: 6.025.331, presentada el 15 de febrero de 2000 a Moses y col. Los tumores benignos incluyen, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias y granulomas piogénicos. Otras enfermedades relevantes que implican angiogénesis incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis y enfermedades oculares, tales como retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo del injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rebeosis, síndrome de Osler-Webber, angiogénesis por miocardio, neovascularización de placas, telangiectasia, artículos hemofílicas, angiofibroma y granulación de heridas. Otras enfermedades o afecciones relevantes que implican crecimiento de los vasos sanguíneos incluyen adherencias intestinales, aterosclerosis, esclerodermia y cicatrices hipertróficas y úlceras. Además, los polipéptidos de unión y las construcciones de los mismos como se usan en la presente invención se pueden usar para reducir o prevenir la neovascularización uterina requerida para la implantación del embrión, por ejemplo como agente anticonceptivo.

Los agentes que contienen el polipéptido de unión y las construcciones de los mismos se pueden administrar a un individuo durante un curso de tiempo adecuado en función de la naturaleza de la afección y del desenlace deseado. Los agentes de acuerdo con la invención que contienen los polipéptidos de unión y las construcciones de los mismos se pueden administrar como profilaxis, por ejemplo antes de diagnosticar la afección o a un individuo

predisuesto a sufrir una afección. Los agentes de acuerdo con la invención que contienen los polipéptidos de unión y las construcciones de los mismos se pueden administrar mientras el individuo exhiben los síntomas de la afección o una vez que los síntomas han pasado o, de otro modo, se han aliviado (tal como tras la resección de un tumor). Además, los agentes de acuerdo con la invención que contienen los polipéptidos de unión y las construcciones de los mismos se pueden administrar como parte de un régimen de mantenimiento, por ejemplo para prevenir o disminuir la recurrencia o los síntomas o la afección. Como se describe más adelante, los agentes que contienen los polipéptidos de unión y las construcciones de los mismos se pueden administrar por vía sistémica o local.

La cantidad de material administrado dependerá de la gravedad de la afección. Por ejemplo, el tratamiento de una afección angiogénica, por ejemplo en el caso de crecimiento de tumor neoplásico, la posición y el tamaño del tumor afectará a la cantidad de material que se va a administrar. La dosis exacta que se va a emplear y el modo de administración deberá ser determinada según la naturaleza de la queja de acuerdo con las circunstancias por el médico encargado de supervisar el tratamiento. En general, las dosis del agente conjugado de la presente invención seguirá las dosis que son rutinarias para el agente terapéutico solo, aunque la afinidad mejorada de un polipéptido de unión o heteromultímero como se usa en la invención para su diana pueden permitir una disminución de la dosis estándar.

Dichas composiciones farmacéuticas conjugadas se formulan, preferentemente, para administración parenteral y más preferentemente, para administración intravenosa o intraarterial. En general y particularmente cuando la administración es intravenosa o intraarterial, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como un bolo, como dos o más dosis separadas en el tiempo, o como una infusión de flujo constante o no lineal.

Como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" incluye un alivio al menos parcial de los síntomas de una afección dada. Los agentes que contienen los polipéptidos de unión y construcciones de los mismos no tienen que producir un alivio completo de los síntomas para ser útiles. Por ejemplo, el tratamiento de un individuo puede tener como resultado una disminución del tamaño de un tumor o un área enferma, o la prevención de un incremento del tamaño del tumor o el área enferma. El tratamiento puede tener como resultado la reducción del número de vasos sanguíneos en un área de interés o puede prevenir un incremento en el número de vasos sanguíneos en un área de interés. El tratamiento puede también prevenir o disminuir el número o el tamaño de sobrecrecimientos metastáticos del o los tumores principales.

Los síntomas que se pueden aliviar incluyen características fisiológicas tales como actividad del receptor de VEGF y la capacidad para migrar de las células endoteliales. Los agentes que contienen los polipéptidos de unión y las construcciones de los mismos pueden inhibir la actividad de los receptores de VEGF, incluidos VEGF-2/KDR, VEGF-1/Flt-1 y VEGF-3/Flt-4. Dicha inhibición se puede detectar mediante, por ejemplo, medición del estado de fosforilación del receptor en presencia de o tras el tratamiento con los polipéptidos de unión o las construcciones de los mismos. Dicha inhibición también se puede detectar midiendo la capacidad de las células endoteliales para migrar en presencia o después del tratamiento con los polipéptidos de unión o las construcciones de los mismos. Basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, un experto en la técnica sabría cómo y podría administrar una dosis adecuada del polipéptido de unión o construcción del mismo como se proporciona en el presente documento y medir el efecto del tratamiento sobre el parámetro de interés. Por ejemplo, el tamaño del área de interés (p. ej., el tumor o la lesión) se puede medir antes y después del tratamiento. En otra realización, el estado de fosforilación del receptor relevante, o la capacidad de migración de las células endoteliales en un área de interés se pueden medir en muestras tomadas del individuo. Los receptores de VEGF o las células endoteliales se pueden aislar de la muestra y usarse en ensayos descritos en el presente documento.

La dosis de los polipéptidos y construcciones de los mismos puede depender de la edad, el sexo, la salud y el peso del individuo, así como de la naturaleza de la afección y el régimen terapéutico global. Los efectos biológicos de los polipéptidos y construcciones de los mismos se describen en el presente documento. Por tanto, en base a los efectos biológicos de los polipéptidos de unión y construcciones de los mismos proporcionados en el presente documento y el resultado deseado del tratamiento, un experto en la técnica puede determinar la dosis preferida mediante procedimientos de optimización de rutina. Normalmente, el régimen diario está en el intervalo de 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg.

Los polipéptidos de unión y construcciones de los mismos como se usan en la presente invención se pueden conjugar a agentes terapéuticos para, por ejemplo, mejorar la especificidad, el tiempo de residencia en el cuerpo o el efecto terapéutico. Dichos otros agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, otros compuestos antiangiogénicos y compuestos tumorocidas. El agente terapéutico también puede incluir anticuerpos.

Además, los agentes de acuerdo con la invención que contienen el polipéptidos de unión o las construcciones de los mismos se pueden usar como dispositivo doméstico de las células endoteliales. Por tanto, los agentes de acuerdo con la invención que contienen los polipéptidos de unión o las construcciones de los mismos se pueden conjugar con un ácido nucleico que codifica, por ejemplo, un polipéptido terapéutico con el fin dirigir el ácido nucleico a las células endoteliales. Una vez expuesto al polipéptido de unión conjugado con el ácido nucleico, la célula endotelial puede internalizar y expresar el ácido nucleico conjugado de modo que libera el péptido terapéutico a las células diana.

En otro aspecto de la invención, el agente terapéutico se puede asociar con un agente de contraste de ultrasonidos, incluyendo dicho agente de contraste de ultrasonidos los péptidos de unión a KDR o al complejo de VEGF como se usa en la invención ligado al material empleado para formar las vesículas (en particular microburbujas o microglobos) comprendidas en el agente de contraste, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, dicha asociación agente de contraste/agente terapéutico se puede llevar a cabo como se describe en el documento US 6.258.378. Después de la administración del agente de contraste de ultrasonidos y la obtención de imágenes opcional del agente de contraste unido al sitio patogénico que expresa el KDR o el complejo KDR/VEGF, el sitio patogénico se puede irradiar con un haz de energía (preferentemente ultrasónica, por ejemplo con una frecuencia de 0,3 a 3 MHz) para producir las ráfagas de microvesículas, como se divulga, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 6.258.378 citada anteriormente. El efecto terapéutico del agente terapéutico puede, por tanto, potenciarse ventajosamente mediante la energía liberada por las ráfagas de las microvesículas, causando en particular una liberación eficaz del agente terapéutico en el sitio patogénico dirigido.

Los agentes de acuerdo con la invención que contienen los polipéptidos de unión y las construcciones de los mismos se pueden administrar por cualquier vía adecuada. Vías de administración adecuadas incluyen, entre otras, la parenteral. Las composiciones de la vía de administración deseada se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en las técnicas farmacéuticas, por ejemplo como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a ed., Lippincott, Williams and Wilkins, 2000.

Para administración parenteral, los agentes de acuerdo con la invención que contienen los polipéptidos se pueden inyectar por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, agua estéril, solución salina y solución salina tamponada (incluidos los tampones como fosfato o acetato), alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina etc. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lidocaína, para disminuir el dolor en el lugar de la inyección, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales, lubricantes etc., siempre que no reaccionen de forma perjudicial con los compuestos activos. De un modo similar, la composición puede comprender excipientes convencionales, es decir sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para aplicación parenteral, enteral o intranasal que no reaccionen de forma perjudicial con los compuestos activos. En general, los ingredientes son suministrados por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria como, por ejemplo, polvo liofilizado seco o concentrado sin agua, en un contenedor sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre, indicando la cantidad de agente activo en unidades de actividad. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con un bote de infusión que contiene "agua para inyectables" o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectables o solución salina de modo que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

El aislamiento de restos de unión a KDR o al complejo VEGF/KDR como se usa de acuerdo con la presente invención se ilustrará adicionalmente en los ejemplos siguientes. Los parámetros específicos incluidos en los ejemplos siguientes se pretende que ilustren la práctica de la invención y no se presentan para limitar de ningún modo el alcance de la invención.

Ejemplos (la materia objeto no reivindicada está presente solo a efectos de referencia)

Ejemplo 1: Detección selectiva de la biblioteca contra las dianas KDR y el complejo KDR/VEGF

Las fusiones quiméricas de la región Fc de Ig con KDR humano (n.º 357-KD-050), KDR murino (n.º 443-KD-050), VEGFR-1 humano (n.º 321-FL-050), VEGFR-3 humano (n.º 349-F4-050) y Trail R4 humano (n.º 633-TR-100) se adquirieron en forma sin vehículo (sin BSA) de R & D Systems (Minneapolis, MN). La Fc de Trail R4 es una proteína de fusión de Fc irrelevante con la misma región de fusión de Fc como fusión Fc diana (Fc de KDR) y se usa deplecionando las bibliotecas de aglutinantes de Fc. VEGF165 (n.º 100-20) se adquirió en forma sin vehículo de Peprotech (Rocky Hill, NJ). Las perlas magnéticas de proteína A (n.º 100,02) se adquirieron de Dynal (Oslo, Noruega). La heparina (n.º H-3393) se obtuvo de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Un sistema de tetrametilbencidina de 2 componentes se adquirió de KPL (Gaithersburg, MD).

En los siguientes procedimientos, las placas de microtitulación se lavaron con un lavador de placas Bio-Tek 404 (Winooski, VT). Las señales de ELISA se leyeron con un lector de placas Bio-Tek (Winooski, VT). La agitación de las placas de 96 pocillos se realizó en un agitador LabQuake (Labindustries, Berkeley, CA).

Se prepararon ocho bibliotecas de expresión en el fago M13 para detección selectiva contra las dianas de KDR y VEGF/KDR inmovilizados. Bibliotecas de expresión de péptidos cíclicos TN6/VI, TN7/IV, TN8/IX, TN9/IV, TN10/IX, TN12/I y MTN13/I y una biblioteca de expresión lineal, Lin20. El diseño de estas bibliotecas se ha descrito anteriormente.

El ADN que codifica la biblioteca se sintetizó con ADN constante en cualquier lado de modo que el ADN se puede amplificar mediante PCR usando la ADN polimerasa Taq (Perkin-Elmer, Wellesley, MA), escindida con *Nco*I y *Pst*I y ligada en un vector de expresión en fagos sometido a una escisión similar. Las células XL1-Blue MFR' de *E. coli* se transformaron con el ADN ligado. Todas las bibliotecas se construyeron del mismo modo.

5

Protocolo de selección de KDR en presencia de heparina

Perlas magnéticas de proteína A se bloquearon una vez con 1X PBS (pH 7.), Tween-20 0,01%, HSA al 0,1 % (tampón de bloqueo) durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron cinco veces con 1X PBS (pH 7.), 0,01 % de Tween-20, 5 µg/ml de heparina (tampón PBSTH).

10

Las bibliotecas de péptido cíclico, o "bucle constreñido", se agruparon para la detección selectiva inicial en dos grupos: TN6/VI, TN7/IV y TN8/IX estaban en un grupo; TN9/IV, TN10/IX y TN12/I estaban en el segundo grupo. Las dos bibliotecas combinadas y la biblioteca lineal (Lin20) se deplecionaron contra la fusión Trail R4 Fc (una Fc de fusión irrelevante (y después se seleccionaron contra la fusión de Fc de KDR. 1011 UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (ufp) de cada biblioteca por 100 µl de PBSTH se combinaron juntos, por ejemplo 3 bibliotecas combinadas tendrían como resultado un volumen total de ~ 350 µl en PBSTH).

15

Preparando las perlas de fusión de Fc irrelevantes, a 1000 µl de perlas magnéticas de proteína A bloqueadas y lavadas se añadió la fusión Trail R4-Fc (0,1 µg/µl de la reserva en PBST (sin heparina)). La fusión se dejó unirse a las perlas durante la noche con agitación a 4 °C. Al día siguiente, las perlas magnéticas se lavaron 5 veces con PBSTH. Cada conjunto de fagos se incubó con 50 µl de perlas de fusión Trail R4 Fc en un agitador Labquake durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después de incubar, el sobrenadante del fago se eliminó e incubó con otros 50 µl de perlas Trail R4. Esto se repitió para un total de 5 rondas de depleción eliminando la fusión de Fc inespecífico y el fago de unión de la perla desde las bibliotecas.

20

25

Preparando las perlas diana de KDR, a 500 µl de perlas lavadas bloqueadas se añadieron 500 µl de de la fusión KDR-Fc (0,1 µg/µl de reserva en PBST (sin heparina)). La fusión KDR-Fc se dejó unirse a las perlas durante la noche con agitación a 4 °C. Al día siguiente, las perlas magnéticas se lavaron 5 veces con PBSTH. Cada combinación de bibliotecas deplecionadas se añadió a 100 µl de perlas KDR-Fc y se dejaron incubar en un agitador Labquake durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después, las perlas se lavaron lo más rápidamente posible con 5 x 1 ml de PBSTH usando reposo magnético (PROMEGA) separando las perlas del tampón de lavado. El fago todavía unido a las perlas después del lavado se eluyó una vez con 250 µl de VEGF (50 µg/ml, ~1 µM) en in PBSTH durante 1 hora a TA en un agitador Labquake. La elución de 1 hora se retiró y se guardó. Después de la primera elución, las perlas se incubaron de nuevo con 250 ~µl de VEGF (50 µg/µl, ~ 1 µM) durante la noche a TA en un agitador Labquake. Las dos eluciones de VEGF se mantuvieron aparte y se tomó un pequeño alícuota de cada uno para titulación. Cada elución se mezcló con un alícuota de XL1-Blue MRF' (u otra línea celular F') de células de *E. coli* que se habían enfriado en hielo después de haberse cultivado hasta la fase semilogarítmica. Las perlas que quedan tras la elución de VEGF se mezclaron también con células amplificando el fago todavía unido a las perlas, es decir el fago de unión a KDR que no se había eliminado por competición mediante las dos incubaciones con VEGF (eluciones de 1 hora y durante la noche O/N)). Después de aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente, las mezclas fago/célula se extendieron en placas Bio-Assay (243 X 243 X 18 mm, Nalge Nunc) que contienen 250 ml de agar NZCYM con 50 µg/ml de ampicilina. La placa se incubó durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, cada cultivo de fagos amplificado se recogió de su correspondiente placa. Al día siguiente, los cultivos de entrada, salida de fagos y amplificados se titularon para su FOI (es decir, fracción de entrada= salida de fagos dividida por entrada de fagos).

30

35

40

45

En la primera ronda, cada combinación dio tres eluatos amplificados. Estos eluatos se cribaron durante 2-3 rondas más de selección hasta ~ 10¹⁰ fagos de entrada/ronda de acuerdo con el mismo protocolo como se ha descrito anteriormente. Para cada ronda adicional, las perlas de KDR-Fc se prepararon la noche antes de iniciar la ronda. Para la etapa de elución en las posteriores rondas, la repetición del cribado de elución amplificada en las perlas de KDR-Fc siempre se eluyó del mismo modo y todas las demás eluciones se trataron como lavados. Por ejemplo, para la elución amplificada recuperada usando las perlas todavía unidas infectando a *E. coli*, se realizaron eluciones de 1 hora y durante la noche de VEGF y después se descartaron como lavados. Después, las perlas se usaron infectando de nuevo *E. coli* y producir la siguiente elución amplificada. Usando este procedimiento, cada combinación de bibliotecas dio tres eluciones finales al final de la selección. Dos combinaciones y una biblioteca lineal dieron un total de 9 eluciones finales al final de la selección.

50

55

Este procedimiento de selección se repitió para todas las bibliotecas en ausencia de heparina en todos los tampones de unión, es decir sustituyendo PBST (PBS (pH 7,5), 0,01 % Tween-20) por PBSTH en todas las etapas.

60

Protocolo de selección del complejo KDR:VEGF en presencia de heparina

Las perlas magnéticas de proteína A se bloquearon una vez con tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron cinco veces con PBSTH.

65

Dos grupos de bibliotecas de bucles restringidos y una biblioteca lineal (Lin20) se prepararon como antes y después se deplecionaron contra la fusión de KDR Fc sola en lugar de la fusión Trail-R4 Fc eliminando los aglutinantes del receptor sin VEGF unido. Una vez deplecionadas, las bibliotecas se seleccionaron contra el complejo KDR:VEGF₁₆₅.

Preparando las perlas de fusión de KDR-Fc a 1 ml de perlas bloqueadas y lavadas se añadió 1 ml de la fusión KDR-Fc (0,1 µg/µl de la reserva en PBST (sin heparina)). La fusión se dejó unirse a las perlas durante la noche con agitación a 4 °C. Al día siguiente, las perlas magnéticas se lavaron 5 veces con PBSTH. Cada conjunto de fagos se incubó con 50 µl de perlas de fusión KDR-Fc en un agitador Labquake durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después de incubación, el sobrenadante del fago se eliminó e incubó con otros 50 µl de perlas KDR-Fc. Esto se repitió durante un total de 5 rondas de depleción.

Preparando las perlas del complejo KDR:VEGF, 300 µl de las perlas de fusión KDR-Fc anteriores se incubaron con 15 µl de VEGF (1 mg/ml). El VEGF se dejó unir durante 1 hora a TA. Las perlas se lavaron 5 veces con PBSTH. Cada combinación de bibliotecas deplecionadas se añadió a 100 µl de perlas del complejo KDR:VEGF y se dejaron incubar en un agitador Labquake durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después, las perlas se lavaron lo más rápidamente posible con 5 x 1 ml de PBSTH usando reposo magnético (PROMEGA) separando las perlas del tampón de lavado. Eluyendo el fago todavía unido después de lavar, las perlas se mezclaron con células amplificando el fago todavía unido a las perlas. Después de aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente, las mezclas fago/célula se extendieron en placas Bio-Assay (243 X 3.243 X 18 mm, Nalge Nunc) que contienen 250 ml de agar NZCYM con 50 µg/ml de ampicilina. La placa se incubó durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, cada cultivo de fagos amplificado se recogió de su correspondiente placa. Al día siguiente, los cultivos de entrada, salida de fagos y amplificados se titularon para su FOI. Este protocolo de selección se repitió durante dos rondas adicionales usando 10¹⁰ fagos de entrada de cada elución amplificada.

Ensayo de detección selectiva con KDR y KDRNEGf

Se añadieron 100 µl de la fusión KDR-Fc o la fusión Trail R4-Fc (1 µg/ml) a placas por duplicado Immulon II a cada pocillo y se dejaron incubar a 4 °C durante la noche. Cada placa se lavó dos veces con PBST (PBS, 0,05 % Tween-20). Los pocillos se llenaron hasta arriba con 1X PBS, 1 % de BSA y se dejaron incubar a TA durante 2 horas. Cada placa se lavó una vez con PBST (PBS, 0,05 % Tween-20).

Evaluando la unión al complejo KDR:VEGF se preparó otro conjunto de placas de KDR como antes y después a cada pocillo con KDR se añadieron 100 µl de VEGF (1 µg/µl) en PBST y se dejaron incubar a TA durante 30 minutos. Cada placa se lavó después con PBST (PBS, 0,05 % Tween-20).

Una vez preparadas las placas, cada cultivo de fagos durante la noche se diluyó a 1:1 (o hasta 10¹⁰ ufp si se usa la reserva de fagos purificados) con PBS, 0,05 % de Tween-20, 1 % de BSA. Se añadieron 100 µl de cada cultivo diluido y se dejaron incubar a TA durante 2-3 horas. Cada placa se lavó 5 veces con PBST. El fago de unión se visualizó añadiendo 100 µl de una dilución a 1:10.000 del conjugado HRP-anticuerpo anti-M13 ((Pharmacia), se diluyó en PBST, a cada pocillo, incubando después a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada placa se lavó 7 veces con PBST (PBS, 0,05 % Tween-20), después las placas se desarrollaron con sustrato de HRP (~ 10 minutos) y la señal de absorbancia (630 nm) se detectó con un lector de placas.

Se recuperaron los fagos de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR, se amplificaron y las secuencias de los péptidos de expresión responsables de la unión se determinaron mediante métodos de secuenciación de ADN estándar.

Tras el aislamiento de los aislados de KDR y al complejo VEGF/KDR en las rondas de selección iniciales se seleccionaron ciertos aislados para actuar como moldes para la construcción de bibliotecas secundarias de las que se aislaron polipéptidos de unión de alta afinidad adicionales. En una biblioteca secundaria de TN8, la secuencia del aislado del fago PKWCEEDWYYCMIT (SEC ID N.º: 1) se usó como molde construyendo una biblioteca que permitió mutaciones de una, dos y tres bases en la secuencia parental en cada codón variable. En una biblioteca secundaria de TN12, la secuencia del aislado del fago RVCWEDSWGGVEVCFRY (SEC ID N.º: 3) se usó como molde construyendo una biblioteca que permitió mutaciones de una, dos y tres bases en la secuencia parental en cada codón variable. En otra biblioteca secundaria de TN8, un motivo recurrente de las secuencias de TN8 iniciales se mantuvo constante (WVEC---TG-C---) y todas las demás posiciones del codón (es decir, en "-") se dejaron variar (todos los 20 posibles aminoácidos) usando la sustitución del codón NNK, en el que N es cualquier nucleótido y K representa cualquier nucleótido ceo (G o T).

Usando un método de optimización peptídica por aleatorización suave como han descrito Fairbrother y col., Biochemistry, 37(51):17754-17764 (1998), se prepararon dos bibliotecas en base a las secuencias de la SEC ID N.º: 1 y la SEC ID N.º: 3. En cada posición del residuo, cada nucleótido dentro de un codón concreto se dejó evolucionar añadiendo cantidades fijas de los otros tres nucleótidos que no correspondían al nucleótido del codón parental. Esta mezcla de nucleótidos se consigue en la síntesis del ADN molde usado fabricando la biblioteca. Para estas bibliotecas, el nucleótido parental dentro de cada codón se mantuvo al 64 % para la SEC ID N.º: 1 y al 67 % para la

SEC ID N.º: 3, mientras que los otros nucleótidos se añadieron a la frecuencia que queda dividida por tres. Dado que los nucleótidos parentales están en la mayoría, la secuencia consenso global para toda la biblioteca debería contener la secuencia parental. No obstante, la inspección de aislados individuales muestra que son posibles múltiples mutaciones de modo que se permite la selección de péptidos con mejor capacidad de unión en comparación con la secuencia parental.

Para la tercera biblioteca, el motivo TN8 descrito anteriormente se mantuvo constante y todas las demás posiciones se dejaron variar con sustitución NNK en el oligonucleótido molde. Extendiendo la sustitución también se permitió diversidad de NNK en las dos posiciones de aminoácidos flanqueantes, de modo que se añaden posiciones de aminoácidos variables en N-terminal y C-terminal al péptido de expresión. Al contrario que las dos bibliotecas anteriores en las que la secuencia consenso sigue siendo la secuencia parental, esta biblioteca fue bastante diversa en todas las posiciones permitidas y solo se asemejó al motivo parental en los residuos que se mantuvieron constantes.

Un total de 2×10^{11} ufp de cada biblioteca se usó como antes a excepción de que se cambió la estrategia de elución. Se realizó elución por competición del fago unido usando el péptido parental (50 μ M) que se usó fabricando la biblioteca secundaria concreta (es decir, los péptidos de las SEC ID N.º: 1, 3 y 2, respectivamente). Los fagos de unión se eluyeron a través de tres etapas: (1) elución durante 1 hora a temperatura ambiente, siendo usado el fago eluido infectando las células para amplificación, (2) elución durante la noche, en la que se añadió péptido de elución por competición fresco al fago unido y se incubó a 4 °C durante la noche con mezclado, usándose el fago eluido infectando células para amplificación y (3) las perlas que quedan (portadoras del fago de unión sin eluir) infectando las células directamente. Se realizaron tres rondas de selecciones. Las placas se escogieron de las rondas 2 y 3 y se analizaron mediante ELISA y secuenciación. Los aislados positivos para KDR se analizaron además según la competición con péptido parental libre 50 mM. Los péptidos que mostraban una competición mínima con el péptido parental se consideraron aglutinantes de mayor afinidad y se sintetizaron.

Ejemplo 2: Síntesis peptídica y marcaje con fluoresceína

Determinados péptidos de unión a KDR o a complejo VEGF/KDR correspondientes a aislados de fagos positivos se sintetizaron en fase sólida usando los protocolos de 9-fluorenilmetoxycarbonilo y se purificaron mediante cromatografía de fase inversa. Las masas peptídicas se confirmaron mediante espectrometría de masas por electropulverización y los péptidos se cuantificaron mediante absorbancia a 280 nm. Para la síntesis, se conservaron dos aminoácidos en N-terminal y dos en C-terminal de la secuencia del vector del fago de la que se escindió el péptido y se añadió un engarce -Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂ al extremo C de cada péptido. Cada péptido se aciló en el extremo N. Para los péptidos con residuos de lisina seleccionados, estos se protegieron con 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo (ivDde), lo que permite el acoplamiento selectivo a la lisina en C-terminal, no se elimina durante la escisión peptídica y se puede eliminar tras el acoplamiento con hidracina al 2 % en DMF o hidroxilamina 0,5M, a pH 8, en agua.

Cada péptido se marcó con fluoresceína en la lisina en C-terminal usando fluoresceína (derivado de N-hidroxisuccinimida éster) i isotiocianato de fluoresceína (FITC) en DMF, diisopropilamina al 2 % (DIPEA). Si el péptido contenía una lisina protegida con ivDde, la reacción se inactivó mediante la adición de hidracina al 2 %, que reacciona con toda la NHS-fluoresceína libre y elimina el grupo protector interno. Para todos los demás péptidos, la reacción se inactivó mediante la adición de un volumen igual de hidroxilamina 0,5M, pH 8. Las reacciones inactivadas se diluyeron después con agua hasta menos de 10 % de DMF y después se purificaron usando cromatografía de fase inversa de C18. Los péptidos se caracterizaron según la pureza y la masa corregida en un sistema de CL-EM (HP1100 HPLC con espectrómetro de masas de un cuádrupolo SCIEX AP150 integrado).

Ejemplo 3: Mediciones de la anisotropía de fluorescencia y ensayos BiaCore

Las mediciones de la anisotropía de fluorescencia se realizaron en microplacas de 384 pocillos en un volumen de 10 μ l en tampón de unión (PBS, 0,01 % Tween-20, pH 7,5) usando un lector de placas de polarización de fluorescencia Tecan Polarion. En algunos casos, al tampón de unión se añadió heparina (0,5 μ g/ml) o 10 % de suero humano (datos no mostrados). La concentración del péptido marcado con fluoresceína se mantuvo constante (20 nM) y la concentración de KDR-Fc (o de una diana similar) se varió.

Las mezclas de unión se equilibraron durante 10 minutos en la microplaca a 30 °C antes de la medición. El cambio observado en la anisotropía se ajustó a la siguiente ecuación mediante regresión no lineal obteniendo la K_D aparente. Esta ecuación (1) supone que el péptido sintético y el KDR forman un complejo reversible en solución con estequiometría a 1:1.

$$r_{obs} = r_{libre} + \left(r_{unido} - r_{libre} \right) \frac{(K_D + KDR + P) - \sqrt{(K_D + KDR + P)^2 - 4 \cdot KDR \cdot P}}{2 \cdot P} \quad (1),$$

En la que r_{obs} es la anisotropía observada, r_{libre} es la anisotropía del péptido libre, r_{unido} es la anisotropía del péptido unido, K_D es la constante de disociación aparente, KDR es la concentración total de KDR y P es la concentración de péptido marcado con fluoresceína total. K_D se calculó en un ensayo de unión directa ($K_{D,B}$) (véase la tabla 1) y por tanto, estos valores representan la unión de KDR al péptido marcado con fluoresceína.

Para las determinaciones BiaCore de KD, KDR-Fc (u otras dianas proteicas) se cruzó con la superficie de dextrano de un circuito sensor de CM5 mediante el procedimiento de acoplamiento de amina estándar (soluciones 0,5 mg/ml diluidas a 1:20 con acetato 50 mM, pH 6,0, R_L KDR-Fc = 12859). Los experimentos se realizaron en tampón HBS-P (HEPES 0,01M, pH 7,4, NaCl 0,15M, 0,005 % de polisorbato 20 (v/v). Las soluciones peptídicas cuantificadas mediante el coeficiente de extinción se diluyeron a 40 nM en HBS-P. Se realizaron diluciones en serie produciendo soluciones de 200, 100, 50 y 25 nM. Para asociación, los péptidos se inyectaron a 20 ml/min durante 1 minuto usando el programa kinject. Tras disociación de 1 minuto, cualquier péptido que quedase se raspó de la superficie diana con una inyección rápida de NaCl 1M durante 25 segundos a 50 μ l/min. Todas las muestras se inyectaron por duplicado. Entre cada serie de péptido, una inyección de tampón y una inyección de péptido de unión no diana sirvió como controles adicionales. Los sensogramas se analizaron usando el programa de ajuste de k_a/k_D simultáneo en el software BIAevaluation 3.1. La K_D aparente mediante este método se indica como $BiaK_D$ en la tabla 1. Al contrario que los experimentos anteriores de anisotropía por fluorescencia, el péptido sin marcar se usó para todas las pruebas usando este ensayo y por tanto, estos valores representan la unión de KDR al péptido no marcado. Las afinidades de unión determinadas para los polipéptidos sintetizados se indican en la tabla 1 más adelante. Los supuestos restos de péptidos cíclicos constreñidos por disulfuro de los polipéptidos están subrayados.

Tabla 1: Afinidades de unión para péptidos sintetizados

Secuencia	$K_{D,B}$ (μ M)	$BiaK_D$ (μ M)	SEC ID N°
TN8			
AGDSWC <u>STEYTYCE</u> MIGTG GGK	>2		4
KGPKW <u>CEEDWYYC</u> MITGTG GGK	0,28	0,027	5
AGVWECAKTFP <u>CHW</u> FGTG GGK	2,60		6
AGWVECWKSGQCYEFGTG GGK	1,3		7
AGWIQCN <u>SITGHCT</u> SGGTG GGK	0,24		8
AGWIECYHPDGICYHFGTG GGK	0,32	0,32	9
AGSDWCRVDWYYCWLMGTG GGK	0,064		10
AGANW <u>CEEDWYYC</u> FITGTG GGK	0,310		11
AGANW <u>CEEDWYYC</u> WITGTG GGK	0,097		12
AGPDW <u>CEEDWYYC</u> WITGTG GGK	0,075		13
AGSNW <u>CEEDWYYC</u> YITGTG GGK	0,046		14
AGPDWCAADWYYCYITGTG GGK	0,057		15
AGPEWCEVDWYYCWLLGTG GGK	0,075		16
AGPTWCEDDWYYCWLFGTG GGK	0,0032	0,079	17
AGSKWCEQDWYYCWLLGTG GGK	0,400		18
AGRNW <u>CEEDWYYC</u> FITGTG GGK	0,190		19
AGVNW <u>CEEDWYYC</u> WITGTG GGK	0,260		20
AGANW <u>CEEDWYYC</u> YITGTG GGK	0,180		21
AGQAWVECYAETGYCWPRSWG TGGK	0,71		22
AGQAWIECYAEDGYCWPRSWG TGGK	1,40		23
AGVGWVECYQSTGFCYHSRDGTG GGK	1,30		24
AGDWWVECRVGTGLCYRYDTGTG GGK	0,93		25
AGDSWVECDAAQTGFCYSFLYGTG GGK	2,30		26

AGERWVE <u>C</u> RAETGFCYTWVSGTGGGK	2,10		27
AGGGWVE <u>C</u> RAETGHCQEYRLGTGGGK	1,60		28
AGVAWVE <u>C</u> YQTTGKCCTFRGGTGGGK	-2		29
AGEGWVE <u>C</u> FANTGACFTYPRGTGGGK	2,10		30
TN12			
GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK	0,069	0,12	31
GDDSY <u>C</u> MMNEKGWWNCYLYDPGGGK	1,3		32
GDPAQCWESNYQGIFCNDPDPGGGK	2,3		33
GDGWA <u>C</u> AKWPWGGEICQPSDPGGGK	1,0	1,5	34
GDSSVCFEYSWGGEVCFRYDPGGGK	0,058		104
GDSRVCW <u>E</u> YSWGGQICLGYPGGGK	0,32		105
Lin20			
AQQVQYQFFLGTPRYEQWDLDKGGK	1,7		35
AQEPEGYAYWEVITLYHEEDGDGGK	0,27	0,73	36
AQAFPRFGDDYWIQYLYRYTDGGK	0,53	0,25	37
AQGDYVYWEIILTATDHTPPGGK	0,18		38
AQRGDYQEQYWHQQLVEQLKLLGGK	0,31	5,3	39
KQRSWYLGPPYYEWDPIPNGGK	1,8		40
AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGK		0,05	41

Para el análisis de los péptidos que se unen específicamente al complejo KDR/VEGF, de cada péptido se analizó su unión al complejo en ambos ensayos (anisotropía de fluorescencia /Biacore) como anteriormente. En el ensayo de anisotropía, el complejo KDR-VEGF se formó mezclando un exceso molar por dos de VEGF con KDR-Fc. Esta mezcla se usó después en la titulación de la unión directa usando un péptido marcado con fluoresceína como se ha hecho anteriormente. Como control, cada péptido también se analizó según su unión a KDR y VEGF solos evaluando su especificidad por el complejo. Dado que ninguno de los péptidos se unió a VEGF en ninguna medida, la presencia de exceso de VEGF en el ensayo no debería afectar a la determinación de la K_D . Como se muestra en la tabla 2, más adelante, todos los péptidos mostraron una espectacular preferencia de unión, la unión por el complejo KDR/VEGF sobre por VEGF. No obstante, algunos de ellos sí mostraron alguna unión residual al KDR libre. Para confirmar los resultados de anisotropía, los péptidos no marcados se analizaron en Biacore como antes, a excepción de que el circuito estaba saturado con VEGF formando el complejo KDR/VEGF anterior a la inyección de los péptidos. En los péptidos analizados, la $BiaK_D$ estaba dentro de al menos 2 veces la medición de la anisotropía.

Tabla 2: Péptidos específicos del complejo KDR/VEGF

SEC ID Nº	Secuencia	K_D , B (KDR)	K_D , B (VEGF)	K_D , B (KDR/VEGF)	$BiaK_D$ (KDR/VEGF)
41	AQAPAWTFGTNWRSIQRVDSLTTGGGGGK	NB	NB	0,84	
42	AQEGWFRNPQEIMGFGDSWDKPGGGGGK	NB	NB	1,4	

MÉTODOS PARA LOS EJEMPLOS 4-10

Los métodos siguientes se usaron en los ejemplos 4-10. Se usan las siguientes abreviaturas habituales. 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), 1-hidroXibenzotriazol (HOBt), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), N-metilpirrolidinona (NMP), anhídrido acético (Ac_2O), (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo (ivDde), ácido trifluoroacético (TFA), Reactivos B (TFA: H_2O fenol: Triisopropilsilano 88:5:5:2) diisopropiletilamina (DIEA), O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU), O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU), N-hidroxisuccinimida (NHS), síntesis peptídica en fase sólida SPFS), dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF) y N-metilpirrolidinona (NMP), seroalbúmina humana (HSA) y pureza radioquímica (RCP).

Método 1 para los sintetizadores ACT 357 MPS y ACT 496 MOS

Los péptidos se sintetizaron en una resina NovaSyn TGR (amida de Rink) (0,2 mmol/g) usando los sintetizadores Advanced ChemTech ACT 357 o ACT 496 que usan protocolos de síntesis peptídica de Fmoc, usando específicamente HOBt/DIC como los reactivos de acoplamiento y NMP como el disolvente. El Fmoc se eliminó tratando el péptido unido a la resina Nova-Syn TGR (amida de Rink disponible en NovaBiochem, San Diego CA) con 25 % de piperidina en DMF dos veces (4 minutos y 10 minutos). Todos los aminoácidos se disolvieron en NMP (se añadió DMF cuando el aminoácido no era soluble en NMP puro). La concentración del aminoácido fue 0,25M y las concentraciones para HOBt y DIC fueron, respectivamente, 0,5M. Para una síntesis a escala de 0,04 mmol:

Un ciclo de acoplamiento de aminoácido típico (no incluido en las etapas de lavado) era dispensar solución de piperidina (2,4 ml) a cada pocillo y mezclar durante 4 minutos, después vaciar todos los pocillos. En cada pocillo se dispensaron NMP (320 µl), solución HOBt (320 µl, 4 eq.), aminoácido (640 µl, 4 eq.) y DIC (320 µl, 4 eq.). El tiempo de acoplamiento fue de 2 horas; después se lavó la resina. El ciclo se repitió para cada aminoácido. Después del acoplamiento del último aminoácido, el péptido unido a resina se trató con 25 % de piperidina eliminando el grupo protector Fmoc. Después de lavar, el péptido unido a resina se taponó con Ac₂O 1,0M (1,2 ml por pocillo) y diisopropilmetilamina en DMF, incluyendo opcionalmente varias cantidades de HOBt en la mezcla durante 30 minutos. La resina se lavó con metanol y después diclorometano y se secó. La escisión de los péptidos de la resina y la desprotección de la cadena lateral se consiguió usando reactivo B durante 4,5 horas. Las soluciones de escisión se recogieron y las resinas se lavaron con un alícuota adicional de reactivo B. Las soluciones combinadas se concentraron hasta sequedad. Se añadió éter al residuo con agitación suave o agitación precipitando los péptidos. El éter se decantó y se recogió el sólido. Este procedimiento se repitió 2-3 veces para eliminar las impurezas. Los péptidos lineales brutos se disolvieron en mezclas de agua y DMSO y se purificaron mediante HPLC (columna: Waters Associates Xterra C18, 19 3 50 mm; disolventes: H₂O con 0,1 % TFA y CH₃CN con 0,1 % TFA; UV 220 µm; Caudal: 50-60 ml/min). Las soluciones que contienen el péptido se liofilizaron dando los péptidos deseados como liofilizados esponjosos blancos (pureza > 90 %). Los péptidos que contienen di-cisteína lineal purificada se disolvieron en agua, las mezclas de agua-acetonitrilo o las mezclas de agua-DMSO a concentraciones entre 0,1 mg/ml y 2,0 mg/ml. La elección del disolvente fue una función de la solubilidad del péptido bruto en el disolvente. El pH de la solución se ajustó a un pH 7,5-8,5 con amoníaco acuoso, carbonato amónico acuoso o bicarbonato amónico acuoso. La mezcla se agitó enérgicamente en aire durante 24 - 48 horas. En el caso de los sistemas de disolventes que no contienen DMSO, el pH de la solución se ajustó a pH 2 con ácido trifluoroacético acuoso. La mezcla se liofilizó proporcionando el péptido que contiene disulfuro cíclico bruto. El péptido disulfuro cíclico se disolvió después hasta un volumen de 1 - 2 ml en acuosa (0,1 % de TFA) que contiene un mínimo de acetonitrilo (0,1 % TFA). La solución resultante se cargó en una columna de fase inversa y el compuesto deseado obtenido mediante una elución por gradiente de acetonitrilo en agua, usando una columna para HPLC preparativa o semipreparativa de fase inversa de C 18 o C 8. En el caso de las soluciones que contienen DMSO, la solución se diluyó hasta que la concentración de DMSO fue mínima sin precipitación del péptido. La mezcla resultante se acidificó rápidamente hasta un pH 2 con ácido trifluoroacético diluido y se cargó en el sistema de HPLC de fase inversa y se purificó como se ha descrito. Las fracciones que contienen los materiales deseados se combinaron y los péptidos se aislaron mediante liofilización.

Método 2 para los sintetizadores ACT 357 MPS y ACT 496 MOS

Los péptidos se sintetizaron como en el método 1 con los siguientes cambios. Se usó HBTU/HOBt/DIEA como reactivo de acoplamiento y NMP como el disolvente. Una nueva carga (~ 0,2 mmol/g de Fmoc-GGK(Boc)-NovSyn-TGR-resina preparada de la resina Nova-Syn TGR descrita anteriormente se usó para la síntesis peptídica a escala de 0,01 mmol. Para una síntesis a escala de 0,01 mmol:

Una vez eliminado el grupo Fmoc, un procedimiento de acoplamiento estándar usó una solución de HOBt (720 µl, 6 eq.), aminoácido (804 µl, 6,6 eq.), HBTU (720 µl, 6 eq.) y DIEA (798 µl, 13,3 eq.). La mezcla se agitó durante 15 minutos, se vació y la resina se lavó. Después de todos los acoplamientos y tras la escisión y purificación como anteriormente, las soluciones que contienen los péptidos lineales deseados se liofilizaron dando los péptidos (pureza > 90 %) como sólidos blancos esponjosos. Los péptidos que contienen di-cisteína lineal bruta precipitada en éter se ciclaron mediante disolución en agua, mezclas de acetonitrilo acuoso (0,1 % de TFA) o DMSO acuoso y ajuste del pH de la solución hasta un PH 7,5 - 8,5 mediante la adición de amoníaco acuoso, carbonato amónico acuoso o solución de bicarbonato amónico acuoso. La concentración del péptido estaba entre 0,1 y 2,0 mg/ml. La mezcla se agitó al aire durante 24 - 48 horas, se acidificó hasta un pH de 3 con ácido trifluoroacético acuoso y después se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo en agua. Las fracciones que contienen el material deseado se combinaron y los péptidos se aislaron mediante liofilización.

Método 3 para el sintetizador ACT 496 MOS

Los péptidos se sintetizaron usando un sintetizador Advanced ChemTech ACT 496 MOS como en el método 1. La carga baja (~ 0,2 mmol/g) de resina GGK(Boc)-NovaSyn-TGR se usó para la síntesis peptídica. El disolvente de

acoplamiento fue NMP/DMSO 8:2. La síntesis se realizó a escala de 0,02 mmol usando un tiempo de acoplamiento de 3 horas. Los péptidos lineales brutos se procesaron adicionalmente como se ha descrito para el método 1.

Método 4 para el sintetizador ACT 496 MOS

Los péptidos se sintetizaron usando el método 3 en el ACT 496 con HBTU/DIEA como los reactivos de acoplamiento y NMP como el disolvente. Como la base se usó 2,4,6-colidina como una solución 1M. La baja carga de resina Fmoc-GGK (ivDde)-Novsyn-TGR (~ 0,2 mmol/f) para la síntesis peptídica. El tiempo de acoplamiento fue de 30 minutos. Los péptidos lineales brutos se procesaron adicionalmente como se ha descrito para el método 1.

Método 5 para el sintetizador ABI 433A

La síntesis de los péptidos se llevó a cabo en una escala de 0,25 mmol usando el protocolo FastMoc (Applied Biosystems Inc). En cada ciclo de este protocolo se disolvió 1,0 mmol de un aminoácido protegido seco en un cartucho en una solución de 0,9 mmol de HBTU, 2 mmol de DIEA y 0,9 mmol de HOBt en DMF con NMP adicional añadido.

Los péptidos se fabricaron usando 0,1 mmol de resina NovaSyn TGR (amida de Rink) (sustitución de resina 0,2 mmol/f). El tiempo de acoplamiento en este protocolo fue de 21 min. La desprotección de Fmoc se llevó a cabo con 20 % de piperidina en NMP. Al final del último ciclo, el péptido sintetizado se acetiló usando anhídrido acético/DIEA/HOBt/NMP. La resina peptídica se lavó y se secó para manipulaciones adicionales o se escindió de la resina (usando el reactivo B). En general, los péptidos escindidos se ciclaron como en el método 1 antes de la purificación.

Método 6: Biotinilación de péptidos unidos a resina

Los péptidos se prepararon usando el método 5. El grupo protector ivDde de la lisina en C-terminal se eliminó de forma selectiva mediante tratamiento con 10 % de hidracina en DMF. La resina se trató después con una solución de biotina-éster N-hidroxisuccinimidílico en DMF en presencia de DIEA. Después de lavar, se secó la resina y se realizó la escisión usando reactivo B. La resina se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El péptido biotinilado se disolvió en DMSO neto y se trató con DIEA y se agitó durante 4 - 6 efectuando la ciclación de disulfuro. El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa.

En un experimento típico, 200 mg de péptido unido a la resina se trataron con 10 % de hidracina en DMF (2 X 20 ml) y se lavaron con DMF (2 x 20 ml) y después con diclorometano (1 x 20 ml). La resina se resuspendió en DMF (10 ml) y se trató con una solución de éster de biotina-NHS (0,2 mmol, 5 equivalentes) y DIEA (0,2 mmol) y la resina se mezcló con los reactivos durante 4 horas. La finalización de la reacción se comprobó mediante la prueba de la ninhidrina. Después, el péptido se liberó de la resina mediante tratamiento con reactivo B (10 ml) durante 4 horas. La resina se filtró, se eliminó el reactivo B *al vacío* y el péptido se precipitó mediante la adición de éter anhidro. Se recolectó el sólido formado, se lavó con éter y se secó. El sólido se disolvió en DMSO anhidro y la mezcla se ajustó hasta un pH 7,5 co DIEA y se agitó durante 4 - 6 efectuando la ciclación de disulfuro. La reacción de ciclación se monitorizó mediante HPLC analítica. Después de la finalización de la ciclación, la solución de la mezcla se diluyó con 25 % de acetonitrilo en agua y se purificó directamente mediante HPLC en una columna de C18 de fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo en agua (ambos con 0,1 % de TFA). Las fracciones se analizaron mediante HPLC analítica y las que contienen el producto puro se recolectaron y liofilizaron obteniendo el péptido biotinilado requerido.

Método 7: Biotinilación de péptidos purificados

El péptido purificado (10 mg, preparado mediante los métodos 1-5) que contiene un grupo amino libre se disolvió en DMF o DMSO anhidro (1 ml) y se añadió biotina-NHS-éster (5 equivalentes) y DIEA (5 equivalentes). La reacción se monitorizó mediante HPLC y tras la finalización de la reacción (1 - 2 horas), la mezcla de reacción bruta se purificó directamente mediante HPLC preparativa. Las fracciones se analizaron mediante HPLC analítica y las que contienen el producto puro se recolectaron y liofilizaron obteniendo el péptido biotinilado requerido.

Método 8: Biotinilación de péptidos unidos a resina que contienen engarces

En un experimento típico, 400 mg del péptido que contiene resina (fabricado usando el sintetizador ABI 433A y portando una lisina protegida con ivDde) se trataron con 10 % de hidracina en DMF (2 X 20 ml). La resina se lavó con DMF (2 x 20 ml) y DCM (1 x 20 ml). La resina se resuspendió en DMF (2 X 20 ml) y se trató con Fmoc-ácido aminodioxaoctanoico (0,4 mmol), HOBt (0,4 mmol), DIC (0,4 mmol), DIEA (0,8 mmol) mezclando durante 4 horas. Después de la reacción, la resina se lavó con DMF (2 X 10 ml) y con DCM (1 x 10 ml). La resina se trató después con 20 % de piperidina en DMF (2 x15 ml) durante 10 minutos cada vez. La resina se lavó y el acoplamiento con Fmoc-ácido diamindioxaoctanoico y la eliminación del grupo protector Fmoc se repitieron una vez más. La resina resultante, que contiene un péptido con un grupo amino libre, se trató con una solución de biotina-NHS éster (0,4 mmol, 5 equivalentes) y DIEA (0,4 mmol, 5 equivalentes) en DMF durante 2 horas. La resina-péptido se lavó y se

secó como se ha descrito anteriormente y después se trató con el reactivo B (20 ml) durante 4 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se agitó con éter produciendo un sólido que se recogió, se lavó con éter y se secó. El sólido se disolvió en DMSO anhidro y el pH se ajustó hasta 7,5 con DIEA. La mezcla se agitó durante 4 - 6 horas efectuando la reacción de ciclación con disulfuro, que se monitorizó mediante HPLC analítico. Tras la finalización de la ciclación, la solución de DMSO se diluyó con 25 % de acetonitrilo en agua y se aplicó directamente a una columna C-18 de fase inversa. La purificación se efectuó usando un gradiente de acetonitrilo en agua (ambos con 0,1 % de TFA). Las fracciones se analizaron mediante HPLC analítica y las que contienen el producto puro se recolectaron y liofilizaron proporcionando el péptido biotinilado requerido.

10 Método 9: Formación de péptidos marcados con 5-carboxifluoresceína

La resina-péptido obtenida mediante el método 5, que contiene un grupo protector ivDde en el nitrógeno épsilon de la lisina, se mezcló con una solución de hidracina en DMF (10 % de hidracina/DMF, 2 x 10 ml, 10 min) eliminando el grupo ivDde. El nitrógeno épsilon de la lisina se marcó con fluoresceína-5-isotiocianato (0,12 mmol) y diisopropiletilamina (0,12 mmol) en DMF.

La mezcla se agitó durante 12 horas (compuestos que contienen fluoresceína se protegieron de la luz). La resina se lavó después con DMF (3 x 10 ml) y dos veces con CH₂Cl₂ (10 ml) y se secó en nitrógeno durante 1 hora. El péptido se escindió de la resina usando el reactivo B durante 4 horas y la solución se recogió mediante filtración. Los volátiles se eliminaron a presión reducida y el residuo se secó al vacío. El péptido se precipitó con éter, se recolectó y el precipitado se secó en una corriente de nitrógeno. El precipitado se añadió a agua (1 mg/ml) y el pH de la mezcla se ajustó hasta 8 con 10 % de meglumina acuosa. La ciclación del péptido se llevó a cabo durante 48 horas y la solución se liofilizó. El péptido cíclico bruto se disolvió en agua y se purificó mediante RP-HPLC en una columna de C 18 con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (ambas fases contenían 0,1 % de TFA). Las fracciones que contienen el producto bruto se recogieron y se liofilizaron. Los péptidos se caracterizaron mediante ES-EM y la pureza se determinó mediante RP-HPLC (gradiente lineal de acetonitrilo en agua/0,1 % de TFA).

Método 10: Preparación de quilato peptídico para la unión a Tc mediante acoplamiento de aminoácidos sencillos

Los péptidos se sintetizaron a partir de 0,1 mmol de resina NovaSyn-TGR (0,2 mmol/g de sustitución). La resina desprotegida (ivDde) se trató después de acuerdo con el protocolo A para la incorporación de Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH y Fmoc-Ser(tBu)-OH.

Protocolo A para acoplamiento manual de un aminoácido sencillo:

1. Tratar con 4 equivalentes del correspondiente Fmoc-aminoácido y 4,1 equivalentes de HOBt y 4,1 equivalentes de DIC durante 5 horas.

2. Lavar con DMF (3 X 10 ml)

3. Tratar con 20 % de piperidina en DMF (2 X 10 ml, 10 mn)

4. Lavar con DMF (3 X 10 ml)

La resina cargada con el péptido protegido con Fmoc se trató después con 20 % de piperidina en DMF (2 x10 ml, 10 min) y se lavó con DMF (3 X 10 ml). Después se añadió una solución de N,N-dimetilglicina (0,11 mmol), HATU (1 mmol) y después se añadió DIEA (0,11 mmol) en DMF (10 ml) a la resina cargada con el péptido y el acoplamiento manual continuó durante 5 horas, tras la reacción se lavó la resina con DMF (3 X 10 ml) y CH₂Cl₂ (3 x 10 ml) y se secó *al vacío*.

Método 11: Formación de péptidos mercaptoacetilados usando N-hidroxisuccinimida éster de ácido S-acetilgliocólico

A una solución de un péptido (0,005 mmol, obtenido mediante los métodos 1 -5 con una amina libre) en DMF (0,25 ml) se añadió N-hidroxisuccinimida de éster de ácido S-acetilgliocólico (SATA) (0,0055 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Las fracciones que contienen el producto bruto se recogieron y se liofilizaron, dando el péptido mercaptoacetilado. El péptido mercaptoacetilado se caracterizó mediante ES-EM y la pureza se determinó mediante análisis HPLC de fase inversa usando un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (ambos con 0,1 % de TFA).

Método 12:

La formación de los péptidos mercaptoacetilados usando péptidos purificados de ácido S-acetilgliocólico purificado del método 5, tras la ciclación de disulfuro se acopló con ácido S-acetilgliocólico (1,5 - 10 eq.)/HOBt (1,5-10 eq.)/DIC (1,5-10 eq.) en NMP durante 2-16 horas a temperatura ambiente. La mezcla se purificó después mediante HPLC preparativa; las fracciones que contienen péptido puro se combinaron y se liofilizaron. En el caso de los

compuestos con otra lisina protegida por un grupo ivDde, la reacción de desprotección empleó 2 % de hidracina en DMSO durante 3 horas a temperatura ambiente. La purificación de la mezcla de reacción dio el péptido puro.

- 5 En el caso de cuando se prepara un compuesto con ácido S-acetilgliocólico acoplado a dos grupos de ácido aminodioxaoctanoico y el péptido, el péptido purificado del método 5 (que tiene un grupo amino libre) se acopló a AcSCH₂CO-(NH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CO)₂-OH (30 eq.)/HOBt (30 eq.)/DIC (30 eq.) en NMP durante 40 horas a temperatura ambiente. La mezcla se purificó y el grupo ivDde se eliminó. Una segunda purificación dio el producto final como un liofilizado blanco.
- 10 Como alternativa, el Fmoc-ácido aminodioxaoctanoico se acopló dos veces de forma sucesiva al péptido (producido mediante el método 5) seguido de la eliminación de Fmoc y acoplamiento a ácido S-acetilgliocólico.

Método 13: Preparación de homo y heterodímeros

- 15 Los péptidos purificados requeridos se prepararon mediante SPPS usando el método 5. Preparando los homodímeros, la mitad del péptido necesario para preparar el dímero se disolvió en DMF y se trató con 10 equivalentes de bis-N-hidroxisuccinimidiléster de ácido glutárico. La progresión de la reacción se monitorizó mediante análisis HPLC y espectroscopia de masas. Al finalizar la reacción se eliminaron los volátiles *al vacío* y al residuo se lavó con acetato de etilo eliminando el bis-NHS-éster sin reaccionar. El residuo se secó, se redisolvió en
- 20 DMF anhidro y se trató con otra media porción del péptido en presencia de 2 equivalentes de DIEA. La reacción se dejó proceder durante 24 horas. Esta mezcla se aplicó directamente a una columna de HPLC de fase inversa Waters Associates C-18 XTerra y se purificó mediante elución con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos 0,1 % de TFA).
- 25 En el caso de los heterodímeros, uno de los monómeros reaccionó con el bis-NHS-éster de ácido glutárico y tras lavar el exceso del bis-NHS-éster se añadió el segundo péptido en presencia de DIEA. Tras la reacción la mezcla se purificó mediante HPLC preparativa.

Ejemplo 4: Preparación de polipéptidos de unión a KDR y VEGF/KDR

- 30 Usando los métodos expuestos con anterioridad se prepararon las versiones biotiniladas de los polipéptidos de unión a KDR y el complejo de VEGF/KDR expuestos en la tabla 3. La letra "J" en las secuencias peptídicas hace referencia a un grupo espaciador o engarce, 8-amino-3,6-dioxaoctanoilo.
- 35 La capacidad de los polipéptidos biotinilados (con el espaciador JJ) para unirse a KDR se evaluó usando el ensayo expuesto en el ejemplo 5, siguiendo los procedimientos divulgados en el mismo. Varios péptidos biotinilados se unieron bien a las células que expresan KDR. SEC ID N.º: 66 (K_D 1,81 nM +/-0,27), SEC ID N.º: 5 (K_D 14,87+/-5,0 nM, media de cuatro experimentos), SEC ID N.º: 31 + espaciador (K_D 10,00+/-2,36 nM, media de cuatro experimentos), SEC ID N.º: 49 (K_D 6,94+/-1,94 nM, un experimento) y SEC ID N.º: 50 (K_D 3,02+/-0,75 nM, un experimento).
- 40

Tabla 3: Polipéptidos de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR

SEC ID N.º	Estructura (o) Secuencia	P. Mol.	EM
31	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYPGGGK-NH ₂	2801,98	1399,6 [M-H] ⁻
5	Ac-AGPKWC EE DWYYCMITGTGGGK-NH ₂	2361	-
7	Ac-AGWVECWWKSGQCYEFGTGGGK-NH ₂	2474,06	-
44	Ac-AQEGWFRNPQEIMGFSDWDKPGGGK-NH ₂	2934,35	-
31	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYPGGGK (Biotina)-NH ₂	3030,29	1512,4 [M ²]
45	Ac-AQRGDYQEYWHQQLVEQLK(iv-Dde) LLGGGK-NH ₂	3318,71	1659,1 [M ²]
45	Ac-AQRGDYQEYWHQQLVEQLKLLGGGK-NH ₂	3112,58	-
46	Ac-AGWYWCDDYYGIGCK(iv-Dde)WTGGGK-NH ₂	2673,18	
47	Ac-AGWYWCDDYYGIGCKWTGTGGGK-NH ₂	2467,05	
48	Ac-AQWYYDWFHNQRKPPSDWIDNLGGGK-NH ₂	3218,51	-
5	Ac-AGPK(iv-Dde)W CE EDWYYCMITGTGGGK-NH ₂	2698,11	2695,7 [M-H] ⁻ , 1347,8 [M-2H] ²⁻ /2
5	Ac-AGPKWC EE DWYYCMITGTGGGK (Biotina)-NH ₂	2718,13	2833,4 (M-H)-

5	Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3008,44	1502,6,4 [M-2H] ² /-2
5	Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (AcSCH ₂ C(=O)-)-NH ₂	2608,96	1304, [M-2H] ² /-2
31	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (Biotina-JJ)-NH ₂	3316,4	1657,8, [M-2H] ² /-2
31	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (AcSCH ₂ C(=O)-)-NH ₂	2917,15	1457,4, [M-2H] ² /-2
31	Biotina-JJGDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH ₂	3272,34	1636,7, [M-2H] ² /-2
5	Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGT-GGGK (AcSCH ₂ C(=O)-JJ)-NH ₂	2899,28	1449,2, [M-2H] ² /-2
17	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3066,27	1532,8, [M-2H] ² /-2
49	Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	2903,24	1449,3, (M-2H) ² -2/2965,8, (M-3H) ³ -3
50	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK(Biotina-JJ)-NH ₂	3042,44	1519,7, (M-2H) ² -2/2-1012,8 (M-3H) ³ -3
31	Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (AcSCH ₂ C(=O)-JJ)-NH ₂	3208,48	1602,6, [M-2H] ² /-2
17	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (AcSCH ₂ C(=O)-JJ)-NH ₂	2907,29	1453,1, [M-2H] ² /-2
51	Ac-AQAHPWPWRPVAVDALFDWVEGG-GGGK (Biotina-JJ)-NH ₂	3404,64	1701,6, [M-2H] ² /-2
52	Ac-AQAHPWWPLAVDAQEDWFEVG-GGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3493,59	1746,2, [M-2H] ² /-2
53	Ac-AQAQMPWWPLAVDALFDWFEVG-GGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3487,64	1743,2, [M-2H] ² /-2
54	Ac-AQDWYWREWMPMHAQFLADDWGG-GGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3751,64	1874,3, [M-2H] ² /-2
55	Ac-AQPVTDWTPHHPK(iv-Dde)APDVWLFYT-GGGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3781,86	1890,4, [M-2H] ² /-2
56	Ac-AQDALEAPK(iv-Dde)RDWYWDWFLNHSP-GGGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3897,85	1948,0, [M-2H] ² /-2
57	Ac-KWCEEDWYYCMITGTGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	2781,2	1390,0, [M-2H] ² /-2
58	Ac-AGPKWCEEDWYYCMIGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	2747,15	1373,5, [M-2H] ² /-2
59	Ac-KWCEEDWYYCMIGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	2522,04	1260,8, [M-2H] ² /-2
60	Ac-AQPDNWK(iv-Dde)EFYESGWK(iv-Dde)YPSLYK(iv-Dde)PLGGGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	4377,2	2188,4, [M-2H] ² /-2
61	Ac-AQMPPGFSYWEQWLHDDAQLVGG-GGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3499,7	1749,2, [M-2H] ² /-2
62	Ac-AQARMGDDWEEAPPHEWGADGG-GGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3480,5	1740,2, [M-2H] ² /-2
63	Ac-AQPEDSEAWYWLNYRPTMFHQLGG-GGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	3751,7	1875,8, [M-2H] ² /-2
64	Ac-AQSTNGDSFVYWEELVDHPGG-GGGK (Biotina-JJ)-NH ₂	3554,6	1776,4, [M-2H] ² /-2
65	Ac-AQWESDYDQMRQLK(iv-Dde)TAYMK (iv-Dde)VGGGGGK(Biotina-JJ)-NH ₂	4187,02	2093,0, [M-2H] ² /-2
66	Ac-AQDWYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK (Biotina-JJ)-NH ₂)-NH ₂	3641,69	1820,9, [M-2H] ² /-2

Los supuestos restos de péptidos cíclicos constreñidos por disulfuro están subrayados.

Ejemplo 5: Unión del complejo de los péptidos de unión a KDR/avidina HRP a células 293H transfectadas con KDR

5 Determinando la unión de los péptidos identificados mediante expresión en fagos al KDR expresado en células 293H transfectados de forma transitoria se desarrolló un nuevo ensayo que mide la unión de péptidos biotinilados en complejo con neutravidina HRP a KDR sobre la superficie de las células transfectadas. Este ensayo se usó detectando de forma selectiva los péptidos biotinilados indicados en el ejemplo 4. La neutravidina HRP se usó en lugar de estreptavidina o avidina porque tiene menor unión inespecífica a otras moléculas distintas a biotina debido a la ausencia de restos de hidratos de carbono de unión a lectinas y también debido a la ausencia del dominio TYD de unión al receptor de adhesión celular en neutravidina.

15 En los experimentos descritos en el presente documento se prepararon complejos tetraméricos de los péptidos de unión a KDR SEC ID N.º: 31, SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 17 y SEC ID N.º: 66 y un péptido control, que no se une a KDR y se analizó su capacidad de unirse a las células 293H que se transfectaron de forma transitoria con KDR. Los cuatro complejos tetraméricos de los péptidos de unión a KDR se biotinilaron y contenían el espaciador JJ y se unieron a células que expresaban KDR; no obstante, la SEC ID N.º: 66 exhibió la mejor K_D (1,81nM). Los complejos tetraméricos de los péptidos de unión a KDR SEC ID N.º: 31, SEC ID N.º: 5, exhibieron mejor unión sobre los monómeros de los mismos péptidos. Además, la inclusión de un espaciador entre el péptido de unión a KDR y se mostró que la biotina mejoraba la unión en el experimento B.

En el experimento C se mostró que este ensayo se puede usar evaluando el efecto del suero sobre la unión de péptidos como se usa en la invención a KDR y al complejo VEGF/KDR. La unión de las SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 31 y SEC ID N.º: 66 no se vio significativamente afectada por la presencia de suero, mientras que la unión de la SEC ID N.º: 17 se redujo más del 50 % en presencia de suero.

En el experimento D se demostró que este ensayo es útil en la evaluación de distintas combinaciones de polipéptidos de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR para usar en construcciones dirigidas multiméricas que contienen más de un polipéptido de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR. Además, los experimentos D y E establecen que las construcciones tetraméricas que incluyen dos o más péptidos de unión a KDR que se unen a diferentes epítomos exhibieron mejor unión a construcciones tetraméricas "puras" de los péptidos dirigidos solos.

Experimento A

Preparación de ARNm y biblioteca de ADNc preparada 5' RACE

Las células HUVEC se cultivaron hasta casi un 80 % de confluencia en matraces de cultivo tisular de 175 cm² (Becton Dickinson, Biocoat, N.º: de cat. 6478) y después se añadieron 10 ng/ml de bFGF (Oncogene, N.º: de cat. PF003) durante 24 horas induciendo expresión de KDR. El ARNm se aisló usando el kit micro-fast track 2.0 de Invitrogen (N.º: de cat. K1520-02). Se obtuvieron 12 µg de ARNm (medido mediante absorbancia a 260 nM) de dos matraces (Aproximadamente 30 millones de células) siguiendo las instrucciones del kit. Se realizó transcripción inversa generando ADNc con 2 µg de ARNm, cebador oligo dT ((5'-(T)25GC-3') y/o oligo smart II ((5'AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3') (SEC ID N.º: 67) usando la transcriptasa inversa del virus de leucemia murina Moloney (MMLV). La reacción se realizó en un volumen total de 20 µl y la mezcla de reacción contenía 2 µl de ARN, 1 µl de oligo smart II, 1 µl del cebador oligo dT, 4 µl de 5x tampón de la primera hebra (Tris HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 30 mM) 1 µl de DTT (20 mM, también suministrado con transcriptasa inversa), 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP en ddH₂O, Stratagene, N.º: de n.º de cat. 200415), 9 µl de ddH₂O y 1 µl de transcriptasa inversa de MMLV (Clontech, n.º de cat. 8460-1). La reacción de transcripción inversa se realizó durante 90 minutos a 42 °C y la reacción se detuvo añadiendo 250 µl de tampón oftricina-EDTA (tricina 10 mM, EDTA 1,0 mM). El producto de la transcripción inversa, una biblioteca de ADNc preparada 5' RACE, se puede almacenar durante 3 meses a -20° C. Obsérvese que toda el agua usada para la aplicación de ADN y ARN estaba libre de DNAsa y RNAsa de USB (N.º: n.º de cat. 70783).

Clonación de s-KDR en el vector TOPOII

Con el fin de clonar s-KDR, se usaron un 5' oligo (G ATG GAG AGC AAG GTG CTG CTG G) (SEC ID N.º: 68) y un oligo 3' (C CAA GTT CGT CTT TTC CTG GGC A) (SEC ID N.º: 69). Estos se diseñaron para amplificar el dominio extracelular completo de KDR (~ 2,2 kpb) de la biblioteca de ADNc preparada 5' RACE (preparada anteriormente) usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ufp de polimerasa (Stratagene, n.º: de cat. 600135). La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µl y la mezcla de reacción contenía 2 µl de la biblioteca de ADNc preparada 5' RACE, 1 µl de 5' oligo (10 µM), 1 µl de 3' oligo (10 µM), 5 µl de 10X tampón para PCR [tampón para PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,8, MgSO₄ 20 mM, KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM suministrado con ufp de enzima más 1 % de DMSO y 8 % de glicerol], 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM) y 40 µl de ddH₂O. La reacción de PCR se realizó usando un programa fijado para 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 68 °C y 4 minutos a 72 °C. El producto de la PCR se purificó mediante extracción con 1 volumen de fenol, seguido de extracción con 1 volumen de cloroformo y se precipitó usando 3 volúmenes de etanol y 1/10 volúmenes de acetato sódico 3M. El producto de la PCR se resuspendió en 17 µl de ddH₂O, los 2 µl de 10 x tampón de Taq polimerasa (Tris-HClO 100 Mm, pH 8,8, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, 0,01 % de gelatina) y 1 µl de Taq polimerasa (Stratagene, N.º: de cat. 600131) se añadieron generando un saliente A en cada extremo del producto. Después de incubar durante 1 hora a 72 °C, el producto modificado se clonó directamente en un vector TOPOII (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante dando TOPO-sKDR. El vector TOPO permite la fácil clonación de los productos de PCR por el saliente A en los productos de la PCR tratados con la Taq (enzima de PCR).

Clonación de los dominios transmembrana y citoplasmático de KDR en el vector TOPO II

Con el fin de clonar los dominios transmembrana y citoplasmático de KDR se usaron un 5' oligo (TCC CCC GGG ATC ATT ATT CTA GTA GGC ACG GCG GTG) (SEC ID N.º: 70) y un oligo 3' (C AGG AGG AGA GCT CAG TGT GGT C) (SEC ID N.º: 71). Estos se diseñaron para amplificar los dominios transmembrana y citoplasmático de KDR (~ 1,8 kpb) de la biblioteca de ADNc preparada 5' RACE (descrita anteriormente) usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ufp de polimerasa. Las condiciones de la reacción de PCR y el programa eran exactamente los mismos que se ha descrito anteriormente para s-KDR. Justo como con la secuencia de s-KDR, el producto de PCR se purificó usando extracción en fenol-cloroformo, se trató con la Taq polimerasa y se clonó en el vector TOPO II de Invitrogen dando TOPO-CYTO.

Clonación de KDR de longitud total en el vector pcDNA6

Creando el receptor de longitud total se amplificaron el dominio extracelular y el dominio citoplasmático (con el dominio transmembrana) mediante PCR aparte de TOPO-sKDR y TOPO-CYTO respectivamente y se ligaron más tarde creando el receptor de longitud total. Se usaron un oligo con un sitio Not 1 en el extremo 5' y un oligo complementario al extremo 3' del dominio extracelular (A TAA GAA TGC GGC CGC AGG ATG GAG AGC AAG GTG CTG CTG G) (SEC ID N.º: 72) y un oligo complementario al extremo 3' del dominio extracelular (TTC CAA GTT CGT CTT TTC CTG GGC ACC) (SEC ID N1 73) amplificando por PCR el dominio extracelular de TOPO-sKDR. De un modo similar, el oligo en 5' (ATC ATT ATT CTA GTA GGC ACG GCG GTG) (SEC ID N.º: 74) y el oligo en 3' con un sitio Not1 (A TAA GAA TGC GGC CGC AAC AGG AGG AGA GCT CAG TGT GGT C) (SEC ID N.º: 75) se usaron amplificando por PCR el dominio citoplasmático de KDR (con dominio transmembrana) de TOPO-CYTO. Ambos productos de PCR se digirieron con Not1 y se ligaron juntos creando el receptor de longitud completa. El ADNc que codifica el receptor de longitud completa se purificó en gel de agarosa y se ligó en el sitio Not I del vector pcDNA6/V5-HisC. La purificación del ADN y la unión se realizaron como se ha descrito anteriormente para psKDR. La reacción de unión se usó transformando un cultivo de bacterias DH5α y una serie de clones individuales se analizaron determinando la presencia y orientación del inserto por análisis de restricción del plásmido purificado de cada clon con la enzima EcoRI.

Cultivo celular

Las células 293H se obtuvieron de Invitrogen (N.º: n.º de cat. 11631) y se cultivaron en cultivo de monocapa en su medios recomendados más 1 ml/l de pen/strep (Invitrogen, N.º: n.º de cat. 15140-148). Todas las células se cultivaron en presencia de antibiótico para cultivo diario, pero se dividieron en medio sin antibiótico durante 16 - 20 horas antes de la transfección.

Preparación del ADN para transfección

Bacterias DH5α de *E. coli* que contenían pF-KDR se sembraron en LB con 50 µg/ml de ampicilina (agar LB de US biologicals, n.º de cat 75851 y ampicilina de Sigma, n.º de cat. A2804) de una reserva de glicerol y las placas se dejaron en un incubador a 37 °C creciendo durante la noche. A la mañana siguiente se escogió una única colonia de la placa y se cultivó en 3 ml de medio LB/ampicilina (LB de US biologicals, n.º de cat. US75852) a 37 °C. Tras 8 horas, 100 µl de cultivo bacteriano del tubo de 3 ml se transfirieron a 250 ml de medio LB/ampicilina para incubación durante la noche a 37 °C. Las bacterias se cultivaron con agitación circular en un frasco de 500 ml (Beckman, n.º de cat. 355605) a 220 rpm en un incubador agitador Lab-Line. Al día siguiente, el cultivo bacteriano se procesó usando el kit maxi-prep (QIAGEN, n.º de cat. 12163). Generalmente se obtuvo aproximadamente 1 mg de ADN plasmídico (cuantificado mediante la absorbancia a 260 nm) de 250 ml de cultivo bacteriano.

Transfección de células 293H en una placa de 96 pocillos

La transfección se realizó como se recomienda en el protocolo de lipofectamina 2000 (Invitrogen, n.º de cat. 11668-019) usando una placa de 96 pocillos revestida con poli-D-lisina. Se usaron 320 ng de ADN de KDR (pc-DNA6-fKDR)/por pocillo en 0,1 ml para la transfección en 96 pocillos. La transfección se realizó en medio con suero, la mezcla de reactivos de transfección se eliminó de las células tras 6-8 horas y se sustituyó con medio con suero habitual. La transfección se realizó en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, n.º de cat. 354640). La mitad izquierda de la placa (48 pocillos) se transfectó de forma simulada (sin ADN) y la mitad derecha de la placa se transfectó con ADNc de KDR. Las células fueron un 80 - 90 % confluentes en el momento de la transfección y completamente confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo, o el ensayo se detuvo.

Preparación de medio M199

Con el fin de preparar medio M199 para el ensayo, a 950 ml de ddH₂O se añadió un paquete de medio M199 (GIBCO, n.º de cat. 31100-035), 20 ml de HEPES 1 mM (GIBCO, n.º de cat. 15630-080) y 2 g de gelatina DIFCO (DIFCO, cat. y el pH de la solución se ajustó a 7,4 añadiendo aproximadamente 4 ml de NaOH 1N. Después de ajustar el pH, el medio M199 se calentó hasta 37 °C en un baño de agua durante 2 horas disolviendo la gelatina, después se esterilizó por filtración usando filtros de 0,2 µm (Coming, cat. y se almacenó a 4 °C para usar más tarde en el ensayo.

Preparación de avidina-sefarosa de liberación suave SoftLink

La *avidina-sefarosa de liberación suave SoftLink* se preparó centrifugando la sefarosa obtenida en Promega (n.º de cat. V2011) a 12.000 rpm durante 2 minutos, lavando dos veces con agua helada (centrifugando entremedias de los lavados) y resuspendiendo el sedimento en agua helada obteniendo una pasta al 50 % en ddH₂O. Para cada experimento se preparó una pasta fresca al 50 % de avidina-sefarosa-

Preparación de la solución péptido/neutravidina HRP

Los péptidos biotinilados SEC ID N.º: 31, 5, 17, 66 y el péptido control biotinilado de no unión se usaron preparando

soluciones de reserva de 250 μ M en 50 % DMSO y una solución de reserva 33 μ M de neutravidina-HRP mediante disolución de 2 mg de neutravidina-HRP (Pierce, n.º de cat. 31001) en 1 ml de ddH₂O (todos los polipéptidos contenían el espaciador JJ). Las soluciones de reserva de péptidos se almacenaron a -20 °C, mientras que la solución de reserva de neutravidina-HRP se almacenó a -80° C. Preparando complejos de péptido/neutravidina-HRP, a 1 ml de medio M199 se añadieron 10 μ l de solución de reserva de péptido biotinilado 250 μ M y 10 μ l de la 33 μ M de neutravidina-HRP. Esta mezcla se incubó en un rotador a 4 °C durante 60 minutos, seguido de la adición de 20 μ l de sefarosa-avidina de liberación suave (50 % de pasta en ddH₂O) para eliminar el exceso de péptidos y otra incubación durante 30 minutos en un rotador a 4 °C. Por último, la avidina-sefarosa de liberación suave se sedimentó mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante resultante se usó para los ensayos. Para cada experimento se prepararon complejos frescos de péptido/neutravidina-HRP.

Preparación de diluciones de péptido/neutravidina HRP para el ensayo

Para los experimentos de unión por saturación se añadieron 120 μ l, 60 μ l, 20 μ l, 10 μ l, 8 μ l, 6 μ l, 4 μ l y 1 μ l del complejo péptido/neutravidina HRP a alícuotas de 1,2 ml de medio M199 creando diluciones con concentraciones finales de 33,33 nM, 16.65 nM, 5.55 nM, 2.78 nM, 1.67 nM, 1.11 nM y 0.28 nM del complejo, respectivamente.

Preparación de solución de bloqueo para células 293H transfectadas

La solución de bloqueo se preparó añadiendo 20 ml de medio M199 a 10 mg de neutravidina sin marcar liofilizada Pierce, n.º de cat. 31000). Se usó solución de bloqueo fresca para cada experimento.

Ensayo para detectar la unión de péptido/neutravidina-HRP

24 horas después de la transfección cada pocillo de las células 293H se lavó una vez con 100 μ l de medio M199 y se incubó con 80 μ l de solución de bloqueo a 37 °C. Tras una hora, las células se lavaron dos veces con 100 μ l de medio M199 y se incubaron con 70 μ l de diluciones de *péptido/neutravidina-HRP del péptido control, SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 31, SECU N1 17 y SEC ID N.º: 66* durante dos horas y media a temperatura ambiente. Cada dilución se añadió a tres pocillos distintos de células 293H transfectadas de forma simulada y con KDR (se usaron dos placas para cada experimento de unión por saturación). Tras incubación a temperatura ambiente, se transfirieron las placas a 4 °C durante otra media hora de incubación. Después, las células se lavaron 5 veces con medio M199 helado y una vez con PBS helado (en este orden). Después de lavado final, 100 μ l de solución de RMB helada (KPL, cat. Se añadieron a cada pocillo y cada placa se incubó durante 30 minutos a 37 °C en un incubador de aire. Por último, la reacción de la enzima HRP se detuvo añadiendo 50 μ l de ácido fosfórico 1N a cada pocillo y la unión se cuantificó midiendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas (BioRad Model 3550).

Unión del péptido/neutravidina HRP a las células transfectadas con KDR

En este ensayo, los complejos del péptido control, SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 31, SEC ID N.º: 17 y SEC ID N.º: 66, cada uno biotinilado con el espaciador JJ y conjugado con neutravidina-HRP, se prepararon como se ha descrito anteriormente y se analizó su capacidad para unirse a las células 293H que se habían transfectado de forma transitoria con KDR. Durante la preparación del complejo péptido/neutravidina se usó un exceso por 7,5 de péptidos biotinilados sobre la neutravidina HRP garantizando que los cuatro sitios de unión a biotina sobre neutravidina estaban ocupados. Después de la formación del complejo, el exceso de péptidos biotinilados libres se retiró usando avidina-sefarosa de liberación suave evitando cualquier competición entre los péptidos biotinilados libres y los péptidos biotinilados en complejo con neutravidina HRP. El experimento se realizó a varias concentraciones diferentes de péptido/neutravidina-HRP, de 0,28 nM a 33,33 nM, generando curvas de unión por saturación para las SEC ID N.º: 5 y SEC ID N.º: 31 (figura 1A) y 0,28 a 5,55 nM generando curvas de unión por saturación para las SEC ID N.º: 17 y SEC ID N.º: 66 (figura 1B). Con el fin de dibujar la curva de unión por saturación, la unión de fondo a las células y transfectadas simuladas se restó de la unión a células transfectadas con KDR para cada complejo péptido/neutravidina HRP distinto a cada concentración analizada. Por tanto, la absorbancia en el eje Y de la figura 1 (más adelante) es absorbancia diferencial (KDR menos simulado) y no la absorbancia absoluta. El análisis de los datos de unión por saturación en la figura 1 usando el software Graph Pad Prism (versión 3.0) dio una K_D de 10,00 nM (+/-2.36) para la SEC ID N.º: 31 tetramérica, 14.87 nM (+/-5.066) para la SEC ID N.º: 5 tetramérica, 4,031 nM (+/-0.86) para los complejos peptídicos de la SEC ID N.º: 17 tetramérica y 1,814 nM (+/-0.27) para la SEC ID N.º: 66 tetramérica. Estas constantes de unión son, como cabe esperar, menores que las medidas mediante FP contra la construcción KDRFc para los péptidos monodentados relacionados de SEC ID N.º: 31 (69 nM), SEC ID N.º: 5 (280 nM), SEC ID N.º: 42 (51 nM), pero similares al péptido monodentado de SEC ID N.º: 17 (3 nM). Como se esperaba, no se observó ninguna saturación de unión para el complejo péptido/neutravidina HRP de control (no aglutinante). La unión de los complejos péptido/neutravidina HRP (figura 2) con una única concentración (5,55 nM) se representó gráficamente para demostrar que se puede usar un experimento de una sola concentración para diferenciar entre un péptido de unión a KDR (SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 31 y SEC ID N.º: 17) y un péptido que no se une.

Experimento B

El experimento B se diseñó para el requisito del espaciador (JJ, tabla 3) entre las secuencias de unión a KDR (SEC ID N.º 31 y 5) y biotina. En este experimento se analizaron los péptidos biotinilados con y sin espaciador JJ (p. ej., SEC ID N.º: 5 biotinilada con espaciador JJ, SEC ID N.º: 5 sin el espaciador JJ, SEC ID N.º: 31 con un espaciador y SEC ID N.º: 31 sin el espaciador) y un péptido control biotinilado de no unión a KDR (con y sin espaciador, preparado como se ha indicado anteriormente) se usó como control. La estructura peptídica de todas las secuencias de unión a KDR se analizó en este experimento y se muestra en la figura 3.

Este experimento se realizó como se indica en el experimento A descrito anteriormente a excepción de que solo se realizó a una única concentración de 2,79 nM.

Resultados: A partir de los resultados mostrados en la figura 4 es evidente que el espaciador potencia la unión de la SEC ID N.º: 31 y la SEC ID N.º: 5. El espaciador entre la secuencia de unión y la biotina puede ser útil en la potenciación de la unión a la molécula diana mediante múltiples mecanismos. Primero, podría ayudar a reducir la hidrancia estérica entre cuatro péptidos biotinilados tras su unión a una única molécula de avidina. En segundo lugar, podría proporcionar longitud adicional necesaria para alcanzar múltiples sitios de unión disponibles en una única célula.

Experimento C

El experimento C se diseñó buscando el efecto del suero en la unión de las SEC ID N.º: 31, 5, 17 y 66. En este procedimiento, los complejos péptido biotinilado/avidina HRP se SEC ID N.º: 31, 5, 17 y 66 se analizaron en medio M199 (como se ha descrito anteriormente en el experimento A) con y sin 40 % de suero de rata. Este experimento se realizó como se describe en el experimento A a excepción de que solo se realizó a una única concentración de 6,66 nM para las SEC ID N.º: 31 y 5, 3,33 nM para la SEC ID N.º: 17 y 2,22 nM para la SEC ID N.º: 66. Cada uno de los polipéptidos estaba biotinilado y tenía el espaciador JJ.

Resultados: Los resultados de la figura 5 indican que la unión de las SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 31 y SEC ID N.º: 66 no se vio significativamente afectada por el 40 % de suero de rata, mientras que la unión de la SEC ID N.º: 17 fue más del 50 % menor en presencia de 40 % de suero de rata. Se observó un descenso de más de un 80 % en la unión de la SEC ID N.º: 17 marcada con Tc con Tc-quelato en presencia de 40 % de suero de rata (figura 24). Dado que el efecto del suero sobre la unión de la SEC ID N.º: 17 marcada con Tc es imitado en el ensayo de avidina HRP divulgado en el presente documento, este ensayo se puede usar evaluando rápidamente el efecto del suero sobre la unión del péptido(s) a KDR.

Experimento D

El experimento D se diseñó evaluando la unión de complejos tetraméricos de polipéptidos de unión a KDR y al complejo VEGF/KDR SEC ID N.º: 31 y la SEC ID N.º: 5, particularmente cuando las construcciones incluyeron al menos dos polipéptidos de unión a KDR. Los péptidos de unión a KDR y el péptido de unión control se prepararon como se ha descrito anteriormente. Este experimento se realizó usando el protocolo expuesto para el experimento A, a excepción de que los procedimientos indicados más adelante era únicos para este experimento.

Preparación de soluciones de péptido/neutravidina Las soluciones de reserva de 250 μ M de los péptidos biotinilados SEC ID N.º: 5, 31 y el péptido control se prepararon en 50 % de DMSO y una solución de reserva 33 μ M de neutravidina-HRP mediante disolución de 2 mg de neutravidina-HRP (Pierce, n.º de cat. 31001) en 1 ml de ddH₂O. Las soluciones de reserva del péptido se almacenaron a -20 °C, mientras que la solución de reserva de neutravidina-HRP se almacenó a -80 °C. Las secuencias de los péptidos biotinilados se muestran anteriormente. Preparando complejos de péptido/neutravidina HRP, a 1 ml de medio M199 se añadió un total de 5,36 μ l de la solución de reserva del péptido biotinilado (o una mezcla de soluciones peptídicas, dando moléculas peptídicas cuatro veces el número de moléculas de avidina HRP) y 10 μ l de neutravidina HRP 33 μ M. Esta mezcla se incubó en un rotador a 4 °C durante 60 minutos, seguido de la adición de 50 μ l de avidina-sefarosa de liberación suave (50 % de pasta en ddH₂O) eliminando el exceso de péptidos y otra incubación durante 30 minutos en un rotador a 4 °C. Por último, la avidina-sefarosa de liberación suave se sedimentó centrifugando a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante resultante se usó para los ensayos. Para cada experimento se prepararon complejos frescos de péptido/neutravidina-HRP.

Ensayo para detectar la unión de péptido/neutravidina-HRP: 24 horas después de la transfección, cada pocillo de las células 293H se lavó una vez con 100 μ l de medio M199 y se incubó con 80 μ l de solución de bloqueo a 37 °C. Tras una hora, las células se lavaron dos veces con 100 μ l de medio M199 y se incubaron con 70 μ l de péptido 3,33 nM (o mezcla de péptidos)/neutravidina HRP (preparadas mediante la adición de 10 μ l de reserva preparada anteriormente a 1 ml de medio M199) durante dos horas y media a temperatura ambiente. Cada dilución se añadió a tres pocillos distintos de células 293H transfectadas de forma simulada y con KDR. Tras incubación a temperatura ambiente, se transfirieron las placas a 4 °C durante otra media hora de incubación. Después, las células se lavaron cinco veces con medio M199 helado y una vez con PBS helado (en este orden). Después del lavado fina, se

añadieron a cada pocillo 100 µl de solución TMB helada (KPL, Gaithersburg, MD) y cada palca se incubó durante 30 minutos a 37 °C en un incubador de aire. Por último, la reacción de la enzima HRP se detuvo añadiendo 50 µl de ácido fosfórico 1N a cada pocillo y la unión se cuantificó midiendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas (BioRad Model 3550).

Resultados: Este experimento establece que las SEC ID N.º: 31 y la SEC ID N.º: 5 se unen a KDR de un modo multimérico y colaboran entre sí por la unión a KDR en células 293H transfectadas. Se usó un péptido control biotinilado que no se une a KDR. Como cabía esperar, un complejo tetramérico del péptido control con avidina-HRP no mostró un aumento de la unión a las células transfectadas con KDR. Los complejos tetraméricos de las SEC ID N.º: 31 y la SEC ID N.º: 5 se unieron a las células transfectadas con KDR significativamente mejor de lo que lo hacen las células transfectadas de forma simulada (véase la figura 6). No obstante, los tetrámeros de la SEC ID N.º: 31 se unieron mucho mejor que los tetrámeros de la SEC ID N.º: 5. Si el péptido control se añadió a la mezcla de péptidos usada formando los complejos tetraméricos, la unión a las células transfectadas con KDR disminuyó. La proporción de unión específica del tetrámero al monómero, dímero y trímero se calculó dividiendo la unión específica (obtenida restando la unión a las células transfectadas de forma simulada de las células transfectadas con KDR) del tetrámero, trímero y dímero de la del monómero. Los resultados indican que existe un efecto de colaboración de la multimerización de las SEC ID N1 5, 31 y 67 sobre la unión de las células transfectadas con KDR.

	<u>Tetrámero</u>	<u>Trímero</u>	<u>Dímero</u>
SEC ID N.º: 5	45,4	5 7,	4,3
SEC ID N.º: 31*	38,6	1	2,7
SEC ID N.º: 17	1	1,1	1,1
SEC ID N.º: 66	16	5,7	2,3

*la unión del péptido monomérico a 2,22 nM fue cero, por lo que las proporciones se calcularon usando la unión a 5,55 nM.

Una mezcla de 25 % de péptido control que no se une con 75 % de la SEC ID N.º: 5 no se unió significativamente sobre el fondo a las células transfectadas con KDR, lo que indica que la unión multivalente es crucial para el complejo SEC ID N.º: 5/avidina-HRP para permanecer unido a KDR a lo largo del ensayo. Este fenómeno también se mantuvo para la SEC ID N.º: 31, en la que la sustitución del 50 % del péptido con péptido control en el complejo tetramérico anuló casi toda la unión a KDR en las células transfectadas.

Sorprendentemente, una mezcla peptídica compuesta por el 50 % del péptido control con 25 % de la SEC ID N.º: 31 Y 25 % de la SEC ID N.º: 5 se unió bastante bien a las células transfectadas con KDR respecto a las células transfectadas de forma simulada, lo que indica que hay una gran ventaja apuntando a dos sitios o epítomos sobre la misma molécula diana. Además, se observó que los complejos tetraméricos que contienen diferentes proporciones de la SEC ID N.º: 31 y la SEC ID N.º: 5 (3:1, 2:2 y 1:3) todos se unieron mucho mejor a las células transfectadas con KDR que los tetrámeros puros en cualquier péptido, de acuerdo con la idea de que apuntar a dos sitios distintos sobre una molécula diana es superior a la unión multimérica a un solo sitio. Esto puede deberse a que la unión multimérica a una única diana requiere que la entidad de unión multimérica abarque dos o más moléculas diana distintas que estén lo bastante cercanas para que se una a ellas de forma simultánea, mientras que un engarce multimérico que se puede unir a dos o más sitios distintos en una única molécula diana no depende de hallar otra molécula diana dentro de su alcance para conseguir una unión multimérica.

Experimento E

El experimento E se diseñó para confirmar que la SEC ID N.º: 31 y la SEC ID N.º: 5 se unen a distintos sitios (epítomos) en KDR. Si estos péptidos se unen al mismo sitio en KDR deberán poder competir entre sí, aunque si se unen a diferentes sitios no competirán. Este experimento se realizó usando una única concentración de la solución de SEC ID N.º: 5 /avidina HRP (3,33 nM) en cada pocillo y añadiendo una concentración variable (0-2.5 mM) de péptido control biotinilado con espaciador, SEC ID N.º: 31 y la SEC ID N.º: 5, ninguna de ellas formaba complejo con avidina.

Resultados: A partir de la figura 7 es evidente que la SEC ID N.º: 5 no compete con la solución de SEC ID N.º: 5 /avidina HRP por la unión a células transfectadas con KDR, mientras que el péptido control y la SEC ID N.º: 31 no compiten con la solución de SEC ID N.º: 5 /avidina HRP por la unión a células transfectadas con KDR. Por tanto, la SEC ID N.º: 5 y la SEC ID N.º: 31 se unen a distintos sitios y complementarios en KDR.

Ejemplo 6: Unión de análogos de un péptido de unión a KDR a células que expresan KDR

Se realizaron truncamientos en los extremos N y C de un polipéptido de unión a KDR y los polipéptidos truncados se analizaron determinando su unión a células que expresan KDR. Los polipéptidos sintetizados se muestran en la figura 8. La unión de los polipéptidos a células que expresan KDR se determinó siguiendo los procedimientos del

ejemplo 3.

Todos los péptidos se acetilaron en el extremo N y se fluoresceinaron determinando la K_D evidente siguiendo el método descrito anteriormente (Ejemplo 3). Los resultados indican que para el polipéptido de la SEC ID N.º: 31 (figura 8), los residuos en C terminal fuera del núcleo constreñido de disulfuro contribuyen a la unión a KDR.

Ejemplo 7: Ensayo de unión para confirmar la capacidad de los péptidos identificados mediante expresión en fagos para unirse a células que expresan KDR

Se realizaron los siguientes procedimientos para evaluar la capacidad de los péptidos de unión a KDR para unirse a las células que expresan KDR. En este procedimiento, los péptidos de unión a KDR que contienen la SEC ID N.º: 45 se conjugaron con perlas fluorescentes y se evaluó su capacidad para unirse a las células 293 H que expresan KDR. Los experimentos muestran que estos péptidos se pueden usar para unirse a partículas tales como las perlas en los sitios que expresan KDR. Los resultados indican que la unión de ambas secuencias de unión a KDR mejoraba con la adición de un espaciador.

Protocolo

Biotinilación de un anticuerpos anti-KDR Anti-KDR de Sigma (V-9134), como fluido ascítico, se biotiniló usando un kit de Molecular Probes (F-6347) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Preparación de perlas fluorescentes conjugadas con péptido: 0,1 ml de una solución de reserva 0,2 mM de cada péptido biotinilado (preparado como se indica anteriormente, en 50n% de DMSO) se incubó con 0,1 ml de microesferas fluorescentes rojas recubiertas con neutravidina (diámetro de 2 micrómetros, solicitados de Molecular Probes) y 0,2 ml de MES 50Mm (Sigma M-8250), pH 6.0 durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotador. Como control positivo, el anticuerpo anti-KDR biotinilado se incubó con las perlas recubiertas con neutravidina como anteriormente, salvo que se usaron 0,03 mg de la preparación de anticuerpo biotinilado en PBS (Gibco n.º 14190-136) en lugar de la solución peptídica. Las perlas se pueden almacenar a 4 °C hasta que se necesiten durante hasta 1 semana.

Ensayo de unión: De las preparaciones de perlas anteriores, 0,12 ml se agitaron durante 10 minutos a 2.000 rpm en una microcentrífuga a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y se añadieron 0,06 ml de MES a pH 6,0. Cada solución de perlas se agitó en vórtex después y se sonicó en un baño de agua durante 15 minutos. A 1,17 ml de DMEM, rico en glucosa (GIBCO n.º 11965-084) con 1 x MEM solución de aminoácidos no esenciales (NEAA) (GIBCO 11140-050) y 40 % de PBS (Hyclone SH30070,02).

se añadieron 0,03 ml de las preparaciones de perlas sonicadas. Placas de 96 pocillos sembradas con células 293H que se han transfectado de forma simulada en las columnas 1 a 6 y transfectadas con KDR en las columnas 7 a 13 (como en el ejemplo 5) se drenaron y lavaron una vez con DMEM, rico en glucosa con 1X NEAA y 49 % de FBS. A cada pocillo se añadieron 0,1 ml de solución de perlas, seis pocillos por preparación de perlas. Tras incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, los pocillos se drenaron invirtiendo las placas y se lavaron cuatro veces con 0,1 ml de PBS con $Ca^{++}Mg^{++}$ (GIBCO n.º 14040-117) con agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos cada lavado. Después de drenar se añadieron 0,1 ml de PBS por pocillo. Después se leyeron las placas en un fluorómetro Packard FluoroCount a una excitación 550 nm/emisión 620nm Las perlas de neutravidina no conjugadas se usaron como control negativo, mientras que las perlas conjugadas con un anticuerpo anti-KDR biotinilado se usaron como control positivo del ensayo.

Calculando el número de perlas unidas por pocillo se incluyó una curva estándar con números crecientes de las mismas perlas fluorescentes en cada placa de ensayo. La curva estándar se usó calculando el número de perlas unidas por pocillo basado en la intensidad de la fluorescencia de cada pocillo.

Resultados: Las perlas control positivo con anti-KDR se unieron claramente preferentemente a las células que expresan KDR, mientras que las perlas de avidina sin nada no se unieron a ningún tipo de célula (figura 9). Las perlas de la SEC ID N1 6 biotiniladas no se unieron a las células transfectadas con KDR significativamente más que a las células transfectadas de forma simulada, pero añadiendo un espaciador hidrófilo entre el resto peptídico y el grupo de biotina (SEC ID N.º: 5 biotinilada con perlas espaciadoras JJ) potenció la unión a las células con KDR sin incrementar la unión a las células transfectadas de forma simulada. Las perlas de la SEC ID N.º: 31 biotiniladas mostraron mayor unión a las células transfectadas con KDR y añadiendo un espaciador hidrófilo, la porción peptídica y la biotina de la molécula (SEC ID N.º: 31 biotinilada con espaciador JJ) mejoró significativamente la unión específica al KDR en las células transfectadas. Por tanto, las secuencias peptídicas de las SEC ID N.º: 5 y la SEC ID N.º: 31 se pueden usar uniéndose a partículas tales como perlas a sitios de expresión de KDR. La adición de un espaciador hidrófilo entre el péptido y el grupo usado para la unión a la partícula debería analizarse de forma rutinaria con nuevas moléculas dirigidas, ya que mejoró la unión para ambos péptidos evaluados en el presente documento.

Ejemplo 8: Competición de los péptidos de unión y el VEGF marcado con ^{125I} por la unión a las células 293H

transfectadas con KDR

Los polipéptidos de unión a KDR se evaluaron después por su capacidad para competir con VEGF marcado con ^{125}I por la unión a LDR expresado por las células 293H transfectadas. Los resultados indican que el polipéptido de unión a KDR SEC ID N.º: 4 (AcAGDSWCSTEYTYCEMIGTGGGK-NH₂) no compitió significativamente con VEGF marcado con ^{125}I y las SEC ID N.º: 31, 5 y la SEC ID N.º: 17 compitieron muy bien con VEGF marcado con ^{125}I , inhibiendo 96.2962.97 % y 104.4862.074 % de la unión del VEGF marcado con ^{125}I .

Transfección de células 293H: Células 293H se transfectaron usando el protocolo descrito en el ejemplo 5. La transfección se realizó en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, n.º de cat. 354640). La mitad izquierda de las placas (48 pocillos) se transfectó de forma simulada (sin ADN) y la mitad derecha de las placas se transfectó con ADNc de KDR. Las células fueron un 80 - 90 % confluentes en el momento de la transfección y completamente confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo, o el ensayo se detuvo.

Preparación de medio M199: El medio M199 se preparó como se ha descrito en el ejemplo 5.

Preparación de soluciones peptídicas: Las soluciones de reserva 3 mM de los péptidos SEC ID N.º: 31, SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5 y SEC ID N.º: 17 se prepararon como se ha descrito anteriormente en 50 % de DMSO.

Preparación d solución de VEGF marcado con ^{125}I para el ensayo 25 mCi de VEGF marcado con ^{125}I liofilizado (Amersham, n.º de cat. IM274) se reconstituyeron con 250 µl de ddH₂O creando una solución de reserva, que se almacenó a -80 °C para su uso posterior. Para cada ensayo se realizó una solución de 300 pM de VEGF marcado con ^{125}I fresca diluyendo la solución de reserva anterior en medio M199. La concentración del VEGF marcado con ^{125}I se calculó a diario en base a la actividad específica del material ese día.

Preparación de solución peptídica 30 µM y 0,3 µM en 300 pM de VEGF marcado con ^{125}I : Para cada placa de 96 pocillos se prepararon 10 ml de 300 pM de VEGF marcado con ^{125}I en medio M199 a 4 °C. Cada solución peptídica (3 mM, preparada como se ha descrito anteriormente) se diluyó a 1:100 y 1:10000 en 300 µl de VEGF marcado con ^{125}I preparando soluciones peptídicas 30 µM y 0,3 µM que contienen 300 pM de VEGF marcado con ^{125}I .

Una vez preparadas, las soluciones se mantuvieron en hielo hasta su uso. La dilución de los péptidos en medio M199 que contiene 300 pM de VEGF marcado con ^{125}I se realizó de forma fresca para cada experimento.

Ensayo para detectar competición con VEGF marcado con ^{125}I en células 293H: Las células se usaron 24 horas después de la transfección y preparando las células para el ensayo se lavaron 3 veces con medio M199 a temperatura ambiente y se introdujeron en el refrigerador. Tras 15 minutos, el medio M199 se eliminó de la placa y se reemplazó con 75 ml de 300 pM de VEGF marcado con ^{125}I en medio M199 (preparado como se ha indicado anteriormente) con los polipéptidos. Cada dilución se añadió a tres pocillos distintos de células 293H transfectadas de forma simulada y con KDR. Después de incubar a 4 °C durante 2 horas, las placas se lavaron 5 veces con tampón de unión frío, suavemente se secaron y se comprobaron con un microscopio detectando pérdida de células. A cada pocillo se añadieron 100 µl de solución solubilizante (2 % de Tritón X-100, 10 % Glicerol, 0,1 % BSA) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución solubilizante en cada pocillo se mezcló pipeteando arriba y abajo y se transfirió a tubos de 1,2 ml. Cada pocillo se lavó dos veces con 100 µl de solución solubilizante y los lavados se añadieron a los correspondientes tubos de 1,2 ml. Cada tubo de 1,2 ml se transfirió después a un tubo de 15,7 x 100 cm contando en un contador LKB Gamma usando el programa 54 (ventana de ^{125}I durante 1 minuto).

Competición de los péptidos con VEGF marcado con ^{125}I en células 293H: La capacidad de los péptidos de unión a KDR SEC ID N.º: . 31, SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5 y SEC ID N.º: 17 para bloquear específicamente la unión de VEGF marcado con ^{125}I a KDR se evaluó en células transfectadas de forma simulada y en células transfectadas con KDR. La SEC ID N.º: 4 se usó en el ensayo como control negativo, ya que exhibió poca unión a KDR en los ensayos de FO descritos en el presente documento y por tanto, no se esperaba que desplazara o compitiera con VEGF. Calculando la unión específica a KDR, la unión de VEGF marcado con ^{125}I a células transfectadas de forma simulada se restó de la de las células transfectadas con KDR. Por tanto, la unión de VEGF marcado con ^{125}I a otros sitios distintos a KDR (que pueden o no estar presentes en las células 293H) no se incluye cuando se calcula la inhibición de la unión de VEGF marcado con ^{125}I a las células 293H mediante los péptidos de unión a KDR. El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula $[(Y1-Y2) * 100 / Y1]$, en la que Y1 es la unión específica a las células 293H transfectadas con KDR en ausencia de péptidos e Y2 es la unión específica a las células 293H transfectadas con KDR en presencia de péptidos o de DMSO. La unión específica a las células 293H transfectadas con KDR se calculó restando la unión a las células 293H transfectadas de forma simulada de la unión a las células 293H transfectadas con KDR.

Como se muestra en la figura 10, en las células 293, la SEC ID N.º: 5, que debido a su K_D (>2 mM) relativamente alta se usó como control negativo no compitió significativamente con VEGF marcado con ^{125}I , 12.6967.18 % a 30 mM y -5.4569.37 % a 0,3 mM (figura 10). Al mismo tiempo, las SEC ID N.º: 31 y 17 compitieron muy bien con VEGF

marcado con ¹²⁵I, inhibiendo 96.2962.97 % y 104.4862.074 % de la unión de VEGF marcado con ¹²⁵I a 30 mM y 52.2763.78 % y 80.9663.8 % a 0.3 mM (figura 10) respectivamente. El porcentaje de inhibición con la SEC ID N.º: 5 fue 47.95±5.09 % de la unión de VEGF marcado con ¹²⁵I a 30mM y 24.4168.43 % a 0,3 mM (figura 10). Por tanto, los tres polipéptidos de unión a KDR sí compitieron con VEGF y su potencia aumentó con su afinidad de unión. Este ensayo será útil identificando péptidos que se unen estrechamente a KDR pero que no compiten con VEGF, una característica que puede ser útil para la obtención de imágenes en tumores, en los que hay con frecuencia una concentración local elevada de VEGF que, de otro modo, bloquearía la unión de las moléculas dirigidas a KDR.

Ejemplo 9: Inhibición de la activación del receptor de KDR inducido por KDR por los péptidos identificados mediante expresión en fagos

La capacidad de los péptidos de unión a KDR identificados por expresión en fagos inhibiendo la activación inducida por VEGF (fosforilación) de KDR se evaluó usando el ensayo siguiente. Se mostró que una serie de péptidos como se usan en la invención inhibían la activación de KDR en construcciones monoméricas y/o tetraméricas. Como se ha tratado anteriormente, los péptidos que inhiben la activación de KDR pueden ser útiles como agentes antiangiogénicos.

Protocolo

Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Biowhittaker n.º de catálogo CC-2519) se obtuvieron congeladas en hielo seco y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su descongelación. Estas células se descongelaron, se pasaron y se mantuvieron como ha descrito el fabricante en medio EGM-MV (Biowhittaker n.º de catálogo CC-3125). Las células sembradas en placas de 100 mm se dejaron hasta la confluencia, después se cultivaron durante la noche en medio EBM basal sin suero (Biowhittaker n.º de catálogo CC-3121). A la mañana siguiente, el medio en las placas se reemplazó con 10 ml de medio EBM fresco a 37 °C que no contiene aditivos (control negativo), 5 ng/ml de VEGF (Calbiochem n.º de catálogo 676472 o Peprotech n.º de catálogo 100-20) (control positivo), o 5 ng/ml de VEGF más la concentración indicada del péptidos de unión a KDR (preparado como se ha descrito anteriormente). En algunos casos se usó un anticuerpo anti-KDR neutralizante (n.º de catálogo AF357, R&D Systems) como control positivo inhibidor de la activación. En estos casos, el anticuerpo se preincubó con las células de ensayo durante 30 minutos a 37 °C antes de la adición de medio fresco que contiene VEGF y el anticuerpo. Después de incubar las placas 5 minutos en un incubador de cultivo tisular a 37 °C se lavaron tres veces con D-PBS helado que contiene calcio y magnesio y se introdujeron en hielo sin eliminar los últimos 10 ml de la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS). La primer aplaca de un conjunto se drenó y se añadieron 0,5 ml de tampón de lisis Tritón (Tris 20 mM base pH 8,0, NaCl 137 mM, 10 % de glicerol, 1 % Tritón X-100, EDTA 2 mM (ácido etilendiaminatetraacético), PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, NaF 100 mM, pirofosfato sódico 50 mM, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina). Las células se rasparon rápidamente al tampón de lisis usando un raspador celular (Falcon, n.º de catálogo 353087), se dispersaron pipeteando brevemente y el lisado resultante se transfirió a la segunda placa drenada del par. Se usaron otros 0,5 ml de tampón de lisis aclarando la primera placa, después se transfirió a la segunda placa, que después también se raspó y se dispersó. El lisado combinado de las dos placas se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. El procedimiento anterior se repitió para cada uno de los controles y muestras de ensayo (péptidos de unión a KDR), uno cada vez. Los lisados se almacenaron en hielo hasta que todas las muestras se hubieron procesado. En este punto, las muestras se almacenaron a -70 °C o se procesaron hasta el fin del ensayo sin interrupción.

Los lisados preparados recientemente o congelados y descongelados se prelavaron mediante adición de 20 µl de perlas de proteína A-sefarosa (Sigma 3391, preinchadas en D-PBS, se lavaron tres veces con un exceso grande de D-PBS y se reconstituyeron con 6 ml de D-PBS generando una pasta del 50 %) y agitando a 4 °C durante 30 minutos. Las perlas se sedimentaron mediante centrifugación durante 2 minutos en una Picofoque (Stratagene, n.º de catálogo 400550) a 2.000 x g y los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos de 1,5 ml. A cada tubo se añadieron veinte µg de anticuerpo anti-Flk-1 (Santa Cruz Biotechnology, n.º de catálogo sc-504) y los tubos se incubaron durante la noche (16-18 h) a 4 °C en un rotador inmunoprecipitando el KDR. Al día siguiente se añadieron a los tubos 40 µl de perlas proteína A-sefarosa y después se incubaron a 4 °C durante 1 hora en un rotador. Las perlas de cada tubo se lavaron después tres veces mediante centrifugación durante 2 minutos en una Picofoque, descartando el sobrenadante y dispersando las perlas en 1 ml de tampón TBST añadido recientemente (Tris base 20 mM pH 7.5, 137 mM NaCl y 0,1 % de Tween 20). Después de centrifugar y eliminar el líquido del último lavado, a cada tubo se añadieron 40 µl de tampón de muestra Laemmli SDS-PAGE (Bio-Rad, n.º de catálogo 161-0737), se taparon los tubos y se llevaron a ebullición durante 5 minutos. Después de enfriar, las perlas de cada tubo se sedimentaron mediante centrifugación y los sobrenadantes que contienen el KDR inmunoprecipitado se transfirieron a tubos nuevos y se usaron inmediatamente o se congelaron y almacenaron a -70 °C para su posterior análisis.

La detección de KDR fosforilado además del KDR total en los inmunoprecipitados se llevó a cabo mediante análisis de inmunotransferencia. La mitad (20 µl) de cada inmunoprecipitado se resolvió en un Ready Gel (Bio-Rad, n.º de catálogo 161-1154) pre-vertido al 7,5 % mediante SDS-PAGE de acuerdo con el método de Laemmli (Nature, 227:680-685 (1970)).

Usando un aparato Bio-Rad mini-Protean 3 (n.º de catálogo 165-3302). Las proteínas resueltas en cada gel se sometieron a electrotransferencia en una membrana de PVDF (Bio-Rad, n.º de catálogo 162-0174) en una Bio-Rad mini Trans-Blot (n.º de catálogo 170-3930) en tampón CAPS (CAPS 10 mM, Sigma n.º de catálogo C-6070, 1 % de metanol de calidad ACS, pH 11.0) durante 2 horas a 140 mA de acuerdo con el método de Matsudaira (J. Biol. Chem., 262:10035-10038 (1987)).

Las transferencias se bloquearon a temperatura ambiente en 5 % de Blotto-TBS (Pierce n.º de catálogo 37530) precalentado a 37 °C durante 2 horas. Las bandas se sondearon primero con un anticuerpo antifosfotirosina (Transduction Labs, n.º de catálogo P11120), diluido 1:200 en Blotto-TBS al 5 % con Tween 20 al 0,1 % añadido durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido se retiró lavando las bandas cuatro veces con D-PBS conteniendo Tween 20 al 0,1 % (D-PBST), 5 min. por lavado. Subsiguientemente, las bandas se sondearon con un anticuerpo anti-ratón de oveja conjugado con HRP (Amersham Biosciences n.º de catálogo NA931) diluido 1:25,000 en Blotto-TBS al 5 % con Tween 20 al 0,1 % añadido durante 1 hora a temperatura ambiente y lavado cuatro veces con D-PBST. Finalmente, las bandas se incubaron con 2 ml de un sustrato quimioluminiscentes (ECL Plus, Amersham n.º de catálogo RPN2132) disperso en la parte superior durante 2 minutos, se drenaron por goteo bien, se situaron en protector de lámina de plástico (C-Line Products, N.º de catálogo 62038) y se expusieron a película de rayos X (Kodak BioMax ML, número de catálogo 1139435) durante duraciones temporales variantes logrando contraste óptimo.

Confirmando que se compararon en el ensayo cantidades similares de KDR, las bandas se quitaron incubando durante 30 minutos a 37 °C en TBST con su pH ajustado a 2,4 con HCl, se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con Blotto-TBS al 5 % con Tween 20 al 0,1 % (Blotto-TBST) y se volvieron a sondear con un anticuerpo policlonal anti-Flk-1 (N.º de catálogo sc-315 de Santa Cruz Biotech), 1:200 en Blotto-TBS al 5 % con suero de cabra normal al 1 % (Life Tech N.º de catálogo 16210064) durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido se retiró lavando las bandas cuatro veces con D-PBST, 5 min. por lavado. Subsiguientemente, las bandas se volvieron a sondear con un anticuerpo secundario anti-conejo de burro conjugado con HRP (Amersham Biosciences N.º de catálogo NA934) diluido 1:10.000 en Blotto-TBS al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron cuatro veces con D-PBST. Finalmente, las bandas se incubaron con 2 ml de sustrato quimioluminiscente y se expusieron a película de rayos X como se describe anteriormente.

Resultados: inmunotransferencias de inmunoprecipitados de KDR preparadas a partir de HUVEC con o sin estimulación anterior de VEGF demostraron que el KDR activado (fosforilado) podría detectarse cuando las HUVEC se estimularon con VEGF. Un anticuerpo antifosfotirosina (PY-20) no detectó ninguna proteína fosforilada cerca de la posición de migración de KDR a partir de HUVEC no estimuladas en las bandas, pero después de cinco minutos de estimulación de VEGF, se observó consistentemente una franja en la localización esperada (figura 11, panel superior). Cuando las bandas se retiraron de anticuerpos unidos por incubación en solución ácida después se volvieron a poner a prueba con un anticuerpo anti-KDR (sc-315), se confirmó que la identidad de la banda de proteína fosforilada era KDR. Además, se observe que los inmunoprecipitados de HUVEC no estimulada contenían aproximadamente tanto KDR total como los inmunoprecipitados de KDR a partir de HUVEC con estimulación por VEGF (figura 11, panel inferior).

Los resultados precedentes indican que el KDR fosforilado detectado se formó a partir de KDR pre-existente por autofosforilación de dímeros KDR que resultan de unión de VEGF, ya que cinco minutos no es tiempo suficiente para sintetizar y procesar un receptor de superficie celular glucosilado grande tal como KDR.

La capacidad de este ensayo detectando agentes capaces de bloquear la activación de VEGF de KDR se valoró añadiendo una serie de compuestos a HUVEC en combinación con VEGF y midiendo fosforilación de KDR con el ensayo de inmunotransferencia descrito anteriormente. Como controles positivos y negativos, se probaron también en cada ensayo inmunoprecipitados de HUVEC no estimuladas y de HUVEC estimuladas con VEGF en ausencia de cualesquiera compuestos de prueba. Cuando un anticuerpo anti-KDR neutralizante (N.º de catálogo AF-357 de R&D Systems) se combinó con el VEGF, el grado de fosforilación de KDR se redujo grandemente (figura 12, panel superior), indicando que el anticuerpo fue capaz de interferir con la capacidad de VEGF para unir a y activar KDR. Este resultado se esperaba dado que la capacidad del anticuerpo para bloquear síntesis de ADN inducida por VEGF es parte de la realización de pruebas de control de calidad del fabricante del anticuerpo. Volver a sondear la banda con un anticuerpo anti-KDR (figura 12, panel inferior) indicó que ligeramente menos del KDR total estuvo presente en el carril de material tratado con VEGF + anticuerpo (+V+ α -KDR) en relación al carril de material tratado solamente con VEGF (+V), pero la diferencia no fue lo suficientemente grande para dar cuenta de la mucho menor abundancia de KDR fosforilado en el carril de material tratado con anticuerpo.

Repitiendo el ensayo anterior, los siguientes polipéptidos mostraron al menos una inhibición del 50 % de la fosforilación de KDR inducida por VEGF a 10 μ M:

Ac-AGWIECYHPDGICYHFGTGGGK-NH2 (SEC ID N.º: 9)

Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH2 (SEC ID N.º: 31)

Ac-AQEPEGYAYWEVITLYHEEDGDGGK-NH₂ (SEC ID N.º: 36)

Ac-AQAFPRFGDDYWIQQYLRYTDGGK-NH₂ (SEC ID N.º: 37)

5 Ac-AQGDYVYWEIILTGTHTPPGGK-NH₂ (SEC ID N.º: 38)

Las SEQ ID N.º: 9 y 31 fueron los compuestos más potentes en el ensayo, ya que produjeron una inhibición de al menos un 50 % de la fosforilación de KDR inducida por VEGF a 1 µM:

10 Los siguientes péptidos se analizaron en el ensayo y no produjeron una inhibición significativa de la activación de KDR a 10 µM:

Ac-AGPK(ivDde)WCEEDWYYCMITGTGGGK-NH₂ (SEC ID N.º: 5)

15 Ac-AQRGDYQEQYWHQQLVEQLK(ivDde)LLGGGK-NH₂ (SEC ID N.º: 45)

Además, los complejos tetraméricos de derivados biotinilados de las SEC ID N.º: 31 y 17 (preparados como se ha descrito anteriormente) produjeron una inhibición de al menos un 50 % de la fosforilación de KDR inducida por VEGF a 10 µM:

20 *Ejemplo 10: Preparación de péptidos y construcción de péptido dimérico*

Los siguientes métodos se usaron para la preparación de péptidos individuales y construcciones de péptidos diméricos descritos en los ejemplos siguientes (10-14).

25 Síntesis peptídica automática

La síntesis de los péptidos se llevó a cabo en un sintetizador ABI-433A Synthesizer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) a escala de 0,25 mmol usando el protocolo FastMoc. En cada ciclo de este protocolo se realizó la preactivación mediante disolución de 1,0 mmol del aminoácido protegido de cadena lateral N α -Fmoc seco requerido en un cartucho con una solución de 0,9 mmol de HBTU, 2 mmol de DIEA y 0,9 mmol de HOBt en una mezcla de DMF-NMP. Los péptidos se ensamblaron en una resina NovaSyn TGR (amida de Rink) (nivel de sustitución 0,2 mmol/f). El acoplamiento se llevó a cabo durante 21 min. La desprotección de Fmoc se llevó a cabo con 20 % de piperidina en NMP. Al final del último ciclo, el grupo Fmoc en N-terminal se eliminó y el péptido unido a la resina completamente protegido se acetiló usando anhídrido acético/DIEA/HOBt/NMP.

Escisión, desprotección de la cadena lateral y aislamiento de péptidos brutos

40 La escisión de los péptidos de la resina y la desprotección de la cadena lateral se consiguió usando reactivo B durante 4,5 horas a temperatura ambiente. Las soluciones de escisión se recolectaron y las resinas se lavaron con un alícuota adicional de reactivo B. Las soluciones combinadas se concentraron hasta sequedad. Se añadió éter dietílico al residuo con agitación suave o agitación precipitando los péptidos. La fase líquida se decantó y se recogió el sólido. Este procedimiento se repitió 2-3 veces para eliminar impurezas y componentes de la mezcla de escisión residual.

45 Ciclación de los péptidos de di-cisteína

Los péptidos que contienen di-cisteína lineal bruta precipitada en éter se ciclaron mediante disolución en agua, mezclas de acetonitrilo acuoso (0,1 % de TFA), DMSO acuoso o 100 % de DMOS y ajuste del pH de la solución hasta un PH 7,5 - 8,5 mediante la adición de amoníaco acuoso, carbonato amónico acuoso o DIEA.

50 La mezcla se agitó al aire durante 16 - 48 horas, se acidificó hasta un pH de 3 con ácido trifluoroacético acuoso y después se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo en agua. Las fracciones que contienen el material deseado se combinaron y los péptidos purificados se aislaron mediante liofilización.

Preparación de péptidos que contienen engarces

60 En un experimento típico, 400 mg del péptido unido a la resina que contiene resina que porta una lisina protegida con ivDde se trataron con 10 % de hidracina en DMF (2 X 20 ml). La resina se lavó con DMF (2 x 20 ml) y DCM (1 x 20 ml). La resina se resuspendió en DMF (10 ml) y se trató con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (0,4 mmol), HOBt (0,4 mmol), DIC 0,4 mmol) y DIEA (0,8 mmol) con mezclado durante 4 horas.

65 (Tras la reacción, la resina se lavó con DMF (2 x 10 ml) y DCM (1 x 10 ml). La resina se trató después con 20 % de piperidina en DMF (2 x15 ml) durante 10 minutos cada vez. La resina se lavó y el acoplamiento con ácido Fmoc-diaminodioxaoctanoico y la eliminación del grupo protector Fmoc se repitieron una vez más.

El péptido unido a la resina resultante con un grupo amino libre se lavó y secó y después se trató con el reactivo B (20 ml) durante 4 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se agitó con éter produciendo un sólido que se lavó con éter y se secó. El sólido se disolvió en DMSO anhidro y el pH se ajustó hasta 7,5 con DIEA. La mezcla se agitó durante 16 horas efectuando la reacción de ciclación con disulfuro y la reacción se monitorizó mediante HPLC analítico. Tras la finalización de la ciclación, la mezcla de reacción se diluyó con 25 % de acetonitrilo en agua y se aplicó directamente a una columna C-18 de fase inversa. La purificación se efectuó usando un gradiente de acetonitrilo en agua (ambos con 0,1 % de TFA). Las fracciones se analizaron mediante HPLC y las que contienen el producto puro se combinaron y liofilizaron proporcionando el péptido requerido.

Preparación de péptidos biotinilados que contienen engarces

En un experimento típico, 400 mg del péptido unido a la resina que contiene resina que porta una lisina protegida con ivDde se trataron con 10 % de hidracina en DMF (2 X 20 ml). La resina se lavó con DMF (2 x 20 ml) y DCM (1 x 20 ml). La resina se resuspendió en DMF (10 ml) y se trató con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (0,4 mmol), HOBt (0,4 mmol), DIC 0,4 mmol) y DIEA (0,8 mmol) con mezclado durante 4 horas.

Tras la reacción, la resina se lavó con DMF (2 x 10 ml) y DCM (1 x 10 ml). La resina se trató después con 20 % de piperidina en DMF (2 x15 ml) durante 10 minutos cada vez. La resina se lavó y el acoplamiento con ácido Fmoc-diaminodioxaoctanoico y la eliminación del grupo protector Fmoc se repitieron una vez más.

El péptido unido a la resina resultante con un grupo amino libre se trató con una solución de éster de biotina-MHS (0,4 mmol, 5 rq.) y DIEA (0,4 mmol, 5 eq.) en DMF durante 2 horas. La resina se lavó y se secó como se ha descrito anteriormente y después se trató con el reactivo B (20 ml) durante 4 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se agitó con éter produciendo un sólido que se recogió, se lavó con éter y se secó. El sólido se disolvió en DMSO anhidro y el pH se ajustó hasta 7,5 con DIEA. La mezcla se agitó durante 4 - 6 horas efectuando la reacción de ciclación con disulfuro, que se monitorizó mediante HPLC. Tras la finalización de la ciclación, la mezcla de reacción se diluyó con 25 % de acetonitrilo en agua y se aplicó directamente a una columna C-18 de fase inversa. La purificación se efectuó usando un gradiente de acetonitrilo en agua (ambos con 0,1 % de TFA). Las fracciones se analizaron mediante HPLC y las que contienen el producto puro se recolectaron y liofilizaron proporcionando el péptido biotinilado requerido.

Preparación de péptidos conjugados con DOTA para marcar con determinados isótopos de gadolinio o indio

En un experimento típico, 400 mg del péptido unido a la resina que contiene resina que porta una lisina protegida con ivDde se trataron con 10 % de hidracina en DMF (2 X 20 ml). La resina se lavó con DMF (2 x 20 ml) y DCM (1 x 20 ml). La resina se resuspendió en DMF (2 X 20 ml) y se trató con Fmoc-ácido aminodioxaoctanoico (0,4 mmol), HOBt (0,4 mmol), DIC (0,4 mmol), DIEA (0,8 mmol) mezclado durante 4 horas. Después de la reacción, la resina se lavó con DMF (2 X 10 ml) y con DCM (1 x 10 ml). La resina se trató después con 20 % de piperidina en DMF (2 x15 ml) durante 10 minutos cada vez. La resina se lavó y el acoplamiento con ácido Fmoc-diaminodioxaoctanoico y la eliminación del grupo protector Fmoc se repitieron una vez. El péptido unido a la resina resultante con un grupo amino libre se resuspendió en DMF (10 ml) y se trató con una solución de ácido 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacético, éster 1,4,6-tris-t-butílico (éster DOTA-tris-t-butílico, 0,4 mmol, 5 equiv.), HOBt (0,4 mmol), DIC (0,4 mmol) y DIEA (0,8 mmol) en DMF (10 ml) con mezclado durante 4 horas. Tras la finalización de la reacción, la resina se lavó con DMF (2 x 10 ml) y con DCM (1 x 10 ml) y se trató con el reactivo B (20 ml) durante 4 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se agitó con éter produciendo un sólido que se recogió, se lavó con éter y se secó. El sólido se disolvió en DMSO anhidro y el pH se ajustó hasta 7,5 con DIEA. La mezcla se agitó durante 16 horas efectuando la reacción de ciclación con disulfuro, que se monitorizó mediante HPLC. Tras la finalización de la ciclación, la mezcla se diluyó con 25 % de acetonitrilo en agua y se aplicó directamente a una columna C-18 de fase inversa. La purificación se efectuó usando un gradiente de acetonitrilo en agua (ambos con 0,1 % de TFA). Las fracciones se analizaron mediante HPLC y las que contienen el producto puro se combinaron y liofilizaron proporcionando el péptido biotinilado requerido.

Los siguientes péptidos monoméricos de la tabla 4 se prepararon mediante los métodos anteriores, "PnAO6", como se usa en el presente documento, se refiere a 3-(2-amino-3-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-propilamino)-propilamino)-3-metil-butan-2-ona oxima.

Tabla 4. Secuencia o estructura de los péptidos monoméricos y derivados peptídicos

Estructura o secuencia	SEC ID N.º o dímero
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(Biotina-JJ-K)-NH ₂	17
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYPGGGK(Biotina-JJK)-NH ₂	49
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYPGGGK(JJ)-NH ₂	49

Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK(J)-NH ₂ derivado de la sec. 12	66
Ac-GDSRVCWEDSWGGGVCFRYPGGGK(JJ)-NH ₂ derivado de la sec. 5	31
Ac-GDSRVCWEDSWGGGVCFRYPGGGK(JJ)-NH ₂ derivado de la sec. 5	31/D10
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[(PnAO6-C(=O)(CH ₂) ₃ C(=O)-K)-NH ₂ A derivado de la sec. 11	17/D10
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[(DOTA-JJK(iV-Dde))-NH ₂ A derivado de la sec. 11	17/D11
Ac-VCWEDSWGGGVCFRYPGGGK-NH ₂ A derivado de la sec. 5 específicamente: Sec. 5 residuos 5-25	49/D12
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[K(BOA)]-NH ₂ derivado de la sec. 11	17/D13
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK[PnAO6-C(=O)(CH ₂) ₃ C(=O)-K(iV-Dde)]-NH ₂ Aplicación derivado de la sec. 12	66/D 14
Ac-GDSRVCWEDSWGGGVCFRYPGGGK(JJ)-NH ₂ Sec. 5 engarce derivado de la sec. 5 = Glut	31/D15
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[PnAO6-C(=O)(CH ₂) ₃ C(=O)-K]-NH ₂ A derivado de la sec. 11, nueva secuencia	17/D16
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[Biotina-K]-NH ₂ , A derivado de la sec. 11	31/D19
JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(iV-Dde)-NH ₂ (SEC ID N.º: 17)	17/D20
JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(iV-Dde)-NH ₂	17/D21
Ac-GDSRVCWEDSWGGGVCFRYPGGGK(JJ)-NH ₂	31/D24
Ac-VCWEDSWGGGVCFRYPGGGK(NH ₂ -Ser(GalNAc(Ac)3- α -D)-Gly-Ser(GalNAc(Ac)3- α -D)-NH ₂	49/D26

Ejemplo 11: Preparación de construcciones que contienen homodímero

- Los monómeros peptídicos purificados mencionados anteriormente en el ejemplo 8 se usaron en la preparación de varias construcciones homodiméricas y heterodiméricas.

Preparación de construcciones que contienen homodímero

- Preparando compuestos homodiméricos, la mitad del péptido necesario preparando el dímero se disolvió en DMF y se trató con 10 equivalentes de bis-N-hidroxisuccinimidiléster de ácido glutámico. La progresión de la reacción se monitorizó mediante análisis HPLC y espectroscopia de masas. Al finalizar la reacción se eliminaron los volátiles *al vacío* y al residuo se lavó con acetato de etilo eliminando el bis-NHS-éster sin reaccionar. El residuo se secó, se redisolvió en DMF anhidro y se trató con otra media porción del péptido en presencia de 2 equivalentes de DIEA. La reacción se dejó proceder durante 24 horas. Esta mezcla se aplicó directamente a una columna de HPLC de fase inversa YMC y se purificó mediante elución con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (conteniendo ambos 0,1 % de TFA).

Preparación de construcciones que contienen heterodímero

- En el caso de los heterodímeros, uno de los monómeros ("A") reaccionó con el bis-NHS-éster de ácido glutámico y tras lavar el exceso del bis-NHS-éster (como se ha descrito para los compuestos homodiméricos) se añadió el segundo monómero ("B") en presencia de DIEA. Tras la reacción la mezcla se purificó mediante HPLC preparativa. Normalmente, a una solución de bis-N-hidroxisuccinimidiléster de ácido glutámico ((0,02 mmol, 10 equivalentes) en DMF (0,3 ml) se añadió una solución del péptido "A" y DIEA (2 equiv) en DMF (0,5 ml) y la mezcla se agitó durante 2 horas. La progresión de la reacción se monitorizó mediante análisis de HPLC y espectroscopia de masas. Al finalizar la reacción se eliminaron los volátiles *al vacío* y al residuo se lavó con acetato de etilo (3 x 1,0 ml) eliminando el bis-NHS-éster sin reaccionar. El residuo se secó, se redisolvió en DMF anhidro (0,5 ml) y se trató con una solución del péptido "B" y DIEA (2 equiv) en DMF (0,5 ml) durante 24 h. La mezcla se diluyó con agua (1:1,v/v) y se aplicó directamente a una columna de HPLC de C18 de fase inversa YMC C-18 y se purificó mediante elución con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua (ambos con 0,1 % de TFA). Las fracciones se analizaron mediante HPLC analítica y las que contienen el producto puro se combinaron y liofilizaron obteniendo el dímero requerido. Los dímeros representados en las figuras 25-49 se prepararon mediante este método (estructura, nombre, número de referencia del compuesto como se describe en la "Breve Descripción de las Figuras").
- Para la preparación del dímero D5, tras la reacción de acoplamiento de los péptidos individuales se añadieron 50 ml de hidracina a la mezcla de reacción (exponiendo el grupo N ϵ -amino de la lisina) y la solución se agitó durante 2 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con agua (1,0 ml) y el pH se ajustó a 2 con TFA. Esto se purificó después mediante el método descrito anteriormente.
- Los datos del análisis HPLC y los datos de espectros de masas para los péptidos diméricos se proporcionan en la tabla 5 siguiente.

Tabla 5. Datos analíticos para construcciones homodiméricas y heterodiméricas mediante el sistema de análisis de HPLC

	Tiempo de retención (sistema)	Datos de espectros de masas (API-ES, -ion)
D1	8,98 min. (A)	1987,7 (M-3H)/3, 1490,6 (M-4H)/4, 1192,3 (M-5H)/5
D2	16,17 min (B)	2035,3 (M-3H)/3, 1526,1 (M-4H)/4, 1220,7 (M-5H)/5
D3	8,74 min (C)	1933,6 (M-3H)/3, 1449,9 (M-4H)/4, 1159,4 (M-5H)/5
D4	10,96 min (D)	2032,8 (M-3H)/3
D5	6,57 min (E)	1816,2 (M-3H)/3, 1361,8 (M-4H)/4, 1089,4 (M-5H)/5, 907,7 (M-6H)/6
D8	4,96 min (F)	2379,3 [M-3H]/3
D9	5,49 min (G)	2146,4 [M-3H]/3
D10	5,44 min (H)	2082,7 [M-3H]/3, 1561,7 [M-4H]/4, 1249,1 [M-5H]/5, 1040,7 [M-6H]/6
D11	7,23 min (E)	2041,8 [M-3H]/3, 1531,1 [M-4H]/4, 1224,6 [M-5H]/5
D12	5,84 min (H)	1877,1 [M-3H]/3, 1407,6 [M-4H]/4, 1125,9 [M-5H]/5, 938,1 [M-6H]/6.
D13	5,367 min (E)	1965,3 [M-3H]/3, 1473,8 [M-4H]/4, 1178,8 [M-5H]/5, 982,2 [M-6H]/6
D14	4,78 min (I)	2275,0 [M-3H]/3, 1362,8 [M-5H]/5
D15	5,41 min (H)	1561,3 [M-4H]/4, 1249,1 [M-5H]/5, 1040,8 [M-6H]/6, 891,8 [M-7H]/7.
D16	5,44 min (J)	2150,8 [M-3H]/3, 1613,1 [M-4H]/4, 1289,9 [M-5H]/5, 1074,8 [M-6H]/6, 920,9 [M-7H]/7.
D17	4,78 min (K)	1789,4 [M-3H]/3, 1347,7 [M-4H]/4.
D18	4,74 min (L)	2083,1 [M-3H]/3, 1562,7 [M-4H]/4, 1249,5 [M-5H]/5.
D19	7,13 min (O)	1891,9 [M-3H]/3, 1418,4 [M-4H]/4, 1134,8 [M-5H]/5, 945,5 [M-6H]/6.
D20	9,7 min (P)	2700,4 [M-2H]/2, 1799,3[M-3H]/3
D21	6,1 min (P)	2891,3 [M-2H]/2,1927,2[M-3H]/3, 1445,1 [M-4H]/4, 1155,8 [M-5H]/5.
D22	6,23 min (Q)	1994,4 [M-3H]/3, 1495,7 [M-4H]/4, 1196,3 [M-5H]/5
D23	7,58 min (J)	1854,4 [M-3H]/3, 1390,8 [M-4H]/4, 1112,7 [M-5H]/5, 927 [M-6H]/6
D24	8,913 min (R)	1952,1 [M-3H]/3, 1463,4 [M-4H]/4, 1171,1 [M-5H]/5, 975,3 [M-6H]/6
D25	5,95 min (E)	1954,9 [M-3H]/3, 1466,1 [M-4H]/4, 1172,4 [M-5H]/5, 976,8 [M-6H]/6.
D26	6,957 min (S)	1759,1 [M-3H]/3, 1319,6[M-4H]/4, 1055,1 [M-5H]/5
D27	5,5 min (M)	2317,6 [M-3H]/3, 1737,2[M-4H]/4, 1389,3[M-5H]/5, 1157,7 [M-6H]/6.

Tabla 6: Secuencias de dímeros y engarces

Dímero nº	Secuencia
D8	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK{Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK(J-Glut)-NH ₂)K(Biotina-JJ)-NH ₂
D9	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGGK {[Ac-GDSRCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJGlut-)]-NH ₂)K-NH ₂
D10	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{[Ac-GDSRCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut-NH (CH ₂) ₄ -(S)-CH(PnAO6-Glut-NH)(C=O)-)-NH ₂)-NH ₂
D11	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{Ac-VCWEDSWEDSWGGEVCFRYDPGGGK{JJ-Glut-NH (CH ₂) ₄ -(S)-CH(DOTA-JJ-NH-)(C=O)-)-NH ₂)-NH ₂
D12	Ac-AGPTWCEDDYCWLFGTGGGK{[PnAO6-Glut-K(Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(-C(=O)CH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂ C(=O)-)-NH ₂)-NH ₂
D13	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK{JJ-Glut-K (BOA)]-NH ₂)-NH ₂ : Dímero 13 (D13)

D14	Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGK{PnAO6-Glut-K[Ac-GSDRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut)-NH ₂]-NH ₂ }
D15	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{[[Ac-GSDRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGKJJ-Glut]-NH ₂]-K (PnAO6-Glut)}-NH ₂ }
D16	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{PnAO6-Glut-K[Ac-GSDRVCWEDSWGGEVCFR YDPGGGK[-C(=O)CH ₂ O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ C(=O)NH(CH ₂) ₃ O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ (CH ₂) ₃ NH C(=O)CH ₂ O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ C (=O)-]-NH ₂]-NH ₂ }}
D17	Ac-AQDWYYDEILJGRGGRGGRGGK{K[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut)-NH ₂]-NH ₂ }
D18	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{PnAO6-Glut-K[Ac-GVDFRCEWSDWGEVGCSPDYGGGK (JJ-Glut)-NH ₂]-NH ₂ }
D19	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{Biotina-K[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut)-NH ₂]-NH ₂ }
D20	(-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH ₂)-Glut-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH ₂
D21	[-JJAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(PnAO6-Glut)-NH ₂]-Glut-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH ₂
D22	Ac-GSDRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK{JJ-Glut-JJ-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH ₂ }-NH ₂
D23	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK{JJ-Glut-K (SATA)}-NH ₂ }-NH ₂
D24	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{SATA-JJK[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(JJ-Glut)-NH ₂]-NH ₂ }
D25	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{Ac-GSDRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK{JJ-Glut-NH(CH ₂) 4-(S)-CH(NH ₂)C(=O)-]-NH ₂ }-NH ₂ }
D26	AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{(-Glut-JJ-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH ₂)-K}-NH ₂
D27	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK{S(GalNAc (Ac)3- alpha-D)-G-S(GalNAc(Ac)3-alpha-D)-Glut-S(GalNAc(Ac)3-alpha-D)-G-S(GalNAc(Ac)3-alfa-D)-NH (CH ₂) ₄ -(S)-CH(Biotina-JJNH)-C(=O)-]-NH ₂ }-NH ₂ }

Sistemas de análisis por HPLC

- 5 Sistema A: Columna: YMC C - 4 (4,6 x 250 mm); Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 25 % B, gradiente lineal 25 - 60 % B en 10 min., Caudal: 2,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.
- Sistema B: Columna: YMC C - 4 (4,6 x 250 mm); Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 25 % B, gradiente lineal 25 - 60 % B en 20 min., Caudal: 2,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.
- 10 Sistema C: Columna: YMC C - 4 (4,6 x 250 mm); Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 30 % B, gradiente lineal 30 - 60 % B en 10 min., Caudal: 2. 0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.
- Sistema D: Columna: YMC C - 4 (4,6 x 250 mm); Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 20 % B, gradiente lineal 20 - 60 % B en 10 min., Caudal: 2. 0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.
- 15 Sistema E: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 10 % B, gradiente lineal 10 - 60 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.
- Sistema F: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: Acetonitrilo (0,1 %TFA); Elución: Condición inicial 30 % B, gradiente lineal 30 - 70 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.
- 20 Sistema G: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 30 % B, gradiente lineal 30 - 75 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.
- 25 Sistema H: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 20 % B, gradiente lineal 20 - 52 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.
- Sistema I: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 10 % B, gradiente lineal 10 - 65 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.
- 30 Sistema J: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución:

Condición inicial 20 % B, gradiente lineal 20 - 60 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Sistema K: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 5 % B, gradiente lineal 5 - 60 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Sistema L: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 5 % B, gradiente lineal 5 - 65 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Sistema M: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 15 % B, gradiente lineal 15 - 50 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Sistema N: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 10 % B, gradiente lineal 20 - 80 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Sistema O: Columna: YMC - C18, 4,6 x 250 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 30 % B, gradiente lineal 30 - 60 % B en 10 min., Caudal: 2,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Sistema P: Columna: YMC - C18, 4,6 x 250 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 20 % B, gradiente lineal 20 - 80 % B en 20 min., Caudal: 2,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Sistema Q Columna: YMC - C18, 4,6 x 250 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 20 % B, gradiente lineal 20 - 60 % B en 6 min., Caudal: 2,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Sistema R: Columna: YMC - C18, 4,6 x 250 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 25 % B, gradiente lineal 25 - 60 % B en 10 min., Caudal: 2,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Sistema S: Columna: YMC - C18, 4,6 x 100 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: ACN (0,1 % TFA); Elución: Condición inicial 10 % B, gradiente lineal 10 - 60 % B en 10 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Ejemplo 12: Competición con ¹²⁵I-EGF por la unión a KDR en HUVEC y células transfectadas con KDR

El experimento siguiente evaluó la capacidad de los péptidos de unión a KDR para competir con VEGF marcado con ¹²⁵I por la unión a KDR expresado por las células 293H transfectadas.

Protocolo:

Las células 293H se transfectaron con el ADNc de KDR o se transfectaron de forma simulada mediante técnicas estándar. Las células e incubaron con ¹²⁵I-VEGF en presencia o ausencia de compuestos competidores (a 10 μM, 0.3 μM y 0.03 μM). Después de lavar las células se cuantificó la radiactividad unida en un contador gamma. El porcentaje de inhibición de la unión de VEGF se calculó usando la fórmula $[(Y1-Y2) \cdot 3.100/Y1]$, en la que Y1 es la unión específica a las células 293H transfectadas con KDR en ausencia de péptidos e Y2 es la unión específica a las células 293H transfectadas con KDR en presencia de péptidos competidores. La unión específica a las células 293H transfectadas con KDR se calculó restando la unión a las células 293H transfectadas de forma simulada de la unión a las células 293H transfectadas con KDR.

Resultados

Como se muestra en la FG. 14, todos los péptidos de unión a KDR analizados pudieron competir con ¹²⁵I-VEGF por la unión a células transfectadas con KDR. El heterodímero (D1) fue claramente el más eficaz en la competición con ¹²⁵I-VEGF, incluso sobre los dos homodímeros (D2 y D3), lo que confirma la superior unión de D1.

Ejemplo 13: Ensayo de activación del receptor

La capacidad de los péptidos de unión a KDR inhibiendo la activación inducida por VEGF (fosforilación) de KDR se evaluó usando el ensayo siguiente.

Protocolo

Placas de HUVEC casi confluentes se colocaron en medio basal sin suero ni factores de crecimiento durante la noche. Las placas del grupo (c) siguiente se pretrataron después durante 15 minutos en medio basal con un péptido de unión a KDR y después, las células en las placas de los grupos (a), (b) y (c) se colocaron en medio basal fresco que contenía:

(a) sin aditivos (control negativo),

(b) 5 ng/ml de VEGF (control positivo) o

(c) 5 ng/ml de VEGF más el supuesto péptido competidor/inhibidor.

Tras 5 minutos de tratamiento, los lisados se prepararon a partir de cada conjunto de placas. El KDR se inmunoprecipitó de los lisados y se analizó secuencialmente mediante inmunotransferencia para fosforilación con un anticuerpo anti-fosfotirosina y para KDR total con un anticuerpo anti-KDR (controlando la carga de la muestra).

Resultados

Como se muestra en la figura 15, D1 pudo bloquear por completo la fosforilación inducida por VEGF de KDR en HUVEX A 10 nM. Más de la mitad de la fosforilación fue inhibida por el compuesto a 1 nM. Los homodímeros D2 y D3, generados de los restos de unión individuales que están contenidos en D1, no tuvieron ningún efecto sobre la fosforilación a hasta 100 nM, lo que demuestra el beneficio de las construcciones de heterodímeros en el bloqueo de una interacción receptor-ligando. En múltiples experimentos, la CI_{50} para D1 en este ensayo varió entre 0,5 y 1 nM. Un heterodímero diferente que contiene secuencias de unión no relacionadas, un heterodímero cola-a-cola que comprende los polipéptidos de la SEC ID N.º: 36 y la SEC ID N.º: 37 (figura 51), no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación a 100 nM a pesar de su elevada afinidad de unión (11 nM para KDR por SPR), lo que sugiere que la elección de restos de unión a KDR es importante a la hora de construir un multímero para competir con VEGF por la unión a KDR. Un experto en la técnica podría construir heteromultímeros adecuados usando los polipéptidos de unión proporcionados en el presente documento y ensayos de detección selectiva de rutina.

Incluso aunque la afinidad de D1 por KDR es 10 veces mayor que la de D2 (mediante análisis SPR), la CI_{50} de D1 en el ensayo de activación es al menos 100 veces menor. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, esto sugiere que apuntar a dos epítomos distintos en KDR con una única molécula de unión puede generar mayor hidrancia estérica que una molécula con afinidad similar que solo se une a un único epítomo en KDR y por tanto, mejora la capacidad para inhibir la actividad de KDR inducida por VEGF. De un modo similar deberá destacarse que los dos restos de unión a KDR dentro de D1, cuando se analizan como péptidos monoméricos libres (SEC ID N.º: 17 y SEC ID N.º: 49 en el ensayo de activación del receptor, tenían CI_{50} de 0,1 y 1 micromolar, respectivamente. La CI_{50} para los péptidos monoméricos libres fue de 100 a 1.000 veces mayor que la CI_{50} para D1 en el ensayo y de 14 a 30 veces mayor que las K_D para los derivados fluoresceinados de los péptidos monoméricos. Por tanto, crear un dímero que contiene dos péptidos con débil actividad de bloqueo de VEGF ha tenido como resultado una molécula con actividad de bloqueo de VEGF muy potente mucho más allá que la afinidad de unión incrementada de D1.

Ejemplo 14: Ensayo de migración

El experimento siguiente evaluó la capacidad de D1 bloqueando la migración inducida por VEGF de HUVEC en cultivo.

Protocolo

HUVEC sin suero se colocaron, a 100.000 células por pocillo, en las cámaras superiores de placas de inserto de 24 pocillos FluoroBlok (n.º 354141). revestidas con matrigel. A la cámara inferior de los pocillos se añadió medio basal que no contenía nada o diferentes atrayentes tales como VEGF (10 ng/ml) o suero (5 % FBS) en presencia o ausencia de posibles compuestos bloqueantes/inhibidores de VEGF. Tras 22 horas se consiguió cuantificar la migración/invasión celular por posmarcage de células en las placas con inserto con un pigmento fluorescente y midiendo la fluorescencia de las células invasoras/migrantes en un lector de placas de fluorescencia. La migración inducida por VEGF se calculó restando la migración que se había producido solo cuando se colocó medio basal en la cámara inferior de los pocillos.

Resultados:

El VEGF indujo un gran incremento de la migración de células endoteliales en el ensayo, que se bloqueó potentemente por D1. A 5 nM D1, el bloqueo de la migración de células endoteliales estimada por VEGF fue del 84 % (Véase la figura 16). A 25 nM D1, esta migración se bloqueó casi por completo. En otros experimentos, un inhibidor de KDR conocido, SU-1498 (Strawn, L. y col., 1996, Cancer Res., 56:3540-3545) se analizó en el ensayo. SU-1498 a 3 micromolar no bloqueó la migración inducida por VEGF así como D1 (47 % bloqueado a 3 micromolar). D6 (estructura mostrada más adelante en el ejemplo 18), a 50 nM, también produjo inhibición esencialmente completa de la migración estimulada por VEGF. El suero fue un atrayente muy potente en el ensayo cuando se usó en lugar de VEGF, pero su efecto no disminuyó significativamente por D2, lo que indica que D1 inhibe específicamente la migración de células endoteliales inducida por VEGF.

Ejemplo 15: Análisis Biacore de la unión del heterodímero a KDR-Fc y determinación de la constante de afinidad

Un heterodímero peptídico (figura 50) compuesto por la SEC ID N.º: 17 y la SEC ID N.º: 31 se preparó como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 12 usando N-hidroxisuccinimidiléster de ácido glutámico. El heterodímero se analizó por su unión a KDR-Fc usando Biacore y una constante de afinidad se determinó del siguiente modo:

Tres densidades de KDR-Fc se reticularon a la superficie de dextrano de un circuito sensor de CM5 mediante el procedimiento de acoplamiento de amina estándar (soluciones 0,5 mg/ml diluidas a 1:100 o 1:50 con acetato 50 mM, pH 6,0). El caudal 1 se activó y después se bloqueó para servir como resto de referencia. Niveles de inmovilización

RL Fc 2 KDR-Fc = 1607

RL Fc 3 KDR-Fc = 3001

RL Fc 4 KDR-Fc = 6319

Los experimentos se realizaron en PBS (fosfato 5.5 mM, pH 7,65, NaCl 0,15M, 0,005 % de P -20 (v/v). D6 se diluyó a 250 nM en PBS y se realizaron diluciones en serie produciendo soluciones de 125, 62.5, 31.3 15.6, 7.8 y 3.9 nM. Todas las muestras se inyectaron por duplicado. Para asociación, los péptidos se inyectaron a 20 ml/min durante 12,5 minuto usando el programa kinject. Tras disociación de 10 minuto, cualquier péptido que quedase se raspó de la superficie de KDR con una inyección rápida de NaCl 50 mM + NaCl 1 M durante 12 segundos a 75 µl/min. Los sensogramas se analizaron usando el software de evaluación BIA.

3.1 y una ecuación de regresión rectangular doble hiperbólica en SigmaPlot 6.0. Las afinidades de unión en el equilibrio del heterodímero (K_{DAV}) se determinaron en las tres densidades de inmovilización de KDR (tabla 7).

Tabla 7 - Resumen de los parámetros

		K_{D1} (nM)	R_{max1}	K_{DAV} (nM)	R_{maxA} V	$R2^*$
D6	Vs. 1600RU	46	13,1	1,5	12,6	0,995
	Vs. 3000RU	25,5	21,2	0,665	22,7	0,991
	Vs. 6000RU	17	61,3	0,662	62,2	0,993

A partir de estos datos, parece que a las densidades de inmovilización más altas, el heterodímero se une a KDR con una afinidad subnanomolar (~ 0,6 nM).

Evaluando el aclaramiento in vivo de este heterodímero peptídico, una cantidad pequeña de material se yodó usando yodógeno y $Na^{125}I$ según los protocolos estándar (Pierce). Un tubo recubierto con el reactivo yodógeno se prehumidificó con 1 ml de Tris 25 mM, NaCl 0,4M, pH 7,5. Esto se desechó y se añadieron 100 µl del mismo tampón. Usando una jeringa de Hamilton, 11 µl del ^{125}I -NaI se transfirieron al tubo de reacción. En base a las estimaciones originales de la concentración de ^{125}I -NaI de 143,555 mCi/ml, los 11 µl, deberán contener aproximadamente 1,5 mCi. Tras la adición, se agitó suavemente la muestra y se dejó en una cola de cerdo incubando durante 6 minutos con una agitación cada 30 segundos. Tras 6 minutos, toda la muestras se transfirió a la proteína que estaba en un tubo de Eppendorf. La muestra se agitó suavemente y se dejó incubar durante 8 minutos con una agitación suave cada 30 segundos. Tras 8 minutos, se inactivó (se terminó) la reacción con tirosina (10 mg/ml, una solución saturada), se dejó reposar durante 5 minutos y después se retiraron 2 µl para un patrón.

Purificando se usó una columna de 10 ml de la D-sal de poliacrilamida 1800 separando el péptido marcado de la tirosina marcada. La columna se lavó primero con 10 ml de solución salina, después 5 ml de Tris 25 mM, NaCl 0.4M, pH 7,5 que contiene 2,5 % de HSA bloqueando los sitios inespecíficos. Después de lavar con el tampón de HSA, la columna se eluyó con 60 ml de Tris 25 mM, NaCl 0.4M y la columna se almacenó durante la noche a 4 °C. La muestra marcada contenía 1,355 mCi según determine el calibrador de dosis. La muestra de 2 µl que se retiró como patrón contenía 8, mCi. La muestra de péptido se aplicó a la columna de D-sal 1800 y eluyó con el tampón Tris/NaCl a pH 7,5. El flujo se controló aplicando alícuotas únicos de 0,5 ml para cada fracción, 1-4 y después, 1,0 ml para las fracciones 25-43. La figura 18 muestra el perfil de elución de la actividad frente a número de fracción. El máximo de la actividad en las fracciones 9, 10 y 11 se asumió que era el péptido. La radiactividad en de 24 a 40 es probable que sea de la tirosina marcada. A partir de esta purificación, las fracciones 9-12 se combinaron y se usaron para el posterior estudio de aclaramiento (concentración de ^{125}I -D6 en grupos es de 7,023 µg/ml; 100 µl = 0,702 µg con 8,6 µCi).

Se inyectó en un total de 15 ratones 100 µl de ^{125}I -D6 y se sacrificó a los ratones (en grupos de 3) en los puntos de tiempo siguientes: 0, 7, 15, 30, 90 minutos. Tras la inyección se encontró que quedaba en la jeringa más de 2 mCi, por lo que la actividad real inyectada fue de aproximadamente 6 mCi. Con los mCi inyectados, la correspondiente proteína administrada fue de ~0,5 µg por animal. Una vez sacrificados se determinaron los recuentos en una muestra de 50 µl de plasma de cada animal. Para cada grupo de tres animales en cada punto de tiempo se realizó la media de los recuentos, se convirtió a % de la dosis inyectada/ml de plasma (ID%/ml) y después se representó evaluando la tasa de aclaramiento (figura 18). Estos datos se van a ajustar en una ecuación de 4 o 5 parámetros

determinando la semivida bifásica de esta molécula. El ajuste de 4 parámetros tuvo como resultado un $T_{1/2\alpha}$ de 2,55 minutos y un $T_{1/2\beta}$ de 64,66 minutos. El ajuste de 5 parámetros tuvo como resultado un $T_{1/2\alpha}$ de 2,13 minutos y un $T_{1/2\beta}$ de 23,26 minutos.

También se tomaron volúmenes mayores de plasma de ratones sacrificados a los puntos de tiempo de 0, 30 y 90 minutos. Estas muestras se inyectaron en una columna peptídica Superdex (Pharmacia) acoplada a un detector de radiactividad evaluando la asociación del péptido con las proteínas séricas (figura 19). Como se ha mostrado, el péptido marcado sí se asocia con proteínas de mayor PM, lo que podría explicar el comportamiento de aclaramiento de la semivida bifásica.

Ayudando a evaluar la potencia del péptido como inhibidor anti-angiogénico, D6 se analizó en un ensayo de proliferación de células endoteliales usando HUVEC y detección de BrdU. Brevemente, HUVEC recién aisladas (entre p3-6) se cultivaron en RPMI + 10 % FCS + 1 % antibióticos + 1 % L-glutamina + 0,4 % BBE (extracto de cerebro bovino) y se sembraron por pocillo 5000-10000/pocillo en 100 μ l. Las células se dejaron recuperar durante 24 horas antes de usar. Después, las células se lavaron con PBS dos veces y se trataron durante 48 horas con anticuerpo anti-VEGF (control positivo) o los péptidos A, B y C (0,1 y 10 μ g/ml) en RPMI + 0,1 % BSA + 1 % L-glutamina. Las siguientes 6 variables se analizaron en 2 series (n=4):

Serie I: sin VEGF

Serie II: Con VEGF (30 ng/ml):

1. Medio estándar: RPMI + 10 % FCS + 1 % antibióticos + 1 % L-glutamina + 0,4 % BBE

2. Control negativo 1: RPMI (inaniación verdadera)

3. Control negativo 2: RPMI + 0,1 % BSA + 1 % L-glutamina

4. Control positivo: anti-VEGF 10 μ g/ml in RPMI + 0,1 % BSA + 1 % L-glutamina

5. 0,1 μ g/ml de péptidos KDR en RPMI + 0,1 % BSA + 1 % L-glutamina

6. 10 μ g/ml de péptidos KDR en RPMI + 0,1 % BSA + 1 % L-glutamina

Protocolo:

1) las células se incuban durante 48 horas en varias condiciones

2) dilución de 10 μ l BrdU (1:100 en EBM) se añade a cada pocillo a 24 horas

3) se incuban durante otras 24 horas (total 48 horas)

4) se aspira el medio de cultivo

5) se añaden 100 μ l de FixDenat (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) a cada pocillo, se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos.

6) Se desecha la solución FixDenat

7) a cada pocillo se añaden 100 μ l de solución de anticuerpo (PBS 1 % BSA y anti-BrdU PO)

8) se incuban a TA durante 90 minutos.

9) se lava 3 veces con PBS, 200 μ l/pocillo, 5 minutos

10) se añade solución de sustrato (TMB), se incuba durante 10 - 30 minutos

11) se transfiere todo a una placa flexible

12) se detiene la reacción añadiendo H₂SO₄, 2M, 25 μ l/pocillo

13) se lleva absorbancia a 450 nm en 5 minutos desde la detención de la reacción.

La unión de fondo se determinó omitiendo el anticuerpo anti-BrdU en 4 pocillos con células control (cultivadas en medio completo; EBM + BulletKit (Clonetics, BioWhittaker, Inc., MD) y mediante marcaje completo de las células que

no se habían expuesto a BrdU.

De los dos péptidos de unión a KDR analizados (D6 y SEC ID N.º: 17) como se muestra en la figura 19, D6 inhibe completamente la proliferación de HUVEC a 10 µg/ml en presencia de VEGF, similar a un anticuerpo anti-VEGF (control positivo). Por otro lado, la SEC ID N.º: 17 (uno de los péptidos que generaron el heterodímero) no inhibió la proliferación en este ensayo a la concentración más alta analizada (10 µg/ml). Como resultado en el heterodímero muestra una mayor capacidad compitiendo con VEGF en comparación con la SEC ID N.º: 17 sola.

Ejemplo 16: Análisis BIAcore de la unión a KDR-Fc murino de los dímeros peptídicos D1 y D7

Usando BIAcore se determinaron las constantes de unión de los dímeros peptídicos D1 (un heterodímero de la SEC ID N.º: 17 y la SEC ID N1 31 y D7 (un heterodímero de SEC ID N.º: 5 y la SEC ID N.º: 31, véase la figura 1) para KDR-Fc murino.

Procedimiento

Tres densidades de KDR-Fc murino recombinante se reticularon a la superficie de dextrano de un circuito sensor de CM5 mediante el procedimiento de acoplamiento de amina estándar (soluciones 0,5 mg/ml diluidas a 1:100 o 01:40:00 con acetato 50 mM, pH 6,0). El caudal 1 se activó y después se bloqueó sirviendo como resto de referencia. Niveles de inmovilización finales alcanzados:

RL Fc 2 KDR-Fc = 2770

RL Fc 3 KDR-Fc = 5085

RL Fc 4 KDR-Fc = 9265

Los experimentos se realizaron en tampón PBS (fosfato 5.5 mM, pH 7,65, NaCl 0,15M, 0,005 % de P -20 (v/v). La SEC ID N.º: 17 se usó como control y se diluyó hasta 125nM en PBS. Se realizaron diluciones en serie produciendo soluciones de 125, 62.5, 31.3 15.6, 7.8 y 3.9 nM. D1 y D6 se diluyeron a 50 nM en PBS y se realizaron diluciones en serie produciendo soluciones de 25, 12.5, 6,25 3,13, 1,56 y 0,78 y 0,39 nM. Todas las muestras se inyectaron por duplicado. Para asociación, los péptidos se inyectaron a 30 ml/min durante 3 minuto usando el programa kinject. Tras disociación de 10 minuto, cualquier péptido que quedase se raspó de la superficie de rmKDR-Fc con una inyección rápida de NaCl 50 mM + NaCl 1 M durante 12 segundos a 75 µl/min. .

Los sensogramas se analizaron usando el programa de ajuste de k_a/K_D simultáneo en el software BIAevaluation 3.1. Los resultados se muestran en la tabla 8 y las figuras 20-21. El hecho de que aproximadamente la misma constante $KD2$ se alcanzó para ambos heterodímeros, incluso cuando la densidad del circuito sensor se había reducido a la mitad es consistente con unión multimérica de los heterodímeros a receptores individuales en lugar de la unión de tipo reticulación entre receptores.

Tabla 8 - Resumen de los parámetros cinéticos

		k_{a1} (1/Ms)	K_{d1} (1/s)	k_{a2} (1/RUs)	k_{d2} (1/s)	$K_{D1\#}$ (nM)	$K_{D2\ddagger}$ (nM)	χ^2_{*}
D1	vs. 2700RU	7,94E+05	0,0139	3,31 E-04	5,96E-04	17,5	0,751	0,077
	vs. 5000RU	5,54E+05	8,88E-03	1,17E-04	4,57E-04	16	0,825	0,323
D7	vs. 2700RU	7,59E+05	0,011	3,36E-04	6,44E-04	14,5	0,848	0,082
	vs. 5000RU	5,21E+05	7,39E-03	1,17E-04	4,68E-04	14,2	0,898	0,278
Fluoresceína SEC ID N.º: 17	vs. 2700RU	1,02E+06	0,037	-	-	36,4	-	0,073
	vs.5000R4	5,18E+05	0,017	-	-	33,6	-	0,167

$KD1$ es una K_D calculada en base a k_{d1}/k_{a1}

‡ $KD2$ es una K_D calculada en base a k_{d2}/k_{a1} (es decir, factor de avidéz)

* El valor de χ^2 es una medida estadística estándar de lo cercano del ajuste. Para un buen ajuste a los datos ideales, χ^2 es del mismo orden de magnitud que el ruido de instrumento en RU (normalmente < 2).

Ejemplo 17: Inhibición in vivo del crecimiento tumoral

Se describen condiciones que proporciona métodos para determinar la eficacia de tres (3) concentraciones para el

artículo de ensayo (péptido de unión, D6) que se sospecha que tiene actividad antiangiogénica en células de carcinoma de colon humano SW-480 usando un modelo tumoral de xenoinjerto in vivo.

Los ratones atímicos son huéspedes aceptables para el crecimiento de células alogénicas y heterogénicas. Los ratones atímicos se requieren en los Puntos a considerar en la caracterización de las líneas celulares usadas produciendo productos biológicos (Points to Consider in the Characterization of Cell Lines used to Produce Biologicals, FDA 1993).

D6 es un péptido heterodimérico sintético que se sospecha que tiene actividad anti-angiogénica. Este péptido se une al receptor 2 de VEGF humano (KDR) con una afinidad elevada y compite con la unión de VEGF.

Células de carcinoma humano SW-480

Las células de carcinoma de colon, SW-480, (ATCC) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con L-glutamina 4 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 50 mg/ml, fungixona 250 mg/ml y 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor a 37 °C en 95 % de aire y 5 % de CO₂.

Las células en crecimiento exponencial se recogieron, se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) eliminando todos los rastros de tripsina o suero. Las células se suspendieron en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) para inyecciones.

La solución salina tamponada con fosfato estéril (BioWhittaker) se fabricó de acuerdo con los reglamentos de las BPCc y se analizó el cultivo celular asegurando la compatibilidad; teniendo un pH de 7,3-7,7 y una osmolalidad de 271-287 mOsm/kg. El PBS fue el vehículo usado reconstituyendo artículos de ensayo y para inyecciones de vehículo control.

Se preparó cisplatino (American Pharmaceutical Partners, Inc.; Los Ángeles, CA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El cisplatino se preparó en condiciones asépticas usando un capuchón de BL2 BioChem.

SISTEMA DE ENSAYO

A. Especie/Cepa: Mus musculus, ratones Crl:NU/NU-nuBR (ratones atímicos)

B. Sexo: Hembra

C. Edad: 6 - 8 semanas al inicio del tratamiento

D. Intervalo de pesos: No se requiere ningún peso

E. Fuente: Los animales se recibieron de Gnotobiotic Department en Charles River Laboratories, Wilmington, MA.

F. Número: Se recibió un total de 115 animales y fueron inyectados para este estudio, usándose 90 ratones en el estudio.

G. Método de identificación:

Se numeró a los ratones con un número único usando un sistema de marcaje de la oreja. Además, las jaulas se marcaron con tarjetas de jaulas que identifican como mínimo el número de grupo, el número de animal, el número del estudio y el número de protocolo IACUC.

H. Aleatorización

Los animales se asignaron de forma aleatoria a grupos de tratamiento y usando el programa Microsoft® Excel 97 SR-1.

I. Atención de los animales por los seres humanos:

El tratamiento y cuidados de los animales se realizaron de acuerdo con procedimientos normalizados de trabajo de los Charles River Laboratories, que cumplen los reglamentos destacados en el USDA Animal Welfare Act (9 CFR, Partes 1, 2 y 3) y la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Este protocolo de estudio estaba cubierto por las guías de Charles River Laboratories Institutional Animal Care and Use Committee (Número de protocolo IACUC P071820011).

CUIDADOS DE ANIMALES

A. Dieta y agua de bebida

Los ratones recibieron *ad libitum* pienso para roedores irradiados con gamma . El agua corriente se esterilizó y suministró mediante un frasco y un tubo bebedor *ad libitum*.

B. Entorno del animal:

Los animales fueron estabulados por grupos en aisladores semirrígidos. Los ratones fueron estabulados en jaulas de fondo plano que contenían de cinco a diez animales. Las jaulas contenían lechos de contacto irradiados por gamma, El número de ratones de cada jaula se puede haber alterado debido al comportamiento de los ratones, se observaron cambios en el inventario del aislador. El alojamiento se adecúa a las recomendaciones expuestas en las Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington, D.C., 1996 y sus revisiones posteriores.

Se establecieron controles ambientales manteniendo una temperatura de 16-26°C (70 6 8°F) con una humedad relativa de 30 - 70 . Se mantuvo un ciclo de luz:oscuridad de 12:12.

C. Aclimatación:

Una vez recibidos los animales, se dejaron aclimatar en el ambiente del laboratorio durante 24 horas antes del inicio del estudio. Se observó a los ratones en busca de signos de enfermedad, consumo no habitual de agua y/o comida u otros signos generales de mal estado. En el momento de la recepción del animal, se observó a los animales clínicamente y parecían estar sanos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Descripción general

En este estudio se usaron ratones hembra atímicos (CrI:NU/NU-nuBR) de 6-8 semanas de edad. A un total de 115 ratones se inyectó por vía subcutánea en el lateral torácico derecho 5 x 10⁶ SW-480, células de carcinoma de colon humano. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ventana diana de aproximadamente 150 x 75 mg, 90 ratones portadores de tumores se seleccionaron al azar y se distribuyeron a uno de nueve grupos. Los artículos de ensayo y el vehículo se administraron por vía intraperitoneal (IP), el cisplatino se administró por vía intravenosa (IV). Las mediciones de los tumores se registraron dos veces a la semana usando compases manuales. Se sometió a los animales a monitorización diaria para detectar signos de toxicidad y morbilidad. Al finalizar el estudio se sacrificó a los animales con sobredosis de dióxido de carbono y se realizó la necropsia para obtener tejido.

B. Asignaciones de los grupos:

En este estudio se usó un total de nueve (9) grupos. Cada grupo contenía diez (10) ratones portadores de tumores. Los grupos 1 y 2 contenían ratones control negativo sin tratar y tratados con vehículo, respectivamente. Los grupos 3, 4 y 5 contenían ratones que recibieron una de tres diferentes concentraciones del péptido D6 antiangiogénico. El grupo 9 contenía ratones que habían recibido cisplatino, un compuesto quimioterapéutico estándar como control positivo.

C. Niveles y pautas posológicas

Los niveles de dosis para cada grupo se proporcionan en la tabla 9. La dosificación comenzó el mismo día que los animales fueron asignados al azar a los grupos (Día 7 del estudio). Cada dosis se extrajo del vial de dosis usando una técnica aséptica para cada animal y el lugar de la inyección se limpió con una torunda en alcohol antes de administrar la dosis. Las dosis se administraron con una jeringuilla de 1,0 ml y una aguja de calibre 27 x ½ para cada ratón.

Los ratones tratados con el artículo de ensayo y con vehículo recibieron inyecciones diarias intraperitoneales (IP) durante 15 días. El cisplatino se administró en días laborables alternos para un total de cinco (5) dosis por vía intravenosa.

Tabla 9. Grupos de tratamiento del estudio

Grupo de cerdas	Artículo del ensayo	Concentración mg/kg	Número de animales
1	Sin tratar	-	10
2	Vehículo	0	10
3	D6	0,05	10

4	D6	0,5	10
5	D6	5,0	10
9	Cisplatino	6,0	10

D. Observaciones clínicas de los animales:

- 5 Las observaciones clínicas de cada animal se realizaron y registraron al menos una vez al día determinando toxicidad, morbilidad y mortalidad. La morbilidad incluyó signos de enfermedad tales como, entre otros, emaciación, deshidratación, letargo, postura encorvada, aspecto descuidado, disnea y orina o heces teñidas.

E. Mediciones del tumor:

- 10 De acuerdo con el protocolo se realizaron mediciones del tumor dos veces a la semana durante todo el estudio midiendo la longitud y la anchura de los tumores con compás calibrado. Las mediciones se realizaron separadas un mínimo de 3-4 días, salvo cuando se sacrificó a los animales y se realizaron mediciones; en ocasiones esto tuvo como resultado un intervalo inferior a 3 días. El peso del tumor se calculó usando la fórmula siguiente: $mg = (L \times W^2)/2$. Los animales se sacrificaron cuando el tumor pesaba ≥ 1000 mg por grupo durante dos (2) mediciones consecutivas o si los tumores se ulceraron, alteraron la capacidad del animal para deambular u obtener alimentos y agua.

F. Eutanasia no programada y muertes inesperadas:

- 20 1. Eutanasia no programada:

Ninguno de los animales requirió eutanasia no programada durante el estudio.

- 25 2. Muertes inesperadas:

Ninguno de los animales murió durante el estudio.

G. Necropsia:

- 30 1. Eutanasia y solicitud de necropsia:

Todos los ratones en los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 (50 total) se sometieron a la necropsia cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio diana del grupo de ≥ 1000 sobre dos (2) medidas consecutivas dentro de un grupo. Los animales se sometieron a la necropsia en el Charles River Laboratories Health Monitoring Laboratory (HM), Wilmington, MA. Todos los animales fueron sacrificados el día 22 del estudio, más o menos recibieron el régimen de tratamiento completo de 28 días con los artículos de ensayo porque el tamaño medio del tumor era de ≥ 1000 mg en los grupos 3-8 tratados con el artículo de ensayo.

Todos los animales fueron sacrificados humanamente con inhalación de dióxido de carbono (CO₂).

- 40 2. Recolección de tejido.

Se diseccionaron los tumores sin tejido circundante y sobre la piel. Adicionalmente se extirparon los riñones- Se registraron todas las anomalías en las superficies renales.

Se realizaron bloques congelados de tumores y riñones para cada animal. Se tomó una sección representativa del tejido (tumor, riñones). Las secciones renales incluyeron la corteza y la médula. Las secciones tisulares se colocaron en el fondo de un molde de congelación de plástico marcado. El tejido se incluyó en medio OCT. Los bloques se sumergieron en isopentano enfriado con hielo seco hasta que se congelaron. Los bloques se examinaron brevemente según su calidad y se almacenaron en hielo seco.

Los bloques se marcaron con el número del animal y un código de letras correspondiente al tejido (A= riñón izquierdo; B= riñón derecho; C= masa). Los bloques de un animal se colocaron en una bolsa marcada.

55 RESULTADOS

A. Mediciones durante la vida y observaciones:

- 60 1. Declaración resumen de las observaciones clínicas, morbilidad y mortalidad:

Todos los animales parecían sanos y estaban dentro de los límites normales a lo largo del estudio. D6 no mostró

signos de toxicidad a las dosis usadas en este estudio.

Se sacrificó a los animales el día 22 del estudio. Todos los ratones, a excepción de los ratones del grupo 9, fueron sacrificados antes de completar la administración del artículo de ensayo, dado que el tamaño medio del tumor era $\geq$ 1000 mg en los grupos 1-8. El grupo 9, animales tratados con cisplatino, fueron sacrificados el día 22 del estudio cuando el peso medio del tumor fue de 995 mg. Ningún animal murió durante el estudio.

2. Declaración resumen de la palpación de la masa:

Durante el estudio se detectaron las masas palpables en todos los ratones con tumores en crecimiento progresivo durante el estudio. Como cabe esperar, los tumores en ratones control negativos sin tratar y tratados con vehículo (Grupos 1 y 2) crecieron más rápido, alcanzando un tamaño medio del tumor de 1000 mg el día 20 del estudio o antes. Además, los animales tratados con cisplatino (grupo 9) desarrollaron tumores que crecieron los más lentos, alcanzando un tamaño medio del tumor de 995 mg al finalizar el estudio (día 22).

En general, salvo por los ratones del grupo 3, todos los animales tratados con el artículo de ensayo dieron lugar a un crecimiento tumoral más lento (figura 54). Los animales del grupo 3, tratados con la dosis baja de D6 (0,05 mg/kg) tenían tumores que crecieron aproximadamente a la misma velocidad que los tumores en los animales no tratados y tratados con vehículo en los grupos 1 y 2. Los animales tratados con dosis más altas de D6 (grupos 4 y 5) tenían tumores que crecían más lento; alcanzando un tamaño medio del tumor de 1000 mg el día 21 del estudio. Cuando se comparó con los ratones del grupo 1 y 2 control, el tratamiento con el artículo del ensayo dio lugar a un retraso del crecimiento del tumor de aproximadamente 1 día.

B. Conclusiones:

Los datos de este estudio validan el modelo usado porque los ratones portadores de tumores en los grupos 1 y 2 control negativo y el grupo 9 control positivo respondieron como se esperaba.

Durante el estudio, se observaron masas palpables en todos los grupos. Además, todos los animales parecían sanos y estaban dentro de los límites normales a lo largo del estudio. Además, D6 no afectó adversamente a los animales. Por tanto, estos datos sugerirían que los animales tratados con el artículo del ensayo D6 tenían tumores que crecieron más lentamente (aproximadamente 1 día más lento sobre el periodo de 22 días del estudio que los controles). Asimismo, dado que el artículo de ensayo no mostró ningún efecto tóxico significativo también se podían usar concentraciones más altas del artículo de ensayo con regresión tumoral potencialmente mejor.

Tabla 10

		Artículo de ensayo						
		Control sin tratar	Vehículo control	D6		Cisplatino		
				0,005 mg/kg	0,05 mg/kg	0,5 mg/kg	6 mg/kg	
Días tras la inyección de células	4	48	49	43	51	50	34	Pesos del tumor (mg)
	7	164	156	157	163	154	160	
	8	180	164	156	133	168	173	
	11	340	388	333	298	310	407	
	14	684	648	726	596	577	675	
	20	1064	986	973	857	978	635	
	21	1412	1571	1468	983	1056	839	
	22	1967	1863	2026	1474	1526	995	

Ejemplo 18: Ensayos de proliferación celular in vitro

Las células endoteliales microvasculares (MVEC, Cascade Biologics, Portland, OR) se usaron evaluando la eficacia in vitro de D6 y análogos relacionados por su capacidad inhibiendo la proliferación estimulada por VEGF. Las MVEC (pase 2) se cultivaron hasta 90 % de confluencia, se digirieron con tripsina y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos revestidos con gelatina a una densidad de $4-8 \times 10^3$ células/pocillo. De dieciséis a 24 horas después de la siembra en placas se lavaron las placas una vez (200 μ l/pocillo) con medio desprovisto de suero bovino fetal pero con soroalbúmina bovina al 0,1 % (BSA). A cada pocillo se añadió medio con BSA fresco y las células se incubaron durante 24 horas adicionales. Tras este periodo de inanición de 24 horas, se añadió medio

con BSA fresco (que contiene 25 ng/ml de VEGF) con o sin D6 y las células se incubaron durante 48 horas adicionales a 37 °C. Evaluando la respuesta a la dosis en este ensayo, las múltiples concentraciones de D6 se analizaron en pocillos por duplicado. Se retiró el medio y se añadió medio con BSA fresco con o sin BrdU y las células se incubaron durante 24 horas adicionales antes de determinar el nivel de incorporación exactamente como ha descrito el fabricante. Los resultados se muestran en la figura 61.

Ejemplo 19

El experimento siguiente evaluó la capacidad de D25 y D27 bloqueando la migración inducida por VEGF de HUVEC en cultivo y demostró que la glicosilación añadida y/o la distinta estructura del espaciador usado en D27 aumentaba su potencia.

Protocolo: HUVEC sin suero se colocaron, a 100.000 células por pocillo, en las cámaras superiores de placas de inserto de 24 pocillos FluoroBlok revestidas con fibronectina. A la cámara inferior de los pocillos se añadió medio basal con o sin VEGF (10 ng/ml) en presencia o ausencia de D25 o D27. Tras 22 horas se consiguió cuantificar la migración/invasión celular mediante posmarcaje de células en las placas con inserto con un pigmento fluorescente y midiendo la fluorescencia de las células invasoras/migrantes en un lector de placas de fluorescencia. La migración inducida por VEGF se calculó para cada condición experimental restando la cantidad de migración que se había producido solo cuando se añadió medio basal en la cámara inferior de los pocillos.

Resultados: VEGF indujo un gran incremento de la migración de las células endoteliales en el ensayo, que fue bloqueado potentemente por D25 y D27. D27 fue diez veces más potente que D25 (CI₅₀ 0,5 nM y 5 nM respectivamente), lo que indica que la glicosilación de D27 y/o sus distintas propiedades del espaciador ha aumentado su capacidad para unirse a KDR y bloquear los efectos de VEGF.

Ejemplo 20

En el experimento siguiente evaluó la capacidad de la construcción multimérica "Auxiliar A" del péptido TKPPR (se une a NP-1, un receptor de VEGF que potencia los efectos de VEGF mediado por KDR) potenciando la inhibición de la migración inducida por VEGF de HUVEC en cultivo producida por D6. Auxiliar A) 5CF-Gly-N[(CH₂CH₂C(=O)-Gly-N(CH₂CH₂C(=O)-Adoa-Thr-Lys-Pro-Pro-Arg-OH)₂]₂ en la que Adoa = 3,6-dioxa-8-aminooctanoílo, 5CF = 5-carboxifluoresceínilo.

Protocolo: HUVEC sin suero se colocaron, a 100.000 células por pocillo, en las cámaras superiores de placas de inserto de 24 pocillos FluoroBlok revestidas con fibronectina. A la cámara inferior de los pocillos se añadió medio basal con o sin VEGF (10 ng/ml) en presencia o ausencia de concentraciones variables de D6 o concentraciones variables de D6 en combinación con un auxiliar A 100 nM constante (sintetizado como se ha descrito en el documento WO 01/91805 A2). Tras 22 horas se consiguió cuantificar la migración/invasión celular mediante posmarcaje de células en las placas con inserto con un pigmento fluorescente y midiendo la fluorescencia de las células invasoras/migrantes en un lector de placas de fluorescencia. La migración inducida por VEGF se calculó para cada condición experimental restando la cantidad de migración observada en ausencia de VEGF.

Resultados: El VEGF indujo un gran incremento de la migración de células endoteliales en el ensayo, que se bloqueó potentemente por D6 (CI₅₀ aproximadamente 12,5 nM), pero no por el auxiliar A solo 100 nM (figura 53). No obstante, sorprendentemente, el Auxiliar A pudo aumentar la potencia de D6 por aproximadamente diez cuando se usó en el ensayo simultáneamente con D6 (CI₅₀ aproximadamente 2,5 nM). Esto indica que los compuestos que contienen la secuencia TKPPR (o similar) encontrada en el Auxiliar A se puede usar aumentando la potencia de determinados compuestos tales como D6, que compiten con VEGF por la unión a KDR. Además, un heteromultímero que contiene las secuencias peptídicas encontradas en D6 o similar así como la secuencia TKPPR (o similar) en una o más repeticiones probablemente posea una mayor actividad en este ensayo.

Ejemplo 21: Síntesis de D27

Síntesis de 1 y 3 (véanse las figuras 54 y 55)

La síntesis de los monómeros se realizó como se describe en el método 5 en una escala de 0,25 nmol que emplea como resina de partida la resina Fmoc-GGGK(IV-Dde)NH-PAL-PEG-PS. La resina peptídica se lavó y se secó antes de la escisión o posterior derivatización mediante métodos automáticos o manuales.

Procedimiento: síntesis del péptido 2 y el péptido 4 (véanse las figuras 54 y 55)

Se fijaron restos de Biotina-JJ, Lisilo, Glicilo y Serinil(GalNAc(Ac)3-α-D a 1 y 2 mediante SPPS manual tal como se describe en el método 6 y el método 8. El acoplamiento de los aminoácidos se realizó en DMF usando activación por HOBt/DIC (a excepción de Ser(GalNAc(Ac)3-α-D). La eliminación de Fmoc se llevó a cabo con 20 % de piperidina en DMF. Todos los acoplamientos duraron 5-16 horas. Después de cada acoplamiento, la finalización se confirmó mediante la prueba de Kaiser. En el caso de Ser (GalNAc(Ac)3-α-D, el acoplamiento se realizó en DMF empleando

HATU/DIEA como agente de acoplamiento. En los casos en los que la prueba de Kaise indicó grupos amino sin reaccionar se repitió el acoplamiento. Se llevó a cabo la eliminación del grupo Fmoc en N-terminal y la escisión de la resina. El péptido bruto se precipitó en éter y se lavó dos veces con éter y se secó al vacío. El péptido bruto lineal se cicló directamente disolviendo el péptido en DMSO (40 mg/ml). El pH de la solución se ajustó a 8 mediante la adición de N-metilglucamina acuosa y la solución se agitó al aire durante 48 horas a temperatura ambiente. Los péptidos se purificaron después usando HPLC de gradiente como se ha descrito en el Método 1 usando una columna preparativa Waters-YMC C-18 ODS (250 mm x 4,6 mm de diámetro). Las fracciones que contienen el producto puro se combinaron y liofilizaron proporcionando los péptidos necesarios.

10 Procedimiento: Síntesis de D27 - Compuesto 6 (véase la figura 56)

A una solución de bis-NHS-éster de ácido glutárico (0,122 mmol, Pierce Scientific Co.) en DMF anhidro se añadió gota a gota una solución de 4 en DMF (40 mg, 0,0122 mmol, DIEA se añadió neutralizando el ácido trifluoroacético unido al péptido y la N-hidroxisuccinimida formada durante la reacción. Esta solución de 0,7 ml se agitó durante 4 horas. La reacción se monitorizó mediante análisis HPLC y espectroscopia de masas. El DMF se eliminó al vacío. El exceso de diéster se eliminó mediante la adición de acetato de etilo que precipitó el monoéster del péptido 5 al tiempo que disuelve el bis-NHS-éster de ácido glutárico. La mezcla se centrifugó y se decantó la porción líquida. Esto se repitió dos veces. El residuo se mantuvo al vacío durante 10 minutos. El residuo se disolvió en DMF y se mezcló con una solución de 2 (37 mg, 0,009 mmol) en DMF (pH 7). Se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Los volátiles se eliminaron en alto vacío y las funciones acetato se eliminaron mediante tratamiento del residuo con 1 ml de hidracina/MeOH (15/85, v/v) con agitación durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Se añadió acetona inactivando el exceso de hidracina y los volátiles se eliminaron al vacío. El residuo resultante se disolvió en DMSO y se purificó mediante HPLC preparativa como se ha descrito anteriormente proporcionando 9 mg del material puro.

Datos de secuencia y analíticos para los péptidos 2, 4 y 6

Identificador de compuesto	Secuencia	HPLC Tiempo de ret. (Sistema)	Espectro de masas (ESI, ion. neg.)
Péptido 2: Nueva Sec., Derivado de la Sec. 11	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Biotina-JJK[NH ₂ -Ser(GalNAc(Ac) ₃ -α-D)-Gly-Ser(GalNAc(Ac) ₃ -α-D)]-NH ₂ }	7,4 min (T)	2041,3 [M -2H]/2
Péptido 4: Nueva Sec., Derivado de la Sec. 5	Ac-VCWEDSWGGEVCFRYPGGGK (NH ₂ Ser(GalNAc(Ac) ₃ -α-D)-Gly-Ser (GalNAc(Ac) ₃ -α-D)-NH ₂	8,0 min (T)	1636,3 [M -2H]/2
D27	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK {Ac-VCWEDSWGGEVCFRYPGGGK[S(GalNAc-α-D)-G-S(GalNAc-α-D)-Glut-S(GalNAc-α-D)-G-S(GalNAc-α-D)-NH (CH ₂) ₄ -(S)-CH(Biotina-JJNH) ₂ C (=O)-]-NH ₂]-NH ₂ }	5,50 min (M)	1737,2 (M -4H)/4 1389,3 (M -5H)/5 1157,7 [M -6H]/6

Sistema T: Columna: Waters XTerra, 4,6 x 50 mm; Eluyentes: A: Agua (0,1 % TFA), B: Acetonitrilo (0,1 %TFA): Elución: Condición inicial 15 % B, gradiente lineal 15 - 50 % B en 8 min., Caudal: 3,0 ml/min; detección: UV @ 220 nm.

Ejemplo 22: Unión de polipéptidos heterodiméricos marcados con Tc a células 293H transfectadas con KDR

La capacidad de D13 marcadas con Tc para unirse a KDR se evaluó usando células 293H transfectadas con KDR. Los resultados muestran que D10 marcadas con Tc se unen mejor a las células 293H transfectadas con KDR que a las células 293H transfectadas de forma simulada y una buena unión se mantuvo en presencia de 40 % de suero de ratón. Además, se mostró que un derivado de D10 marcado con TC con su secuencia de aminoácidos mezclada, D18, no poseía afinidad por las células que expresan KDR, lo que confirma la especificidad de la unión de D10 a esas células.

Síntesis de péptidos marcados con ^{99m}Tc

Preparación de ^{99m}Tc-D10 y ^{99m}Tc-D18

Véase el ejemplo 27

Transfección de células 293H:

Células 293H se transfectaron usando el protocolo descrito en el ejemplo 5. La transfección se realizó en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, n.º de cat. 354640).

Las células en una mitad de la placa (48 pocillos) se transfectaron de forma simulada (sin ADN) y las células de la otra mitad de la placa se transfectaron con ADNc de KDR. Las células fueron un 80 - 90 % confluentes en el momento de la transfección y completamente confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo (el ensayo se detuvo si estas condiciones no se cumplieron).

Preparación de medio opti-MEMI con 0,1 % de HSA

El medio Opti-MEMI se obtuvo en InVitrogen (Carlsbad, CA) y la seroalbúmina humana (HSA) se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO). El medio Opti-MEMI se preparó añadiendo 0,1 % de HSA, 1 % p/v de HSA a opti-MEMI, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. El medio se esterilizó mediante filtración con un filtro de 0,2 µM.

Preparación de diluciones de péptido marcado con Tc para el ensayo de las soluciones de reserva de marcaje con Tc

D10 y D18 marcada con Lu se diluyeron en medio opti-MEMI con 0,1 % de HSA proporcionando soluciones con concentraciones finales de 1,25, 2,5, 5,0 y 10 µCi/ml de heterodímero marcado con Tc. Un segundo conjunto de diluciones también se preparó usando una mezcla de 40 % de suero de ratón/60 % de opti-MEMI con 0,1 % de HSA como diluyente.

Ensayo para detectar la unión de los heterodímeros marcados con Tc

Las células se usaron 24 horas después de la transfección y preparando las células para el ensayo se lavaron una vez con 100 µl de opti-MEMI a temperatura ambiente con 0,1 % de HSA. Después de lavar, el opti-MEMI con 0,1 % de HSA se retiró de la placa y se sustituyó con 70 µl de 1,25, 2,5, 5,0 y 10 µCi/ml de D10 o D18 marcado con Tc (preparados como se ha indicado anteriormente con ambas soluciones diluyentes). Cada dilución se añadió a tres pocillos distintos de células 293H transfectadas de forma simulada y con KDR. Tras incubar a temperatura ambiente durante 1 hora, las placas se lavaron 5 veces con 100 µl de tampón de unión frío (opti-MEMI con 0,1 % de HSA). A cada pocillo se añadieron 100 µl de solución solubilizante (NaOH 0,5N) y las placas se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. La solución solubilizante en cada pocillo se mezcló pipeteando arriba y abajo y se transfirió a tubos de 1,2 ml. Cada pocillo se lavó dos veces con 100 µl de solución solubilizante y los lavados se añadieron a los correspondientes tubos de 1,2 ml. Cada tubo de 1,2 ml se transfirió después a un tubo de 15,7 mm x 100 cm para contar en un contador LKB Gamma.

Unión del péptido marcado con Tc a las células transfectadas con KDR

La capacidad de D10 y D18 marcadas con Tc para unirse específicamente a KDR se demostró usando células 293H transfectadas de forma transitoria. Como se muestra en la figura 62, D10 marcado con Tc se unieron mejor a las células 293H transfectadas con KDR en comparación con las células 293H transfectadas de forma simulada tanto en presencia como en ausencia de 40 % de suero de ratón, aunque había algo de inhibición de la unión en presencia de suero. La unión específica total de este heterodímero marcado con Tc a las células que expresan KDR fue mayor que la observada anteriormente con un péptido monomérico marcado con Tc (ejemplo 10). D18 marcado con TC, por otro lado, no mostró afinidad por las células 293H transfectadas de forma simulada o transfectadas con KDR, lo que confirma la especificidad de la unión de D10.

Ejemplo 23: Unión del polipéptido heterodimérico marcado con Lu a células 293H transfectadas con KDR

La capacidad de D13 marcadas con Lu para unirse a KADE se evaluó usando células 293H transfectadas con KDR. Los resultados muestran que D13 marcadas con Lu se unen mejor a las células 293H transfectadas con KDR que a las células 293H transfectadas de forma simulada y la unión significativa se mantuvo en presencia de 40 % de suero de ratón.

Preparación de ¹⁷⁷Lu-D13

Véase el ejemplo 37.

Transfección de células 293H:

Células 293H se transfectaron usando el protocolo descrito en el ejemplo 5. La transfección se realizó en placas de 96 pocillos negras/transparentes (Becton Dickinson, San José, CA). Las células en una mitad de la placa (48 pocillos) se transfectaron de forma simulada (sin ADN) y las células de la otra mitad de la placa se transfectaron con ADNc de KDR. Las células fueron un 80 - 90 % confluentes en el momento de la transfección y completamente

confluentes al día siguiente, en el momento del ensayo (el ensayo se detuvo si estas condiciones no se cumplieron).

Preparación de medio opti-MEMI con 0,1 % de HSA

- 5 Opti-MEMI se preparó como se ha descrito en el ejemplo 32.

Preparación de diluciones de péptido marcado con Lu para el ensayo

- 10 Soluciones de reserva de D13 marcada con Lu se diluyeron en medio opti-MEMI con 0,1 % de HSA proporcionando soluciones con concentraciones finales de 0,25, 2,5, 5,0 y 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de heterodímero marcado. Un segundo conjunto de diluciones también se preparó usando una mezcla de 40 % de suero de ratón/60 % de opti-MEMI con 0,1 % de HSA como diluyente.

Ensayo para detectar la unión de los heterodímeros marcados con Lu

- 15 La detección de la unión se midió como se detalla en el ejemplo 32 salvo porque se usó D13 marcada con Lu en lugar de heterodímeros marcados con Tc.

Unión del péptido marcado con Lu a las células transfectadas con KDR

- 20 La capacidad de D13 marcadas con Lu para unirse específicamente a KDR se demostró usando células 293H transfectadas de forma transitoria. D13 marcadas con Lu se unieron significativamente mejor a las células 293H transfectadas con KDR en comparación con las células 293H transfectadas de forma simulada tanto en presencia como en ausencia de 40 % de suero de ratón, aunque había algo de inhibición de la unión en presencia de suero.

Ejemplo 34: Radioterapia con un péptido heterodimérico marcado con Lu en ratones portadores de tumor

En este ejemplo se demuestra la capacidad de D13 marcada con Lu inhibiendo el crecimiento de tumores celulares PC3 implantados en ratones atómicos.

Síntesis de D13 marcada con ^{177}Lu

Véase el ejemplo 27.

Modelo animal

Células PC3 de la ATCC cultivadas como recomienda el proveedor se inyectaron por vía subcutánea entre las clavículas de ratones atómicos. Cuando sus tumores alcanzaron 100-400 mm^3 , se inyectó i-v. en doce ratones 500 microcurios de D13 marcada con Lu y su crecimiento se monitorizó durante 18 días más. Se sacrificó a los ratones si perdían el 20 % o más de su peso corporal o sus tumores excedían los 2.000 mm^3 . El crecimiento del tumor en los ratones tratados se comparó con el crecimiento medio del tumor en 37 ratones atómicos sin tratar a los que se implantaron tumores PC3.

Resultados

En 6 de los 12 ratones tratados en el estudio, los tumores experimentaron un significativo o completo retraso del crecimiento con respecto a los ratones con tumor sin tratar, lo que indica que D13 era eficaz en ralentizar el crecimiento del tumor PC3 en las condiciones usadas.

Ejemplo 25

Modelo de tumor de rata

Línea celular: Se obtuvo un adenocarcinoma de mama de rata, denominado 13762 Mat B III, de la ATCC (CRL-1666) y se cultivó en medio de McCoy 5^a + 10 % de FCS. 1 % glutamina y 1 % pen/strep (Invitrogen Carlsbad, CA). Las células en suspensión se recolectaron, mientras que las células ligeramente adherentes se desprendieron con EDTA. Las células se lavaron en medio de crecimiento, se contaron, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS o medio de crecimiento a 1×10^7 células por ml.

Inducción del tumor: Se inyectaron 1×10^6 células en 0,1 ml en la almohadilla de grasa de mama de ratas Fisher hembra anestesiadas de 120 a 160 g de peso. Los tumores crecieron normalmente hasta un diámetro de 5-8 mm en 8 días.

Modelo de esponja de rata y de ratón

Materiales: Torundas de poliéster tejidas alphaLite con un asa larga se obtuvieron de Texwipe (Saddle River, NJ).

Inserciones de las torundas: La torunda de fibra de poliéster esponjosa, pequeña y estéril se implantó por vía subcutánea en el flanco dorsal de los animales. Se sacrificó a los animales (ratones y ratas) mediante sobredosis de la anestesia el día 15 (ratones y ratas) o el día 18 (ratones). Las torundas se retiraron para su examen

Inmunohistoquímica de las criosecciones

Materiales: Anticuerpo policlonal flk-1 anti-ratón de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Anticuerpo monoclonal flk-1 anti-ratón de rata (Chemicon, Temecula, CA). Anticuerpo IgG anti-conejo de cabra conjugada con HRP ((H+L) (KPL, Gaithersburg, MD). Anticuerpo IgG (H+L) anti-rata de conejo conjugada con HRP e IgG de conejo de calidad de reactivo (Sigma, St. Louis, MO). IgG de rata (Serotec, Raleigh, NC). AEC: Sustrajo de aminoetilcarbazon kit: Frascos con tampón sustrato, con solución cromogénica, solución de peróxido de hidrógeno (Zymed, San Francisco, CA). Sustrato para peroxidasa de rábano. Reactivo de contratinción de hematoxilina (Zymed). Solución de montaje acuosa con glicerol alcohol vinílico (Zymed). Portaobjetos de cristal Superfrost Plus (Menzel-glaser, Alemania). Inmunohistoquímica: Las torundas y los tumores se extirparon, se congelaron en isopentano y se cortaron en secciones de 10 mm usando un criostat. Las secciones se montaron en un portaobjetos de cristal Superfrost Plus y se fijaron en acetona fría durante 20 minutos. Después de dos lavados en PBS durante 5 minutos, la actividad de peroxidasa endógena se inactivó mediante incubación con 0,5 % de H₂O₂ durante 30 minutos y después se lavó de nuevo en PBS. Las secciones se trataron primero con 0,2 % de BSA en PBS durante 1 hora antes de incubar durante la noche a TA con el anticuerpo anti-VEGF-R2 (1/50) o los péptidos biotinilados (2 mM) o IgG no específica (1/50) en PBS o solo PBS. Las secciones se lavaron 3 veces en PBS durante 5 minutos y después se incubaron con anticuerpo anti-conejo de cabra con HRP y a la dilución 1/200 o estreptavidina-HRP (para los péptidos biotinilados) a la dilución 1/250 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron de nuevo 3 veces en PBS durante 5 minutos, se tiñeron con AEC, se aclararon con H₂O y se contratiñeron con hematoxilina durante 3 minutos. Las secciones tisulares se montaron para microscopía óptica.

Torundas y tumores	Anticuerpos		Péptidos	
	Flk-1 (suero de conejo)	Flk-1 (mAb de rata)	SEC ID N.º: 5 biotinilada	SEC ID N.º: 107 biotinilada
Torunda, rata (15 días)	+++	-	++	-
Tumor, rata (5-8 días)	-	++	++ (periferia)	-
Tumor, rata (5-8 días)	Cel. endot.+++ Tumor cel. ++	nd	Cel. endot.+++ (periferia) Tumor cel. -	Cel. endot.- Tumor cel. -
Tumor, ratón (14 días)	nd	Cel. endot.+ Tumor cel. +++	Cel. endot.+++ Tumor cel. ++	Cel. endot.- Tumor cel. -

Imágenes in vivo de ultrasonidos

Materiales: Sistema de obtención de imágenes de ultrasonidos: ATL HDI 5000, equipado con una sonda de matriz lineal (L7-4).

Imágenes: Microburbujas conjugadas con péptidos descritas en el ejemplo 36 se inyectaron por vía intravenosa en ratones con torundas implantadas. Se usó obtención de imágenes en modo B con inversión de pulso intermitente monitorizando la acumulación de las microburbujas dirigidas en los nuevos vasos de la torunda. Se realizaron experimentos control con microburbujas no conjugadas o péptido no específico acoplado a las microburbujas. El área ecogénica correspondiente a las regiones que expresan el receptor 2 de VEGF se observó cuando se usaron microburbujas específicas de KDR.

Ejemplo 26

Se prepararon suspensiones de microburbujas estabilizadas con fosfolípidos conjugadas con péptidos de unión a KDR como se usa en la invención. Estas suspensiones son útiles como agentes de contraste de ultrasonidos. Como se describe con más detalle anteriormente, las microburbujas conjugadas con péptidos de unión a KDR usados en la invención se pueden administrar a un animal (incluidos un ser humano) y usar para generar una imagen de ultrasonidos de regiones del animal que expresa KDR (incluidas las áreas angiogénicas, tales como tumores).

Preparación de composición para ecografía ultrasónica conjugada con gigantes peptídicos de KDR

Burbujas de gas preparadas a partir de suspensiones lipídicas

Se preparó una serie de suspensiones acuosas de fosfolípidos con las composiciones siguientes:

A) 40mg de DSPC, 10 mg de DPPA, 2,5 mg de N-MPB-PE (1, 2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-4-(pmaleimido-fenilbutiramida, (Avanti Polar-Lipids, Inc, Alabaster, AL) y 3 g de lactosa

B) 50 mg de DPPS, 2,5 mg N-MPB-PE y 1,5 g de glicerol y 5 g de propilenglicol

Los componentes de cada composición se dispersaron en 30 ml de solución salina (0.9 %-NaCl) calentando a 70 °C y después se extrudieron 3 veces a través de membranas de policarbonato de 0,2 mm (Nuclepore®). Las suspensiones resultantes se trataron después de acuerdo con el siguiente proceso para generar microburbujas de gas. Suspensión A: Se congeló a -45 °C y se liofilizó a presión reducida de 20 mbares; la muestra seca obtenida se expuso a C4F10 en un vial (100 mg del liofilizado/vial) y después se reconstituyó con 10 ml de agua; Suspensión B: Se homogeneizó en agitación mecánica a alta velocidad usando Polytron® (12'.000 rpm y 2min.) en gas C4F10.

Las suspensiones se convirtieron en lechosas y opacas tras la reconstitución o agitación. Las microburbujas de gas resultantes se contaron después usando Coulter Multisizer. Las microburbujas de gas se observaron con un tamaño variable desde 1 a 15 mm y un número variable desde 10^8 a 10^9 según el tipo de suspensión y el método de activación.

Burbujas de gas preparadas a partir de formulaciones secas que contienen fosfolípidos

Se mezcló una cantidad igual de DSPC y de DPPG con -MPB-PE 5 % (p/p) y 1 g de Macrogol-4000 (Clarian, Alemania), después se disolvió en terc-butanol a 60 °C obteniendo una solución transparente. La solución se alicuotó en viales de cristal y se congeló rápidamente a -45 °C y se liofilizó. Los liofilizados resultantes se expusieron a C4F10 sustituyendo el aire y sellando con un tapón dentro del liofilizador (Christ®). Las muestras de liofilizados se reconstituyeron con 10 ml de solución salina (0,9 % de NaCl) por vial. Tras la reconstitución, se determinaron la formación de burbujas (una suspensión lechosa), la ecogeneidad (coeficiente de retrodispersión a 7 MHz; véase Schneider, M., 1999. Echocardiography, 16(7 pt 2):743-746), la resistencia a la presión y la concentración (véase Schneider y col. EP 0 554 213 B1).

Preparación de microburbujas conjugadas usando maleimida

Se prepararon soluciones de los péptidos mercaptoacetilados (SEC ID N.º: 31, 5 y 25, preparadas como se ha indicado anteriormente) a 10 mg/ml en DMF. A 9 ml de PBS-EDTA 10 mM, pH 7,5 se añadieron 20ml de la solución peptídica y 1 ml de la solución de desacetilación (fosfato sódico 50 mM, EDTA 25 mM, 0,5 M hidroxilamina.HCl, pH 7,5). La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la suspensión de microburbujas activadas con maleimida. Tras dos horas de incubación en oscuridad, en agitación suave, las microburbujas conjugadas se purificaron mediante centrifugación.

Tioacetilación de avidina: Se usó el reactivo reticulador SATA (Pierce) introduciendo grupos sulfhidrilo protegidos en avidina ((Fluka) según las instrucciones del fabricante y la proteína se purificó mediante diálisis.

Microburbujas conjugadas con avidina: A una solución de avidina mercaptoacetilada se añadió 1/10 en volumen de A 9 ml de solución de desacetilación (fosfato sódico 50 mM, EDTA 25 mM, 0,5 M hidroxilamina.HCl, pH 7,5). La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la suspensión de microburbujas activadas con maleimida. Tras dos horas de incubación en oscuridad, en agitación suave, las microburbujas conjugadas se separaron de la proteína no conjugada mediante centrifugación. La cantidad de avidina conjugada se determinó mediante espectrofotometría usando el pigmento HABA.

Formación de suspensiones de microburbujas conjugadas con péptido

El péptido biotinilado (SEC ID N.º: 31 y 5, preparadas como se indica anteriormente) se añadió a la suspensión de microburbujas conjugadas con avidina en PBS a una proporción de 10 moles de péptido por mol de avidina como se ha determinado anteriormente y se incubó durante 30 minutos a TA en agitación suave. El exceso de péptido se eliminó mediante centrifugación.

Ejemplo 27

Tabla 11

Código	SEC ID N.º: (isótopo)	Secuencia
--------	--------------------------	-----------

Protocolo de preparación más adelante		Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(nSbGJJ)-NH ₂ ; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Trp-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys(DMG-Ser-Cys(Acm)-Gly-Adoa-Adoa)-NH ₂ ; Ne22-DMG-Ser-Cys(Acm)-Gly-Adoa-Adoa
P12-XDT (ejemplo 12)	In-887	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK(JJ-DOTA)-NH ₂ ----de Base de datos de Chemistry
P12-P (ejemplo 12)	Tc-378	Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys(PnAO-NH-(=O)C (CH ₂) ₃ C(=O)-J-J)-NH ₂
D4 (ejemplo 12)		Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK(CONH ₂)K(JJDOTA-GLUT-[Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(CONH ₂)JJ]
Protocolo de preparación más adelante	Tc-D10	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[(6-PnAO)-C(=O) (CH ₂) ₃ -C(=O)-K(- (O=)C(CH ₂) ₃ C(=O)-JJ-NH(CH ₂) ₄ -(S)-CH (Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH)-CONH ₂)] NH ₂ ; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys[(6-PnAO)-C(=O) (CH ₂) ₃ -C(=O)-K(- (O=)C(CH ₂) ₃ C(=O)-ADOA-ADOA-NH (CH ₂) ₄ -(S)-CH(Ac-Gly-Asp-Ser-Arg-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-NH)-CONH ₂)]NH ₂ : Agente de angiogénesis/Indicador de KDR - de la base de datos de Chemistry
Protocolo de preparación más adelante	Lu-D11	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[DOTA-JJK(C(=O) (CH ₂) ₃ C(=O)-JJ-NH(CH ₂) ₄ -(S)-CH(Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH)-CONH ₂)]NH ₂ ; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys[DOTA-ADOA-ADOA-Lys (C(=O)(CH ₂) ₃ C(=O)-ADOA-ADOA-NH(CH ₂) ₄ -(S)-CH(Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-NH)-CONH ₂)]NH ₂ ----de Base de datos de Chemistry
Protocolo de preparación más adelante	Lu-D12	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[(6-PnAO)-C(=O) (CH ₂) ₃ -C(=O)-K(C(=O)CH ₂ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₂ C(=O)- ₃ C(=O)-NH(CH ₂) ₄ -(S)-CH(Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGG-NH)-CONH ₂)]NH ₂ ; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys[(6-PnAO)-C(=O)(CH ₂) ₃ C (CH ₂) ₃ -C(=O)-Lys(- C(=O)CH ₂ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₂ C(=O)- ₃ C (CH ₂) ₃ -C(=O)-NH(CH ₂) ₄ -(S)-CH(Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-NH)-CONH ₂)]NH ₂ ----de Base de datos de Chemistry
Protocolo de preparación más adelante	Lu-D13 (DTPA)	Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(Adoa-Adoa-Glut-K (BOA))-NH ₂)-NH ₂ ; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys (Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-Lys (Adoa-Adoa-Glut-Lys (BOA))-NH ₂)-NH ₂ - ----de Base de datos de Chemistry
Protocolo de preparación más adelante	Tc-D14	Ac-Ala-Gln-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Asp-Glu-Ile-Leu-Ser-Met-Ala-Asp-Gln-Leu-Arg-His-Ala-Phe-Leu-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys((6-PnAO)-C(=O)(CH ₂) ₃ C(=O)-Lys(C(=O)(CH ₂) ₃ CO-ADOA-ADOA-NH(CH ₂) ₄ -(S)-CH(Ac-Gly-Asp-Ser-Arg-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-NH)CONH ₂)]NH ₂ ---- de Base de datos de Chemistry
Protocolo de preparación más adelante	Tc-D18	Ac-Ala-Pro-Gly-Thr-Trp-Cys-Asp-Tyr-Asp-Trp-Glu-Tyr-Cys-Trp-Leu-Gly-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Lys(PnAO6-Glut-K(Glut-ADOA-ADOA-NH(CH ₃) ₄ -(S)-CH(Ac-Gly-Val-Asp-Phe-Arg-Cys-Glu-Trp-Ser-Asp-Trp-Gly-Glu-Val-Gly-Cys-Arg-Ser-Pro-Asp-Tyr-Gly-Gly-Gly-NH ₂ (péptido mezclado)

Preparación de ^{99m}Tc-D10

- 5 SnCl₂ 2H₂O (20 mg) se disolvió en 1 ml de HCl 1N y 10 µl de esta solución se añadieron a 1 ml de una solución de DTPA que se preparó disolviendo 10 mg de Ca Na₂ DTPA 2,5 H₂O (Fluka en 1 ml de agua. D10 (100 µg En 100 µl de 50 % de DMF) se mezcló con 75 µl de tampón fosfato 0,1 M, pH 9 y 50 µl de ^{99m}TcO₄-(2.4 a 5 mCi, Syncor), seguido de 100 µl de la solución Sn-DTPA estañosa. Tras 15 minutos a TA, la pureza radioquímica (RCP) fue del 72 %.
- 10 El producto se purificó en una columna de amida Supelco Discovery) C16 4 x 250 mm, 5 µm de tamaño de poro) eluida a un caudal de 0,7 ml/min usando un gradiente acuoso/orgánico de 0,1 % TFA en agua (A) y 0,085 % TFA en acetonitrilo (B; "ACN"). Se usó el siguiente gradiente: 30 % B a 42 % B en 36 min, subir hasta 70 % B en 10 min. El compuesto, que eluyó a un tiempo de retención de 32 min, se recogió en 500 ml de tampón citrato 50 mM (pH 5,2)

que contiene 0,2 % de HSA y se eliminó el acetonitrilo usando un aspirador de vacío (Savant). Tras la purificación, el compuesto tenía un RCP > 90 %.

Preparación de ^{177}Lu -D11

- 5 D11 (5 μl de una solución de $\sim 1 \mu\text{g/ml}$ en NH_4OH 0,05N /10 % EtOH) se añadió a un microvial inerte de cristal que contiene 80 μl de tampón NaOAc, pH 5,6. Se añadió ^{177}Lu llevando la proporción ligando:Lu a $\leq 2:1$ (1-5 mCi). El vial se selló y se calentó a 100 $^\circ\text{C}$ durante 15-20 minutos, se enfrió durante 5 minutos y se trató con 3 ml de 1 % de Na_2EDTA $2\text{H}_2\text{O}$ en H_2O . La totalidad de la mezcla de reacción se inyectó en una columna Supelco Discovery RP Amide C16 (4 mm x 250 mm x 5 mm). Se usaron las siguientes condiciones de HPLC: Temperatura de la columna= 50 $^\circ\text{C}$, Disolvente A= H_2O con 0,1 % de TFA, Disolvente B = ACN con 0,085 % TFA, gradiente 0,6/0,25 ml/min A/B at t = 0 minutos hasta 0,5/0,4 ml/min A/B a t = 60 minutos El tiempo de retención para D11 fue de ~ 40 minutos; el de ^{177}Lu -D11 fue de ~ 42 minutos. El pico radiactivo se recogió en 0,7 ml de tampón citrato 0,05M, pH 5,3 que contiene 0,1 % de fracción V de seroalbúmina humana y 1,0 % de ácido ascórbico D y la mezcla se agitó en un aspirador de vacío Savant eliminando los disolventes orgánicos. Se obtuvieron purezas radioquímicas superiores al 80 %.

Preparación de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D12

- 20 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20 mg) se disolvió en 1 ml de HCl 1N y 10 μl de esta solución se añadieron a 1 ml de una solución de DTPA que se preparó disolviendo 10 mg de $\text{Ca Na}_2 \text{DTPA} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka en 1 ml de agua. D10 (100 μg En 100 μl de 50 % de DMF) se mezcló con 75 μl de tampón fosfato 0,1 M, pH 9 y 60 μl de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ -(2.4 a 4 mCi, Syncor), seguido de 100 μl de la solución Sn-DTPA estañosa. Tras 10 minutos a 40 $^\circ\text{C}$, la pureza radioquímica (RCP) fue del 16 %. El producto se purificó en una columna de amida Supelco Discovery C16 4 x 250 mm, 5 μm de tamaño de poro) eluida a un caudal de 0,7 ml/min usando un gradiente acuoso/orgánico de 0,1 % TFA en agua (A) y 0,085 % TFA en ACN (B). Se usó el siguiente gradiente: 30 % B a 42 % B en 36 min, subir hasta 70 % B en 10 min. El compuesto, que eluyó a un tiempo de retención de 37,1 min, se recogió en 500 ml de tampón citrato 50 mM (pH 5,2) que contiene 0,2 % de HSA y se eliminó el ACN usando un aspirador de vacío (Savant). Tras la purificación, el compuesto tenía una RCP > 90 %.

30 Preparación de ^{177}Lu -D13

- D13 (306 μg) se añadió a un vial de automuestreador de 2-ml con un inserto cónico de $\sim 450 \mu\text{l}$ y se disolvió en 0,01N NH_4OH (50 μl). A esto se añadieron 300 μl de acetato amónico que contiene ascorbato sódico, gentisato sódico, L-metionina y L-triptófano cada uno a 10 mg/ml, más la fracción V de seroalbúmina humana a 2 mg/ml, pH final= 7,6 ajustado con NaOH. Se añadió un alícuota de 6,8 μl de $^{177}\text{LuCl}_3$ en HCl 0,05 N (39.3 mCi), se selló el vial, se calentó durante 15 minutos a 37 $^\circ\text{C}$, se enfrió durante ~ 5 minutos y se añadieron 10 μl de 1 % de Na_2EDTA $2\text{H}_2\text{O}$ en H_2O . Un alícuota de 350 μl de la mezcla de reacción se inyectó en una columna Supelco Discovery RP Amide C16 (4 mm x 250 mm x 5 mm). Se usaron las siguientes condiciones de HPLC: Temperatura de la columna= 37 $^\circ\text{C}$, Disolvente A= H_2O con 2 g/l de tampón NH_4OAc , pH 7,0, Disolvente B = 80 % de ACN / 20 % H_2O , gradiente 0,56/0,24 ml/min A/B a t = 0 minutos hasta 0,47/0,33 ml/min A/B a t = 30 minutos El tiempo de retención para D13 fue de ~ 28 minutos; el tiempo de retención para ^{177}Lu -D13 fue de ~ 29 minutos. El pico radiactivo se recogió en 1 ml de un tampón que contiene 0,1 ascorbato sódico, gentisato sódico, L-metionina y L-triptófano cada uno a 10 mg/ml, más la fracción V de seroalbúmina humana a 2 mg/ml, pH final= 7,6 ajustado con NaOH). Después se agitó durante ~ 40 minutos usando un Speed Vacuum (Savant) eliminando el ACN. La RCP del producto aislado fue del 86 %.

45 Preparación de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D14

- 50 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20 mg) se disolvió en 1 ml de HCl 1N y 10 μl de esta solución se añadieron a 1 ml de una solución de DTPA que se preparó disolviendo 10 mg de $\text{Ca Na}_2 \text{DTPA} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka en 1 ml de agua. D14 (100 μg En 100 μl de 50 % de DMF) se mezcló con 50 μl de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ -(6 mCi, Syncor) y 125 μl de tampón fosfato 0,1 M, pH 9, seguido de 100 μl de la solución Sn-DTPA estañosa. Tras 15 minutos a 40 $^\circ\text{C}$, la pureza radioquímica (RCP) fue del 21 %. El producto se purificó en una columna Vydac peptide (4,6 x 250 mm) eluida a un caudal de 1 ml/min usando un gradiente acuoso/orgánico de 0,1 % TFA en agua (A) y 0,085 % TFA en acetonitrilo (B). Se usó el siguiente gradiente: 30 % B a 45 % B en 40 min. El compuesto, que eluyó a un tiempo de retención de 34,9 min, se recogió en 500 ml de tampón citrato 50 mM (pH 5,3) que contiene 0,2 % de HSA y se eliminó el ACN usando un aspirador de vacío (Savant). Tras la purificación, el compuesto tenía un RCP 92,5 %.

Preparación de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D18

- 60 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20 mg) se disolvió en 1 ml de HCl 1N y 10 μl de esta solución se añadieron a 1 ml de una solución de DTPA que se preparó disolviendo 10 mg de $\text{Ca Na}_2 \text{DTPA} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka en 1 ml de agua. D10 (100 μg En 100 μl de 50 % de DMF) se mezcló con 50 μl de tampón fosfato 0,1 M, pH 9 y 90 μl de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ -(14 mCi, Syncor), seguido de 100 μl de la solución Sn-DTPA estañosa. La reacción se calentó durante 20 minutos a 27 $^\circ\text{C}$. Toda la reacción se inyectó en una columna Vydac 218TP54 C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm de sílice) y eluida a un caudal de 1,5 ml/min usando un gradiente acuoso/orgánico de 0,1 % TFA en agua (A) y 0,085 % TFA en ACN (B). Se usó el siguiente

gradiente: 32 % a 39 % B en 30 minutos, subir a 80 % B en 2 min. El ligando libre eluyó a un tiempo de retención de 19 minutos. El complejo, que eluyó a 24 minutos se recolectó en 500 ml de tampón citrato 50 mM (pH 5.3) que contiene 0,1 % de HSA y 1 % de ácido ascórbico. ACN y el exceso de TFA se eliminaron usando un Speed Vacuum (Savant) durante 40 minutos. Tras la purificación, el compuesto tenía un RCP 93 %.

5

Ejemplo 28: Preparación de microburbujas derivados para conjugación peptídica

200 mg de DSPC (diestearylfosfatidilcolina), 275 mg de DPPG-Na (sal de sodio de diestearylfosfatidilglicerol), 25 mg de N-MPB-PE se solubilizaron a 60 °C en 50 ml de Hexano/isopropanol (42/8). El disolvente se evaporó al vacío y después se añadió PEG-4000 (35.046 g) a los lípidos y la mezcla se solubilizó en 106,92 g de alcohol t-butílico a 60 °C, en un baño de agua. La solución se llenó en viales con 1,5 ml de solución. Las muestras se congelaron rápidamente a -45 °C y se liofilizaron. El aire en el espacio se sustituyó con una mezcla de C4F10/Air (50/50) y los viales se taparon y sellaron. Las muestras de liofilizados se reconstituyeron con 10 ml de solución salina (0,9 % de NaCl) por vial.

15

Conjugación peptídica

Los péptidos, por ejemplo la SEC ID N.º: 17, se conjugaron hasta una preparación de microburbujas como se ha descrito anteriormente de acuerdo con la siguiente metodología.

20

El péptido tioacetilado (200 µg) se disolvió en 20 µl de DMSO y después se diluyó en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Esta solución se mezcló con las microburbujas funcionalizadas con N-MPB dispersadas en 18 ml de PBS-EDTA 10 mM, pH 7,5 y se añadieron 2 ml de la solución de desacetilación (fosfato sódico 50 mM, EDTA 25 mM, 0,5 M hidroxilamina.HCl, pH 7,5). El espacio aéreo se llenó con C4F10/Aire (35/65) y la mezcla se incubó durante 2,5 horas a temperatura ambiente en agitación suave (rueda de rotación) en oscuridad. Las burbujas conjugadas se lavaron mediante centrifugación.

25

Ejemplo 39: Preparación de microburbujas derivadas para conjugación peptídica

30 Agua destilada (30 ml) que contiene 6 mg de dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS, Genzyme), 24 mg de diestearylfosfatidilcolina (DSPC, Genzyme) y 3 g de manitol se calentó hasta 65 °C en 15 minutos, después se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se añadió N-MPB-DPPE (1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-maleimidofenil) butiramida] sal de Na -Avanti Polar Lipids) (5 % molar -1,9 mg). Este fosfolípido derivado se dispersó en la fase acuosa usando un baño de ultrasonidos (Branson 1210 -3 minutos).

35

Perfluoroheptano (2,4 ml de Fluka) se emulsionó en esta fase acuosa usando un homogeneizador de alta velocidad Polytron®, 10000 rpm, 1 minuto).

40

La emulsión se lavó una vez mediante centrifugación (200 g/10 min), después se resuspendió en 30 ml de una solución al 10 % de manitol en agua destilada. La emulsión lavada se congeló (45 °C, 5 minutos) y después, se liofilizó (en 0,2 mBar, durante 24 horas).

45

Se restableció la presión atmosférica introduciendo una mezcla de C4F10 y aire. El liofilizado se disolvió en agua destilada (30 ml). Las microburbujas se lavaron una vez mediante centrifugación y se redispersaron 10 ml de solución salina tamponada con fosfato.

Conjugación peptídica

50 El péptido tioacetilado (200 µg) se disolvió en 20 µl de DMSO y después se diluyó en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Esta solución se mezcló hasta 5 ml de microburbujas funcionalizadas con N-MPB. SE añadieron 0,6 ml de solución de desacetilación (fosfato sódico 50 mM, EDTA 25 mM, hidroxilamina.HCl 0,5M, pH 7,5) y las suspensiones se agitaron mediante inversión durante 2 horas y media.

55

Las microburbujas se lavaron dos veces con una solución de maltosa al 5 % y Pluronic F68 al 0,05 % en agua destilada mediante centrifugación (200 g/10 minutos). El volumen final se fijó en 5 ml.

Ejemplo 40: Preparación de microglobos derivados para conjugación peptídica

60 Agua destilada (30 ml) que contiene 40 mg de diestearylfosfatidilglicerol (DSPG, Genzyme) se calentó hasta 65 °C durante 15 minutos y después se enfrió hasta 40 °C.

DPPE-PEG2000-Maleimida (3,5 mg -Avanti Polar Lipids) y tripalmitina (60mg -Fluka) se disolvieron en ciclohexano (0,6 ml) a 40 °C en un baño de ultrasonidos durante 2 min.

65

Esta fase orgánica se emulsionó en la fase acuosa usando un homogeneizador de alta velocidad Polytron®, 10000 rpm, 1 minuto).

Alcohol polivinílico (200 mg) se disolvió en agua destilada (5 ml) y se añadió a la emulsión. La mezcla se enfrió hasta 5 °C, después se congeló (45 °C, 10 minutos) y por último, se liofilizó (en 0,2 mBar, durante 14 horas).

- 5 El liofilizado se dispersó en agua destilada (15 ml). La mezcla se agitó durante 30 obteniendo una solución homogénea de microglobos.

Conjugación peptídica

- 10 El péptido tioacetilado (200 µg) se disolvió en 20 l de DMSO y después se diluyó con PBS (1 ml). 7,5 ml de la suspensión de microglobos obtenida como se ha descrito anteriormente se centrifugaron (500 rpm durante 5 minutos). El infranadante se desechó y los microglobos se redispersaron en solución salina tamponada con fosfato (2 ml).

- 15 La suspensión de microcápsulas se mezcló con la solución del péptido. Trescientos microlitros de una solución de hidroxilamina (10,4 mg en PBS 50 mM, pH: 7,5) se añadieron a la suspensión desprotegiendo el tiol. La suspensión se agitó mediante inversión durante dos horas y media.

- 20 Los microglobos se lavaron dos veces mediante centrifugación (500g/5min) con agua destilada que contiene 5 % de maltosa y 0,05 % de Pluronic F68 y por último, se redispersaron en 3 ml de esta solución.

Ensayos *in vitro* con células transfectadas

- 25 La capacidad de las microburbujas conjugadas con los péptidos como se usa en la invención para unirse a células que expresan KDR se evaluó usando células 293H transfectadas expresando KDR.

Transfección de células 293H a cubreobjetos Thermanox®

- 30 Las células 293H se transfectaron con ADN de KDR. Las células transfectadas se incubaron con una suspensión de microburbujas conjugadas con péptidos o con un péptido control (una versión mezclada del péptido conjugado que no tiene afinidad por KDR).

- 35 Para la incubación con las células transfectadas, una tapa pequeña de plástico se llena con una suspensión que contiene de 1 a 3 x 10⁸ microburbujas conjugadas con péptidos y la tapa se cubre con un cubreobjetos invertido Thermanox® colocando las células transfectadas en contacto con las microburbujas conjugadas. Tras aproximadamente 20 minutos a 37 °C, el cubreobjetos se levanta con unas pinzas, se lava tres veces en PBS y se analiza con un microscopio evaluando la unión de las microburbujas conjugadas.

- 40 La figura 62 indica que los microglobos conjugados a los péptidos como se usa en la invención se unen específicamente a células que expresan KDR. De hecho, los microglobos conjugados al péptido de unión a KDR se unieron a células que expresan KDR, mientras que no se unieron apreciablemente a células transfectadas de forma simulada y los microglobos portadores de un péptido control mezclado no mostraron una unión apreciable.

- 45 Determinación del % de la superficie cubierta por microvesículas

- Las imágenes se adquirieron con una cámara digital DC300F (Leica) y el porcentaje de la superficie cubierta por microburbujas o microglobos unidos en el área de la imagen se determinó usando el software QWin (Leica Microsystems AG, Basel, Suiza).

- 50 La tabla siguiente muestra los resultados de la afinidad de unión (expresada como % de cobertura de la superficie de la imagen) de microvesículas dirigidas de la invención hacia células transfectadas con KDR, en comparación con la unión de las mismas microvesículas dirigidas hacia células transfectadas de forma simulada o (solo en el caso del péptido) a la unión de microvesículas dirigidas con un péptido mezclado hacia las mismas células transfectadas con KDR.

- 55 Como se muestra en la tabla 12, las microvesículas dirigidas muestran una mayor afinidad de unión por KDR.

Tabla 12

	% Cobertura		
	KDR	Simulado	Péptido mezclado
Ejemplo 1			
Péptido de unión:	6,7	0,2	0,1
SEC ID N.º: 17	16,8	1	nd

Ejemplo 2	14,2	1,4	2,1
Ejemplo 3	15,7	0,3	1

nd: no disponible

Modelo animales *in vivo*

- 5 Se usaron modelos conocidos de tejido angiogénico (modelo de matrigel de rata y modelo de rata Mat B III) analizando la capacidad del péptido conjugado con conjugados de ultrasonidos para localizar y proporcionar una imagen de tejido angiogénico. Animales: 344 ratas Fisher hembra (Charles River Laboratories, Francia) de 120 a 160 g de peso se usaron para la implantación de tumor MATBIII. Ratitas OFA macho (Charles River Laboratories, Francia) de 100 a 150 g de peso se usaron para la inyección de Matrigel. Anestesia: Las ratas se anestesiaron con una inyección intramuscular (1 ml/kg) de una mezcla de ketaminol/xilazina (Veterinaria AG/ Sigma) (50/10mg/ml) antes de implantar células de Matrigel o MatBIII. Para los experimentos de formación de imágenes se anestesió a los animales con la misma mezcla más inyección subcutánea de 50 % de uretano (1 g/kg). Modelo de tumor MATBIII en ratas: Se obtuvo un adenocarcinoma de mama de rata, denominado 13762 Mat B III, de la ATCC (CRL-1666) y se cultivó en medio de McCoy 5^a + 10 % de FCS. 1 % glutamina y 1 % pen/strep (Invitrogen n.º de cat. 15290-018). Las células en suspensión se recogieron y se lavaron en medio de crecimiento, se contaron, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS o medio de crecimiento a 1×10^7 células por ml. Para inducción del tumor: se inyectaron 1×10^6 células en 0,1 ml en la almohadilla de grasa de mama de ratas Fisher hembra anestesiadas. Los tumores normalmente crecen hasta un diámetro de 5-8 mm en 8 días. Modelo de matrigel en ratas Matrigel (400 µl) (ECM, Sigma, St Louis, MO) que contiene bFGF humana (600ng/ml) (Chemicon: ref: GF003) se inyectó por vía subcutánea en el flanco dorsal de cada rata.

La solución de matrigel se mantuvo líquida a 4 °C hasta la inyección. Inmediatamente después de la inyección de matrigel, el sitio de la inyección se mantuvo cerrado durante unos segundos con la mano con el fin de evitar las fugas de matrigel. A la temperatura corporal, matrigel se hace gelatinosa. Diez días después de la inyección se observó neoangiogénesis en el tapón de matrigel de la rata y se realizó el experimento de obtención de imágenes.

Imágenes *in vivo* de ultrasonidos: Se obtuvieron imágenes del tumor Mat B III o de matrigel usando un sistema de toma de imágenes de ultrasonidos ATL HDI 5000 aparato equipado con una sonda lineal de L 7-4. Se usó inversión de pulso en modo B a una potencia acústica baja ($MI = 0,02$) siguiendo la acumulación de microburbujas conjugadas con péptido en el receptor KDR expresado en el endotelio de los nuevos vasos. Para los experimentos control se inyectó un bolo intravenoso de microburbujas sin conjugar o microburbujas conjugadas a un péptido no específico. La sonda lineal se fijó sobre la piel directamente en línea con los tumores implantados o el tapón de matrigel y la acumulación de burbujas dirigidas se siguió durante treinta minutos.

En ambos modelos se administró una perfusión de SonoVue® antes de inyectar la suspensión de burbujas de ensayo. Esto permite la evaluación del estado de vascularización; la intensidad del vídeo obtenido tras la inyección de SonoVue® se toma como referencia interna.

Se registró un marco basal y después se detuvo la insolación durante la inyección de las burbujas. A varios puntos de tiempo tras la inyección (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos) se reactivó la insonación y se registraron 2 marcos de un segundo en una cinta de vídeo.

Los marcos de vídeo de los experimentos de obtención de imágenes de matrigel o el tumor Mat B III se capturaron y analizaron con la videocaptura y el software image-Pro Plus 2.0 respectivamente. El mismo área rectangular de interés (AOI) incluyendo toda el área transversal del tumor o matrigel se seleccionó en las imágenes a diferentes puntos de tiempo (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos). En cada punto de tiempo se calculó la suma de píxeles de vídeo dentro de la AOI tras la resta de la AOI basal. Los resultados se expresan como el porcentaje de la señal obtenida con SonoVue, que se toma como del 100 %. De un modo similar, también se analiza una segunda AOI situada fuera de matrigel o del tumor y que representa el agente de contraste en libre circulación.

Los resultados indican que los agentes de contraste de ultrasonidos portadores de restos de unión de KDR como se usa en la invención localizan el tejido angiogénico (y por tanto que expresa KDR) en modelos animales. Específicamente, la figura 58 muestra la captación y la retención de burbujas de contraste en el tumor hasta 30 minutos después de la inyección para suspensiones de microburbujas estabilizadas con fosfolípidos conjugadas con péptidos KDR como se usa en la invención preparados de acuerdo con el ejemplo 38. En contraste con ello, las mismas burbujas mostraron únicamente una visualización transitoria (no más de 10 minutos)/contraste de burbujas en la AOI situada fuera de las células tumorales. De un modo similar, la figura 59 y la FIG. 62 muestran la captación y la retención de burbujas de contraste en matrigel hasta 30 minutos después de la inyección para suspensiones de microburbujas estabilizadas con fosfolípidos conjugadas con péptidos KDR como se usa en la invención preparados de acuerdo con el ejemplo 38. Por el contrario, las mismas burbujas solo mostraron una visualización/contraste de burbujas transitoria (no más de 10 minutos) en la AOI situada fuera de la matrigel o el sitio de matrigel.

Ejemplo 41: Potenciar la residencia en suero de los péptidos de unión a KDR

En la técnica se sabe que los compuestos que contienen maleimida y otros grupos que pueden reaccionar con tioles reaccionan con tioles en proteínas séricas, especialmente seroalbúmina, cuando los compuestos se inyectan. Los aductos tienen tiempos de vida en suero similares a los de la seroalbúmina, por ejemplo más de 14 días en seres humanos.

Conjugación con maleimida

Se dispone de métodos que permiten la síntesis directa de péptidos lineales marcados con maleimida abarcados dentro de la presente invención (Holmes, D. y col., 2000. Bioconjug. Chem., 11:439-444).

Los péptidos que incluyen disulfuros pueden derivarse con maleimida en uno de varios modos. Por ejemplo, se puede añadir una tercera cisteína al extremo carboxi. La cisteína añadida se protege con un grupo protector que es ortogonal para el tipo de grupos usados para las cisteínas que van a formar el disulfuro. El disulfuro se forma desprotegiendo de forma selectiva las cisteínas previstas y oxidando el péptido. Después, la cisteína final se desprotege y el péptido reacciona con un exceso molar grande de una bis-maleimida. El compuesto resultante tiene una de las maleimidas libre para reaccionar con seroalbúmina u otras proteínas séricas que contienen tiol.

Como alternativa, un péptido cíclico, como se usa en la presente invención, se sintetiza con una extensión en C-terminal que contiene lisina, tal como -GGGK. Las lisinas del motivo de unión a KDR se protegen con ivDde y la lisina en C-terminal se desprotege. Esta lisina reacciona con un compuesto que contiene maleimida, tal como N-[ε-maleimidocaproiloxi]succinimida éster (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) o N-(α-Maleimidoacetoxi)succinimida éster (Pierce Biotechnology).

Conjugación con un resto que se une a la seroalbúmina de forma no covalente

Los polipéptidos que tienen un peso molecular menor de 50-60 kDa se excretan rápidamente. Muchas moléculas pequeñas, como los ácidos grasos, se unen a la seroalbúmina. Los ácidos grasos que contienen de 10 a 20 átomos de carbono tienen una afinidad sustancial por la seroalbúmina. Se pueden usar ácidos grasos lineales y ramificados. Esta unión en el suero puede reducir la tasa de excreción. Usando métodos conocidos en la técnica, los restos de unión a seroalbúmina se pueden conjugar a cualquiera de los péptidos divulgados en el presente documento. El resto de unión a seroalbúmina se puede unir al péptido de unión a KDR a través de un engarce. El engarce puede ser peptídico o, de otro modo, tal como PEG. Se prefieren los engarces de cero a aproximadamente treinta átomos. Se prefiere que el engarce sea hidrófilo. El resto de unión a seroalbúmina se puede conjugar al péptido de unión a KDR en cualquier extremo o a través de un grupo lateral de un aminoácido adyacente. Los grupos laterales adecuados incluyen lisina y cisteína. Dichos compuestos pueden comprender también quelantes para radionúclidos, como se trata en el presente documento. Un péptido de unión a KDR unido a resto de unión a seroalbúmina se unirá a KDR.

Conjugación con PEG

Como se sabe bien en la técnica, la unión de poli(etilenglicol) (PEG) a proteínas y péptidos potencia la residencia en el suero de estas moléculas. La unión del PEG (lineal o ramificado) a un péptido de unión a KDR se espera que de una sustancial potenciación del tiempo de residencia en suero. El peso molecular de PEG deberá ser de al menos 10 kDa, más preferentemente de al menos 20 kDa y más preferentemente de 30 kDa o más. El PEG se podría unir en el extremo N o C. Los métodos para fijar PEG a los péptidos son bien conocidos en la técnica (Roberts M. y col., 2002. Adv. Drug. Deliv. Rev., 54: 459-476). El PEG se puede unir a grupos laterales reactivos tales como lisina o cisteína.

Fusión con proteína sérica

En la técnica se sabe que proteínas que comprenden seroalbúmina (SA) y otras proteínas han potenciado los tiempos de residencia en suero. Se describe una proteína de fusión que comprende AGDWWVECRVGTGLCYRYDTGTGGGK(SEC ID N.º: 25): PGGSGGEGGSGGEGGRPGGSEGGTGG:: hSA madura:: GGS GGEGGSGGEGGSGPGEGGEGSGGRP :: GDSRCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31). Los péptidos de unión a KDR están separados de la hSA madura por engarces que son ricos en glicina permitiendo una separación flexible. En la técnica se sabe que no se necesita usar toda la hSA para obtener una proteína inyectable que tendrá un tiempo de residencia en suero mayor. También se sabe en la técnica que los grupos químicos, como maleimida y alfa bromo carboxilatos, reaccionan con la cisteína no apareada (residuo 34) formando aductos estables. Por tanto, se puede unir un único quelante a las proteínas de fusión con hSA de modo que el aducto se unirá a un radionúclido. Se puede preparar un quelante con un grupo maleimida y acoplarlo a hSA o a un derivado de hSA. Como alternativa, una hSA o a un derivado de hSA podrían reaccionar con una bismaleimida y un quelante portador de un tiol reactivo podría reaccionar con la hSA derivada de bismaleimida.

La construcción de genes que codifican una secuencia de aminoácidos dada se conoce en la técnica. La expresión de fusiones de HSA en *Saccharomyces cerevisiae* conoce en la técnica Sleep, D y col. 1991. Biotechnology (NY),

9:183-187).

Listado de secuencias

- <110> Dyax Corporation
 5 <110> BRACCO Suisse SA
 <120> Péptidos de unión a KDR y a VEGF/KDR y su uso en diagnóstico y terapia
 <130> FB14882/A
 <140> PCT/US03/06731
 <141> 3-3-2.003
 10 <150> Documento US 60/360.851
 <151> 1-3-2.002
 <150> Documento US 60/440.411
 <151> 15-1-2.003
 <160> 107
 15 <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 14
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Aislado de biblioteca
 <400> 1

Pro Lys Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Met Ile Thr
1 5 10

- 25 <210> 2
 <211> 14
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Aislado de biblioteca
 <400> 2

Trp Val Glu Cys Phe Met Asp Thr Gly Ala Cys Tyr Thr Phe
1 5 10

- <210> 3
 35 <211> 17
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Aislado de biblioteca
 40 <400> 3

Ser Arg Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys Phe Arg
1 5 10 15

Tyr

- <210> 4
 <211> 22
 45 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 4

- 50
Ala Gly Asp Ser Trp Cys Ser Thr Glu Tyr Thr Tyr Cys Glu Met Ile
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 5

<211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 5

Ala Gly Pro Lys Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Met Ile Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 6
 10 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 15 <400> 6

Ala Gly Val Trp Glu Cys Ala Lys Thr Phe Pro Phe Cys His Trp Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 7
 <211> 22
 20 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 7

Ala Gly Trp Val Glu Cys Trp Trp Lys Ser Gly Gln Cys Tyr Glu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys

20

<210> 8
 <211> 22
 30 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 8

Ala Gly Trp Ile Gln Cys Asn Ser Ile Thr Gly His Cys Thr Ser Gly
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 9
 <211> 22
 35 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 9

Ala Gly Trp Ile Glu Cys Tyr His Pro Asp Gly Ile Cys Tyr His Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 10
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 10

Ala Gly Ser Asp Trp Cys Arg Val Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Met
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

10 <210> 11
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 11

Ala Gly Ala Asn Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Phe Ile Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

20 <210> 12
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 12

Ala Gly Ala Asn Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Ile Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

30 <210> 13
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 35 <400> 13

Ala Gly Pro Asp Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Ile Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

40 <210> 14
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado

<400> 14

Ala Gly Ser Asn Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Tyr Ile Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

5

<210> 15

<211> 22

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado

<400> 15

Ala Gly Pro Asp Trp Cys Ala Ala Asp Trp Tyr Tyr Cys Tyr Ile Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

15

<210> 16

<211> 22

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado

<400> 16

Ala Gly Pro Glu Trp Cys Glu Val Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Leu
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

25

<210> 17

<211> 22

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado

30

<400> 17

Ala Gly Pro Thr Trp Cys Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

35

<210> 18

<211> 22

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado

<400> 18

40

Ala Gly Ser Lys Trp Cys Glu Gln Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Leu
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 19

<211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 19

Ala Gly Arg Asn Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Phe Ile Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 20
 10 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 15 <400> 20

Ala Gly Val Asn Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Ile Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 21
 <211> 22
 20 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 21

Ala Gly Ala Asn Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Tyr Ile Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 22
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 22

Ala Gly Gln Ala Trp Val Glu Cys Tyr Ala Glu Thr Gly Tyr Cys Trp
1 5 10 15
Pro Arg Ser Trp Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 23
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 23

Ala Gly Gln Ala Trp Ile Glu Cys Tyr Ala Glu Asp Gly Tyr Cys Trp
1 5 10 15
Pro Arg Ser Trp Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 24
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 24

Ala Gly Val Gly Trp Val Glu Cys Tyr Gln Ser Thr Gly Phe Cys Tyr
1 5 10 15
His Ser Arg Asp Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

10 <210> 25
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 25

Ala Gly Asp Trp Trp Val Glu Cys Arg Val Gly Thr Gly Leu Cys Tyr
1 5 10 15
Arg Tyr Asp Thr Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

20 <210> 26
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 26

Ala Gly Asp Ser Trp Val Glu Cys Asp Ala Gln Thr Gly Phe Cys Tyr
1 5 10 15
Ser Phe Leu Tyr Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

30 <210> 27
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 35 <400> 27

Ala Gly Glu Arg Trp Val Glu Cys Arg Ala Glu Thr Gly Phe Cys Tyr
1 5 10 15
Thr Trp Val Ser Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 28
 <211> 26

<212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 28

Ala Gly Gly Gly Trp Val Glu Cys Arg Ala Glu Thr Gly His Cys Gln
1 5 10 15
Glu Tyr Arg Leu Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 29
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 29

Ala Gly Val Ala Trp Val Glu Cys Tyr Gln Thr Thr Gly Lys Cys Tyr
1 5 10 15
Thr Phe Arg Gly Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 30
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 30

Ala Gly Glu Gly Trp Val Glu Cys Phe Ala Asn Thr Gly Ala Cys Phe
1 5 10 15
Thr Tyr Pro Arg Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 31
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 31

Gly Asp Ser Arg Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys
1 5 10 15
Phe Arg Tyr Asp Pro Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 32
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 32

Gly Asp Asp Ser Tyr Cys Met Met Asn Glu Lys Gly Trp Trp Asn Cys
1 5 10 15
Tyr Leu Tyr Asp Pro Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 33
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 33

Gly Asp Pro Ala Gln Cys Trp Glu Ser Asn Tyr Gln Gly Ile Phe Phe
1 5 10 15
Cys Asp Asn Pro Asp Pro Gly Gly Gly Lys
20 25

10 <210> 34
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 34

Gly Asp Gly Trp Ala Cys Ala Lys Trp Pro Trp Gly Gly Glu Ile Cys
1 5 10 15
Gln Pro Ser Asp Pro Gly Gly Gly Lys
20 25

20 <210> 35
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 35

Ala Gln Gln Val Gln Tyr Gln Phe Phe Leu Gly Thr Pro Arg Tyr Glu
1 5 10 15
Gln Trp Asp Leu Asp Lys Gly Gly Lys
20 25

30 <210> 36
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 35 <400> 36

Ala Gln Glu Pro Glu Gly Tyr Ala Tyr Trp Glu Val Ile Thr Leu Tyr
1 5 10 15
His Glu Glu Asp Gly Asp Gly Gly Lys
20 25

40 <210> 37
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 37

Ala Gln Ala Phe Pro Arg Phe Gly Gly Asp Asp Tyr Trp Ile Gln Gln
1 5 10 15
Tyr Leu Arg Tyr Thr Asp Gly Gly Lys
20 25

5 <210> 38
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 38

Ala Gln Gly Asp Tyr Val Tyr Trp Glu Ile Ile Glu Leu Thr Gly Ala
1 5 10 15
Thr Asp His Thr Pro Pro Gly Gly Lys
20 25

15 <210> 39
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 39

Ala Gln Arg Gly Asp Tyr Gln Glu Gln Tyr Trp His Gln Gln Leu Val
1 5 10 15
Glu Gln Leu Lys Leu Leu Gly Gly Lys
20 25

25 <210> 40
 <211> 23
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 30 <400> 40

Ala Gln Arg Ser Trp Tyr Leu Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Glu Trp Asp
1 5 10 15
Pro Ile Pro Asn Gly Gly Lys
20

35 <210> 41
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 41

40

Ala Gln Asp Trp Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Ser Met Ala Asp Gln Leu
1 5 10 15
Arg His Ala Phe Leu Ser Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 42
 <211> 28
 <212> PROTEÍNA
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> KDR or KDR/VEGF Complex Binding Polypeptide
 <400> 42

Ala Gln Ala Pro Ala Trp Thr Phe Gly Thr Asn Trp Arg Ser Ile Gln
1 5 10 15
Arg Val Asp Ser Leu Thr Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

10 <210> 43
 <211> 28
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 43

Ala Gln Glu Gly Trp Phe Arg Asn Pro Gln Glu Ile Met Gly Phe Gly
1 5 10 15
Asp Ser Trp Asp Lys Pro Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

20 <210> 44
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 44

Ala Gln Glu Gly Trp Phe Arg Asn Pro Gln Glu Ile Met Gly Phe Gly
1 5 10 15
Asp Ser Trp Asp Lys Pro Gly Gly Gly Lys
20 25

30 <210> 45
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 35 <400> 45

Ala Gln Arg Gly Asp Tyr Gln Glu Gln Tyr Trp His Gln Gln Leu Val
1 5 10 15
Glu Gln Leu Lys Leu Leu Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 46
 <211> 20
 40 <212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 46

5

Ala Gly Trp Tyr Trp Cys Asp Tyr Tyr Gly Ile Gly Cys Lys Trp Thr
1 5 10 15
Gly Gly Gly Lys
20

<210> 47
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 47

10

Ala Gly Trp Tyr Trp Cys Asp Tyr Tyr Gly Ile Gly Cys Lys Trp Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

15

<210> 48
 <211> 26
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 48

20

Ala Gln Trp Tyr Tyr Asp Trp Phe His Asn Gln Arg Lys Pro Pro Ser
1 5 10 15
Asp Trp Ile Asp Asn Leu Gly Gly Gly Lys
20 25

25

<210> 49
 <211> 21
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 49

30

Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys Phe Arg Tyr Asp
1 5 10 15
Pro Gly Gly Gly Lys
20

35

<210> 50
 <211> 19
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 50

40

Ala Gly Pro Thr Trp Cys Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Lys

<210> 51
 <211> 27
 <212> PROTEÍNA
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 51

Ala Gln Ala His Met Pro Pro Trp Arg Pro Val Ala Val Asp Ala Leu
1 5 10 15
Phe Asp Trp Val Glu Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

10 <210> 52
 <211> 27
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 52

Ala Gln Ala His Met Pro Pro Trp Trp Pro Leu Ala Val Asp Ala Gln
1 5 10 15
Glu Asp Trp Phe Glu Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

20 <210> 53
 <211> 27
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 53

Ala Gln Ala Gln Met Pro Pro Trp Trp Pro Leu Ala Val Asp Ala Leu
1 5 10 15
Phe Asp Trp Phe Glu Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

30 <210> 54
 <211> 27
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 35 <400> 54

Ala Gln Asp Trp Tyr Trp Arg Glu Trp Met Pro Met His Ala Gln Phe
1 5 10 15
Leu Ala Asp Asp Trp Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 55
 <211> 28
 40 <212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

<400> 55

5

Ala	Gln	Pro	Val	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	His	His	Pro	Lys	Ala	Pro	Asp
1				5					10					15	
Val	Trp	Leu	Phe	Tyr	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys				
			20					25							

<210> 56

<211> 28

<212> PROTEÍNA

10 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

<400> 56

Ala	Gln	Asp	Ala	Leu	Glu	Ala	Pro	Lys	Arg	Asp	Trp	Tyr	Tyr	Asp	Trp
1				5					10					15	
Phe	Leu	Asn	His	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys				
			20					25							

15

<210> 57

<211> 19

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

20 $\langle 220 \rangle$

<223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

<400> 57

Lys Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Met Ile Thr Gly Thr Gly
1 5 10 15
Gly Gly Lys

25

<210> 58

<211> 19

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

30 <223> > Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

<400> 58

Ala Gly Pro Lys Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Met Ile Gly
1 5 10 15
Gly Gly Lys

<210> 59

<211> 16

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

40 <400> 59

Lys Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Met Ile Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15

$\langle 210 \rangle$ 60

<211> 29

45 <212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

<400> 60

Ala Gln Pro Asp Asn Trp Lys Glu Phe Tyr Glu Ser Gly Trp Lys Tyr
1 5 10 15
Pro Ser Leu Tyr Lys Pro Leu Gly Gly Gly Gly Gly Lys

20

25

<210> 61

<211> 28

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

<400> 61

Ala Gln Met Pro Pro Gly Phe Ser Tyr Trp Glu Gln Val Val Leu His
1 5 10 15
Asp Asp Ala Gln Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 62

<211> 27

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

<400> 62

Ala Gln Ala Arg Met Gly Asp Asp Trp Glu Glu Ala Pro Pro His Glu
1 5 10 15
Trp Gly Trp Ala Asp Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 63

<211> 28

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

<400> 63

Ala Gln Pro Glu Asp Ser Glu Ala Trp Tyr Trp Leu Asn Tyr Arg Pro
1 5 10 15
Thr Met Phe His Gln Leu Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 64

<211> 27

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF

<400> 64

Ala Gln Ser Thr Asn Gly Asp Ser Phe Val Tyr Trp Glu Glu Val Glu
1 5 10 15
Leu Val Asp His Pro Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 65
 <211> 28
 <212> PROTEÍNA
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 65

Ala Gln Trp Glu Ser Asp Tyr Trp Asp Gln Met Arg Gln Gln Leu Lys
1 5 10 15
Thr Ala Tyr Met Lys Val Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

10 <210> 66
 <211> 28
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR o al complejo KDR/VEGF
 <400> 66

Ala Gln Asp Trp Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Ser Met Ala Asp Gln Leu
1 5 10 15
Arg His Ala Phe Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Lys
20 25

20 <210> 67
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido Smart II
 <400> 67

aagcagtgtg aacaacgcag agtacgcggg 30

30 <210> 68
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para clonación
 35 <400> 68

gatggagagc aagtgctgc tgg 23

40 <210> 69
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para clonación
 <400> 69

ccaagttcgt ctttctctgg gca 23

45 <210> 70
 <211> 36
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para clonación
 <400> 70
 5 tcccccgga tcattattct agtaggcacg gcggtg 36
 <210> 71
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para clonación
 <400> 71
 15 caggaggaga gctcagtg gtc 23
 <210> 72
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido para clonación
 <400> 72
 ataagaatgc ggccgcagga tggagagcaa ggtgctgctg g 41
 25 <210> 73
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido para clonación
 <400> 73
 ttccaagttc gtcttttct gggcacc 27
 35 <210> 74
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para clonación
 40 <400> 74
 atcattattc tagtaggcac ggcggtg 27
 45 <210> 75
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para clonación
 <400> 75
 50 ataagaatgc ggccgcaaca ggaggagagc tcagtgtggt c 41
 <210> 76
 <211> 17
 <212> PROTEÍNA
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR
 <400> 76

Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys Phe Gly Gly Gly
1 5 10 15
Lys

60 <210> 77

<211> 21
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido de unión a KDR
 <400> 77

Gly Asp Ser Arg Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys
1 5 10 15
Phe Gly Gly Gly Lys
20

10 <210> 78
 <211> 20
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR
 15 <400> 78

Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys Phe Arg Tyr Asp
1 5 10 15

Pro Gly Gly Gly
20

20 <210> 79
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial,
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR
 25 <400> 79

Ser Arg Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys Phe Arg
1 5 10 15
Tyr Gly Gly Gly Gly Lys
20

30 <210> 80
 <211> 23
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR
 <400> 80

Gly Asp Ser Arg Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys
1 5 10 15
Phe Arg Tyr Gly Gly Gly Lys
20

35 <210> 81
 <211> 21
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR
 <400> 81

Gly Asp Ser Arg Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys
1 5 10 15
Phe Arg Tyr Asp Pro
20

<210> 82

<211> 18

<212> PROTEÍNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR

<400> 82

Ala Gly Asp Ser Trp Cys Ser Thr Glu Tyr Thr Tyr Cys Glu Met Ile
1 5 10 15
Gly Thr

10

<210> 83

<211> 24

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido de unión a KDR

<400> 83

Ala Gln Asp Trp Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Ser Met Ala Asp Gln Leu
1 5 10 15
Arg His Ala Phe Leu Ser Gly Gly
20

20

<210> 84

<211> 26

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido control negativo

<400> 84

Ala Glu Gly Thr Gly Asp Leu His Cys Tyr Phe Pro Trp Val Cys Ser
1 5 10 15
Leu Asp Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20 25

30

<210> 85

<211> 22

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión a KDR

35 <400> 85

Ala Gly Pro Thr Trp Cys Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

40

<210> 86

<211> 26

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Aislado de biblioteca
<400> 86

Gly Cys Lys Thr Lys Ile Ser Lys Val Lys Lys Lys Trp Asn Cys Tyr
1 5 10 15
Ser Asn Asn Lys Val Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

5
<210> 87
<211> 26
<212> PROTEÍNA
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<223> Aislado de biblioteca
<400> 87

Lys Gln Phe Cys Glu Glu Asn Trp Glu Arg Gly Arg Asn His Tyr Tyr
1 5 10 15
Cys Leu Thr Thr Leu Ser Gly Gly Gly Lys
20 25

15
<210> 88
<211> 17
<212> PROTEÍNA
<213> Secuencia artificial
<220>
20
<223> Aislado de biblioteca
<400> 88

Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Met Ile Thr Gly Thr Gly Gly Gly
1 5 10 15
Lys

25
<210> 89
<211> 18
<212> PROTEÍNA
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Aislado de biblioteca
30
<400> 89

Ala Gly Pro Lys Trp Cys Glu Glu Asp Trp Tyr Tyr Cys Met Ile Thr
1 5 10 15
Ala Thr

35
<210> 90
<211> 22
<212> PROTEÍNA
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Aislado de biblioteca
<400> 90

40
Ala Gly Pro Thr Trp Glu Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Lys Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 91
<211> 22

<212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Aislado de biblioteca
 <400> 91

5

Ala Gly Pro Thr Trp Lys Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Glu Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 92
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Aislado de biblioteca
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa = Dpr
 <400> 92

10

15

Ala Gly Pro Thr Trp Xaa Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 93
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Aislado de biblioteca
 <221> MOD_RES
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Dpr
 <400> 93

20

25

30

Ala Gly Pro Thr Trp Asp Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Xaa Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 94
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Aislado de biblioteca
 <400> 94

35

Ala Gly Pro Thr Trp Asp Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Lys Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 95
 <211> 8
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Aislado de biblioteca

40

45

<400> 95

Asp Trp Tyr Tyr Gly Gly Gly Lys
1 5

<210> 96

5 <211> 19

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Aislado de biblioteca

10 <400> 96

Ala Gln Asp Trp Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Gly Arg Gly Arg Gly Gly
1 5 10 15
Arg Gly Gly

<210> 97

<211> 25

15 <212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Aislado de biblioteca

<400> 97

20

Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys
1 5 10 15
Phe Arg Tyr Asp Pro Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 98

<211> 22

<212> PROTEÍNA

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Aislado de biblioteca

<400> 98

Ala Gly Pro Thr Trp Cys Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20

30

<210> 99

<211> 25

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Aislado de biblioteca

<400> 99

Gly Asp Ser Arg Val Cys Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys
1 5 10 15
Phe Arg Tyr Asp Pro Gly Gly Gly Lys
20 25

40 <210> 100

<211> 21
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 100

Ala Gln Asp Trp Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Gly Arg Gly Gly Arg Gly
1 5 10 15
Gly Arg Gly Gly Lys
20

10 210> 101
 <211> 22
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Aislado de biblioteca
 <400> 101

Ala Pro Gly Thr Trp Cys Asp Tyr Asp Trp Glu Tyr Cys Trp Leu Gly
1 5 10 15
Thr Phe Gly Gly Gly Lys
20

20 <210> 102
 <211> 23
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 25 <400> 102

Ala Gly Pro Thr Trp Cys Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Phe
1 5 10 15
Gly Thr Gly Gly Gly Gly Lys
20

<210> 103
 <211> 21
 30 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 103

35
Ala Gly Pro Thr Trp Cys Glu Asp Asp Trp Tyr Tyr Cys Trp Leu Phe
1 5 10 15
Thr Gly Gly Gly Lys
20

<210> 104
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 104

Gly Asp Ser Ser Val Cys Phe Glu Tyr Ser Trp Gly Gly Glu Val Cys
1 5 10 15
Phe Arg Tyr Asp Pro Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 105
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido de unión a KDR sintetizado
 <400> 105

Gly Asp Ser Arg Val Cys Trp Glu Tyr Ser Trp Gly Gly Gln Ile Cys
1 5 10 15
Leu Gly Tyr Asp Pro Gly Gly Gly Lys
20 25

10 <210> 106
 <211> 25
 <212> PROTEÍNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Aislado de biblioteca
 <400> 106

Gly Val Asp Phe Arg Cys Glu Trp Ser Asp Trp Gly Glu Val Gly Cys
1 5 10 15

Arg Ser Pro Asp Tyr Gly Gly Gly Lys
20 25

20 <210> 107
 <211> 19
 <212> PROTEÍNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> HSA maduro
 <400> 107

Trp Gln Pro Cys Pro Trp Glu Ser Trp Thr Phe Cys Trp Asp Pro Gly
1 5 10 15
Gly Gly Lys

REIVINDICACIONES

1. Un agente de contraste para ultrasonidos que comprende una microvesícula conjugada con al menos un polipéptido que tiene la capacidad de unirse a KDR o al complejo VEGF/KDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- 5 AGDSWCSTEITYCEMIGTGGGK (SEC ID N.º: 4);
- AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (SEC ID N.º: 5);
- 10 AGVWECAKTFPFCHWFGTGGGK (SEC ID N.º: 6);
- AGWVECWWKSGQCYEFGTGGGK (SEC ID N.º: 7);
- 15 AGWQCNSITGHCTSGGTGGGK (SEC ID N.º: 8);
- AGWIECYHPDGICYHFGTGGGK (SEC ID N.º: 9);
- AGSDWCRVDWYYCWLMGTGGGK (SEC ID N.º: 10);
- 20 AGANWCEEDWYYCFITGTGGGK (SEC ID N.º: 11);
- AGANWCEEDWYYCWITGTGGGK (SEC ID N.º: 12);
- 25 AGPDWCEEDWYYCWITGTGGGK (SEC ID N.º: 13);
- AGSNWCEEDWYYCYITGTGGGK (SEC ID N.º: 14);
- AGPDWCAADWYYCYITGTGGGK (SEC ID N.º: 15);
- 30 AGPEWCEVDWYYCWLLGTGGGK (SEC ID N.º: 16);
- AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17);
- 35 AGSKWCEQDWYYCWLLGTGGGK (SEC ID N.º: 18);
- AGRNWCEEDWYYCFITGTGGGK (SEC ID N.º: 19);
- AGVNWCEEDWYYCWITGTGGGK (SEC ID N.º: 20);
- 40 AGANWCEEDWYYCYITGTGGGK (SEC ID N.º: 21);
- AGQAWVECYAETGYCWPRSWGTTGGGK (SEC ID N.º: 22);
- 45 AGQAWIECYAEDGYCWPRSWGTTGGGK (SEC ID N.º: 23);
- AGVGWVECYQSTGFCYHSRDGTGGGK (SEC ID N.º: 24);
- AGDWWVECRVGTGLCYRYDTGTGGGK (SEC ID N.º: 25);
- 50 AGDSWVECDATGFCYSFLYGTGGGK (SEC ID N.º: 26);
- AGERWVECRAETGFCYTWVSGTGGGK (SEC ID N.º: 27);
- 55 AGGGWVECRAETGHCQEYRLGTGGGK (SEC ID N.º: 28);
- AGVAWVECYQTTGKCYTFRGGTGGGK (SEC ID N.º: 29);
- AGEGWVECFANTGACFTYPRGTGGGK (SEC ID N.º: 30);
- 60 GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31);
- GDDSYCMMNEKGWWNCYLYDPGGGK (SEC ID N.º: 32);
- 65 GDPAQCWESNYQGIFCDNPDPPGGGK (SEC ID N.º: 33);

GDGWACAKWPWGGEICQPSDPGGGK (SEC ID N.º: 34);
 GDSSVCFEYSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 104);
 5 GDSRVCWEYSWGGQICLGYPGGGK (SEC ID N.º: 105);
 AQQVQYQFFLGTPRYEQWDLKGGK (SEC ID N.º: 35);
 AQEPEGYAYWEVITLYHEEDGDGGK (SEC ID N.º: 36);
 10 AQAFPRFGDDYWIQQYLRYTDGGK (SEC ID N.º: 37);
 AQGDYVYWEIIELTGATDHTPPGGK (SEC ID N.º: 38);
 15 AQRGDYQEYWHQQLVEQLKLLGGK (SEC ID N.º: 39);
 AQRSWYLGPPYEEWDPIPNNGK (SEC ID N.º: 40);
 AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGK (SEC ID N.º: 41);
 20 AQAPAWTFGTNWRSIQRVDSL TGGGGGK (SEC ID N.º: 42);
 AQEGWFRNPQEIMGFGDSWDKPGGGGGK (SEC ID N.º: 43);
 25 AQEGWFRNPQEIMGFGDSWDKPGGGGK (SEC ID N.º: 44);
 AQRGDYQEYWHQQLVEQLKLLGGGK (SEC ID N.º: 45);
 Ac-AGWYWCDYYGIGCK(ivDde)WTGGGK-NH2(SEC ID N.º: 46);
 30 Ac-AGWYWCDYYGIGCKWTGTGGGK-NH2(SEC ID N.º: 47);
 Ac-AQWYYDWFHNQRKPPSDWIDNLGGGK-NH2(SEC ID N.º: 48);
 35 Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 49);
 Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTJK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 50);
 Ac-AQAHMPPWRPVAVDALFDWVEGG-GGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 51);
 40 Ac-AQAHMPPWWPLAVDAQEDWFEGG-GGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 52);
 Ac-AQAQMPPWWPLAVDALFDWFEGG-GGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 53);
 45 Ac-AQDWYWREWMPMHAQFLADDWGG-GGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 54);
 Ac-AQPVTDWTPHHPK(ivDde)APDVWLFYT-GGGGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 55);
 Ac-AQDALEA.PK(ivDde)RDWYYDWFLNHSP-GGGGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 56);
 50 Ac-KWCEEDWYYCMITGTGGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 57);
 Ac-AGPKWCEEDWYYCMIGGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 58);
 55 Ac-KWCEEDWYYCMIGGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 59);
 Ac-AQPDNWK(ivDde)EFYESGWK(ivDde)-YPSLYK(ivDde)PLGGGGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 60);
 Ac-AQMPPGFSYWEQVVLHDDAQVLGG-GGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 61);
 60 Ac-AQARMGDDWEEAPPHEWGWADGG-GGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 62);
 Ac-AQPEDSEAWYWLNYRPTMFHQLGG-GGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 63);
 65 Ac-AQSTNGDSFVYWEEVELVDHPGG-GGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 64);

Ac-AQWESDYWDQMRQQLK(iv-Dde)TAYMK(iv-Dde)VGGGGGK(biotina-JJ-)-NH₂ (SEC ID N.º: 65);

Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGK(biotina-JJ-)-NH₂ (SEC ID N.º: 66);

5 VCWEDSWGGGEVCFGGGK (SEC ID N.º: 76);

GDSRVCWEDSWGGGEVCFGGGK (SEC ID N.º: 77);

SRVCWEDSWGGGEVCFRYGGGK (SEC ID N.º: 79);

10 GDSRVCWEDSWGGGEVCFRYGGGK (SEC ID N.º: 80);

DWYYGGGK (SEC ID N.º: 95);

15 AQDWYYDEILGRGRGGRGG (SEC ID N.º: 96);

AGPTWEEDDWYYKWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 90);

AGPTWKEDDWYYEWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 91);

20 AGPTWDprEDDWYYDWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 92);

AGPTWDEDDWYYDprWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 93); y

25 AGPTWDEDDWYYKWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 94), en las que J es el espaciador o grupo de engarce, 8-amino-3,6-dioxaoctanoilo y iv-Dde es 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metibutilo.

2. El agente de la reivindicación 1, en el que la microvesícula está conjugada a un compuesto dimérico o multimérico que comprende dos o más polipéptidos que tienen la capacidad de unirse a KDR o al complejo VEGF/KDR.

30 3. El agente de la reivindicación 1, en el que el agente comprende dos o más polipéptidos y los polipéptidos tienen especificidad por diferentes epítopos en KDR.

35 4. El agente de la reivindicación 3, en el que los polipéptidos se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en:

AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (SEC ID N.º: 5);

GDSRVCWEDSWGGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31);

40 AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGK (SEC ID N.º: 41);

AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17);

45 AGDWWVECRVGTGLCYRYDTGTGGGK (SEC ID N.º: 25); y

Ac-VCWEDSWGGGEVCFRYDPGGGK(biotina-JJ-)-NH₂ (SEC ID N.º: 49).

50 5. El agente de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, en el que uno o más de los polipéptidos no incluyen la extensión GGGK C-terminal en su secuencia de aminoácidos.

6. El agente de la reivindicación 4, en el que los polipéptidos comprenden cualquiera de las combinaciones siguientes:

55 AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) y

Ac-VCWEDSWGGGEVCFRYDPGGGK(biotina-JJ-)-NH₂ (SEC ID N.º: 49);

AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17) y

60 GDSRVCWEDSWGGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31);

AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (SEC ID N.º: 5) y

65 GDSRVCWEDSWGGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31); o

AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGK (SEC ID N.º: 41) y

Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 49).

5 7. El agente de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende.

AGPKWCEEDWYYCMITGTGGGK (SEC ID N.º: 5);

AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK (SEC ID N.º: 17);

10 GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK (SEC ID N.º: 31);

AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGK (SEC ID N.º: 41); o

15 Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(biotina-JJ-)-NH2 (SEC ID N.º: 49).

8. El agente de la reivindicación 2, en el que la microvesícula está conjugada a un dímero seleccionado del grupo que consiste en D1 (figura 25), D2 (figura 26), D3 (figura 27), D4 (figura 28), D5 (figura 29), D6 (figura 50), D7 (figura 51), D8 (figura 30), D9 (figura 31), D10 (figura 32), D11 (figura 33), D12 (figura 34), D13 (figura 35), D14 (figura 36), D15 (figura 37), D16 (figura 38), D17 (figura 39), D18 (figura 40), D19 (figura 41), D20 (figura 42), D21 (figura 43), D22 (figura 44), D23 (figura 45), D24 (figura 46), D25 (figura 47), D26 (figura 50) y D27 (figura 51).

9. El agente de la reivindicación 8, en el que el dímero se selecciona del grupo que consiste en D5 (figura 29), D6 (figura 50), D13 (figura 35) y D23 (figura 45).

25 10. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido está unido a la microvesícula a través de un engarce o espaciador.

30 11. El agente de la reivindicación 10, en el que dicho engarce o espaciador se selecciona del grupo que consiste en una cadena de alquilo sustituida, una cadena de alquilo insustituida, un derivado de polietilenglicol, un espaciador aminoácido, un azúcar, un espaciador alifático, un espaciador aromático, una molécula lipídica o combinación de los mismos.

35 12. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la microvesícula comprende un material formador de microvesículas seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos, lípidos, esfingolípidos, oligolípidos, fosfolípidos, proteínas, polipéptidos, hidratos de carbono y materiales poliméricos sintéticos o naturales.

40 13. El agente de la reivindicación 12, en el que el polipéptido está unido a dicho material formador de microvesículas.

14. El agente de la reivindicación 13, en el que dicho material formador de microvesículas comprende un fosfolípido y el polipéptido está unido a dicho fosfolípido a través de un engarce o espaciador.

45 15. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la microvesícula se selecciona del grupo que consiste en una microburbuja, un microglobo, una micropartícula o una microesfera.

16. El agente de la reivindicación 15, en el que la microburbuja comprende un fosfolípido.

50 17. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la microvesícula comprende un gas biocompatible, una mezcla de gases biocompatibles o un precursor de gases.

18. El agente de la reivindicación 17, en el que el gas o la mezcla de gases comprende un gas fluorado.

55 19. El agente de la reivindicación 17, en el que el gas o la mezcla de gases comprende al menos un gas seleccionado del grupo que consiste en aire; nitrógeno; oxígeno; dióxido de carbono; argón; xenón; criptón; un alcano, cicloalcano, alqueno o alquino de bajo peso molecular; un gas hiperpolarizado, SF6, un freón y un perfluorocarbono.

60 20. El agente de la reivindicación 17, en el que el gas o la mezcla de gases comprende un gas seleccionado del grupo que consiste en SF6, C3F8, C4F8, C4F10 y C5F12.

21. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende un agente terapéutico.

65 22. Un residuo liofilizado para preparar un agente de contraste para ultrasonidos como se expone en la reivindicación 1, en el que dicho residuo comprende un fosfolípido y al menos uno de los polipéptidos de la reivindicación 1.

FIG. 1A

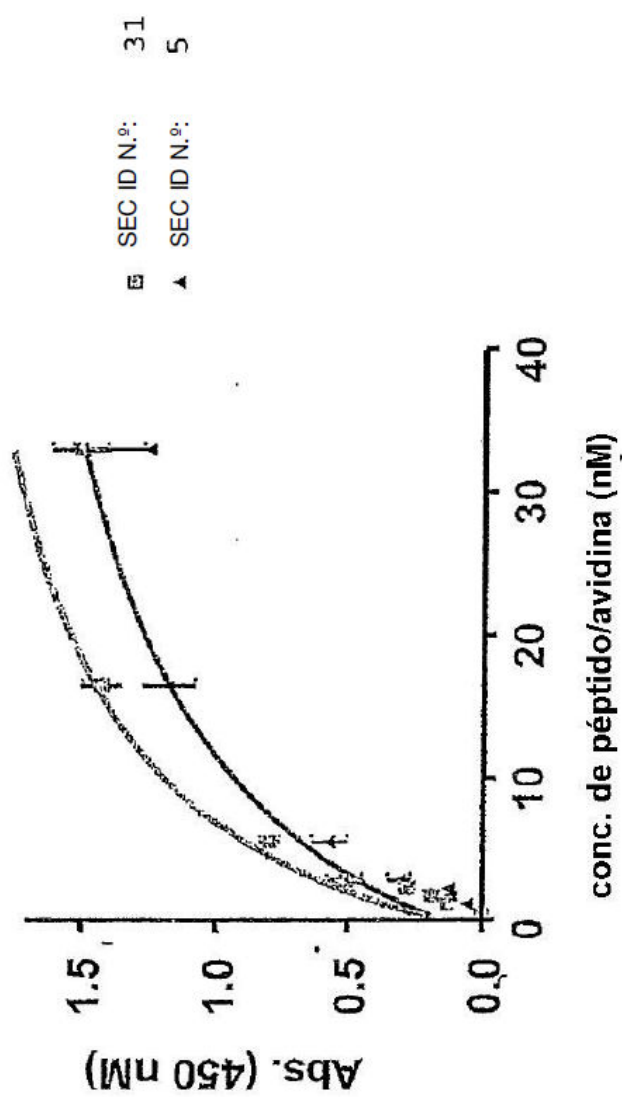


FIG. 1B

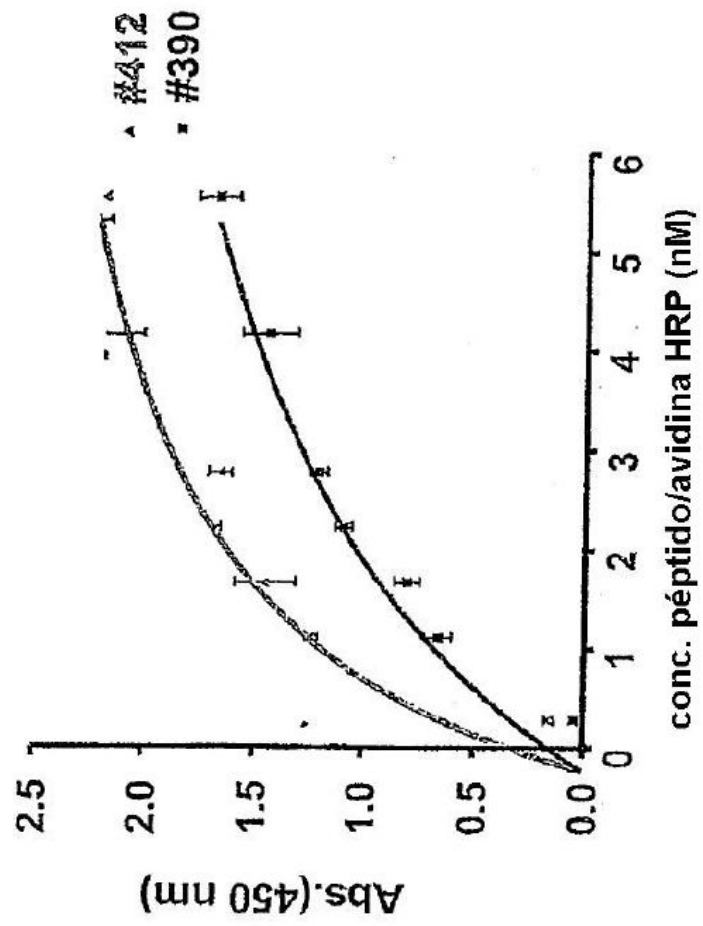


FIG. 2

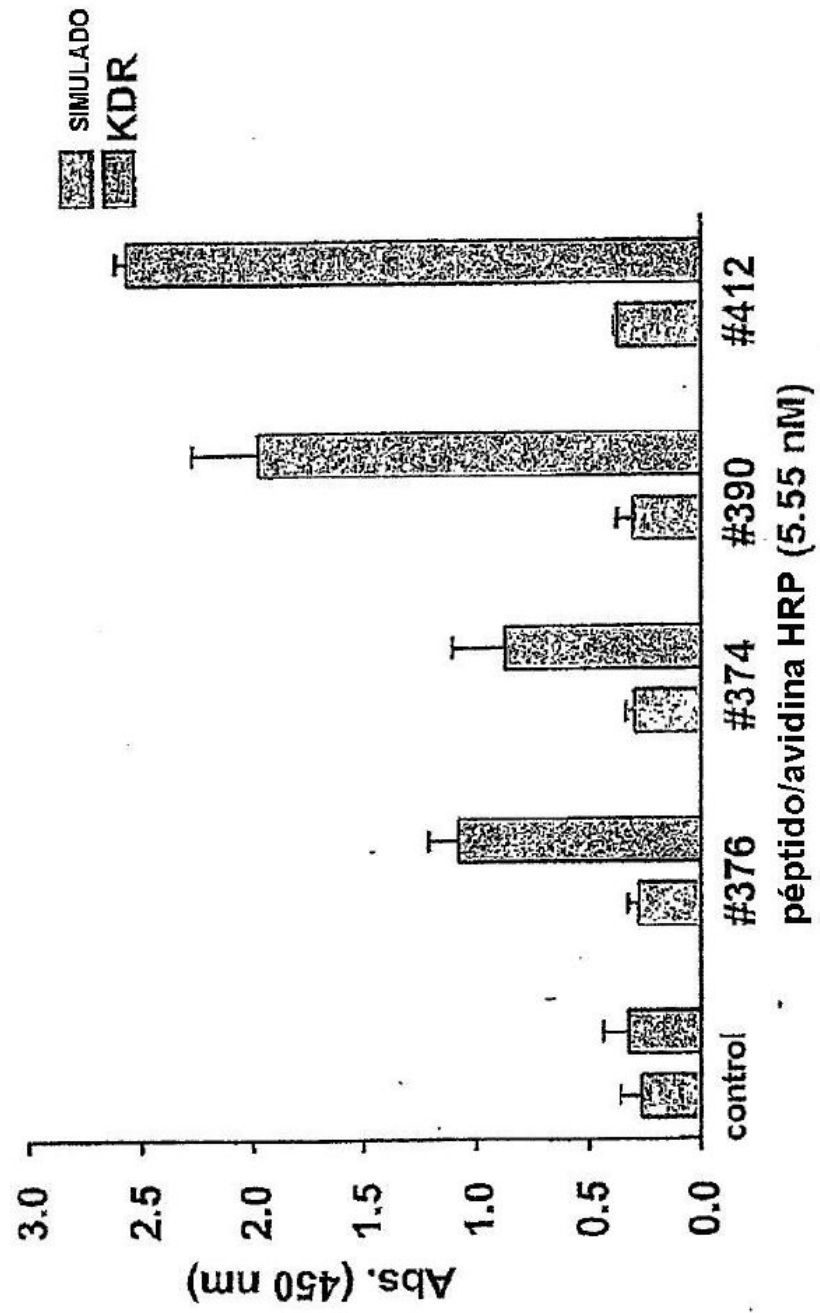


FIG. 3

- (a) Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGT-GGGK(^{Biotina} -di(aminodioxocta)-)-NH₂ (SEC ID N.º: 5)
 (b) Ac-AGPKWCEEDWYYCMITGT-GGGK(^{Biotina} -)-NH₂ (SEC ID N.º: 5)
 (c) Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYP-GGGK(^{Biotina} -di(aminodioxocta)-)-NH₂ (SEC ID N.º: 31)
 (d) Ac-GDSRVCWEDSWGGEVCFRYP-GGGK-(^{Biotina})-NH₂ (SEC ID N.º: 31)

FIG. 4

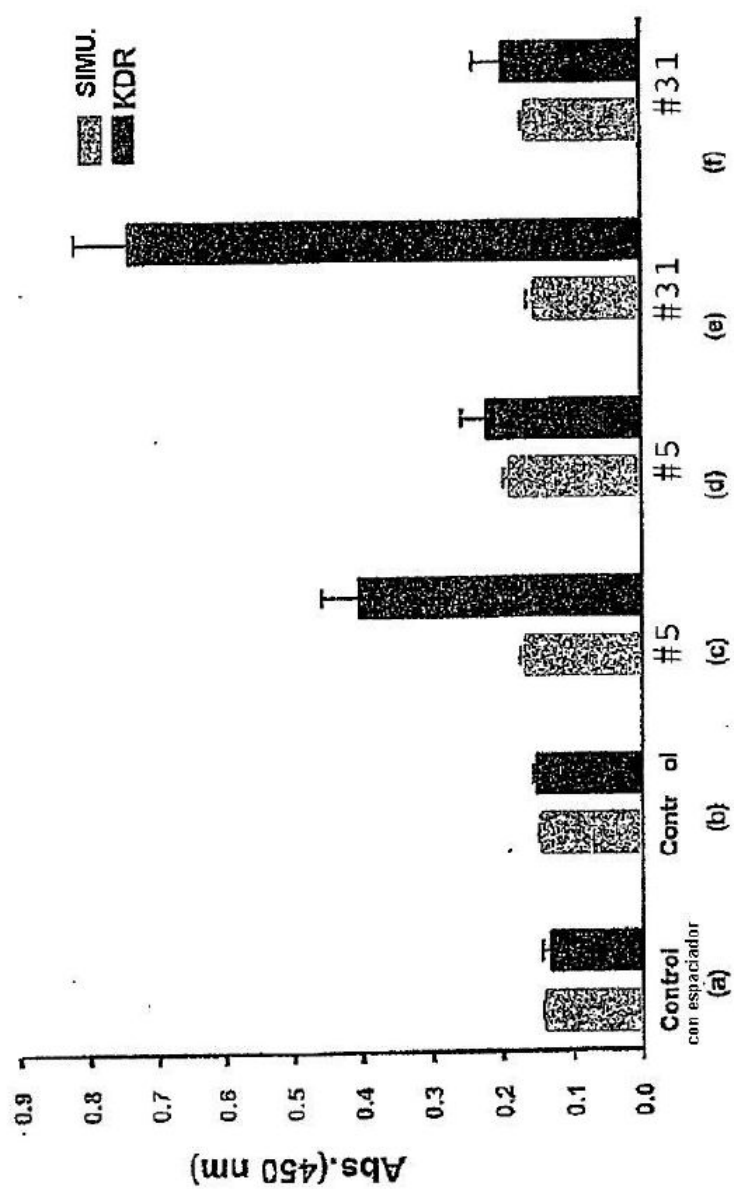


FIG. 5

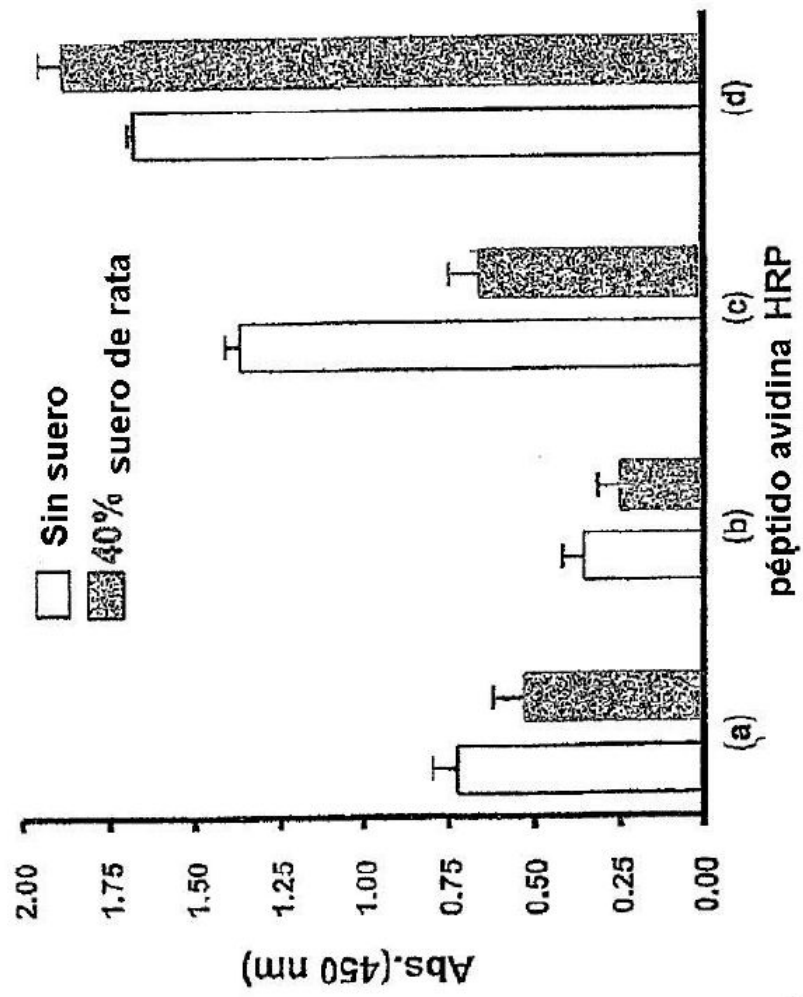


FIG. 6

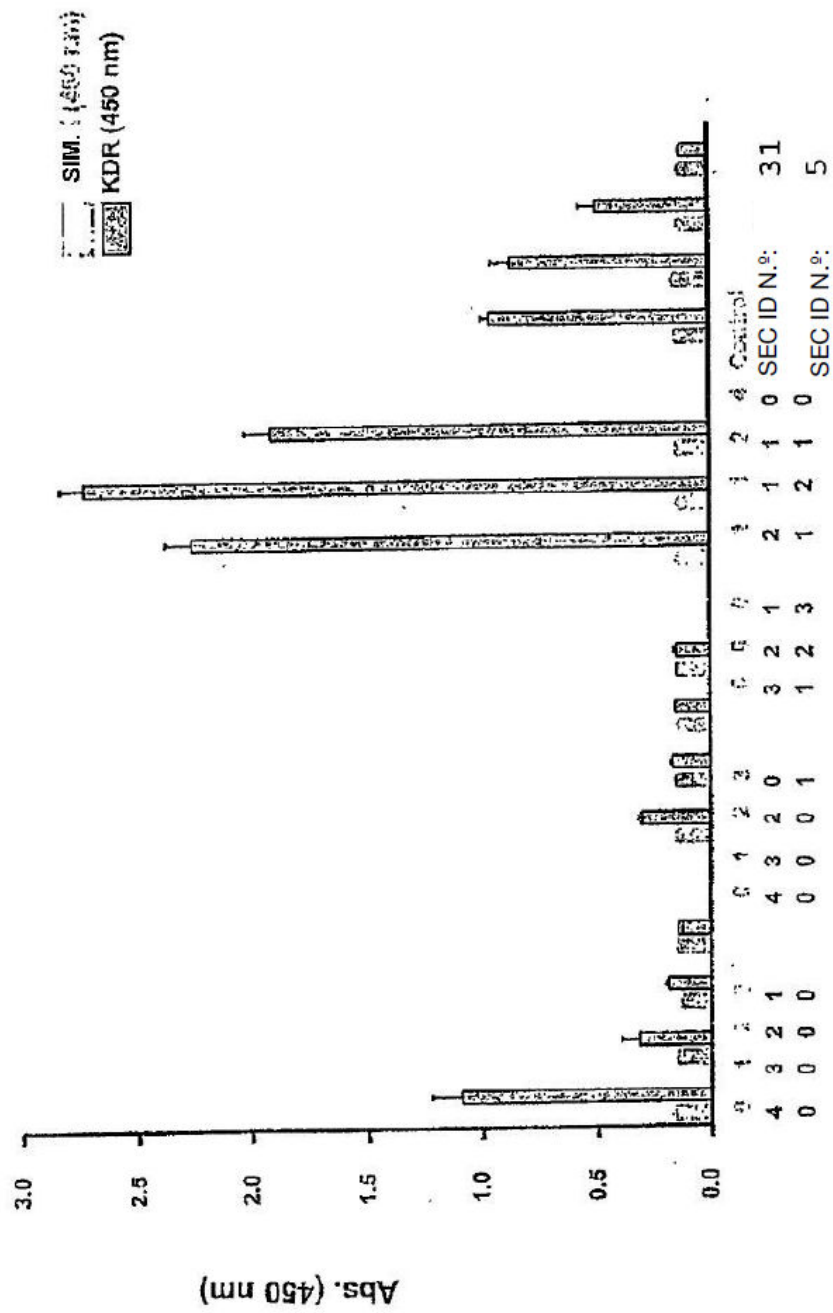


FIG. 7

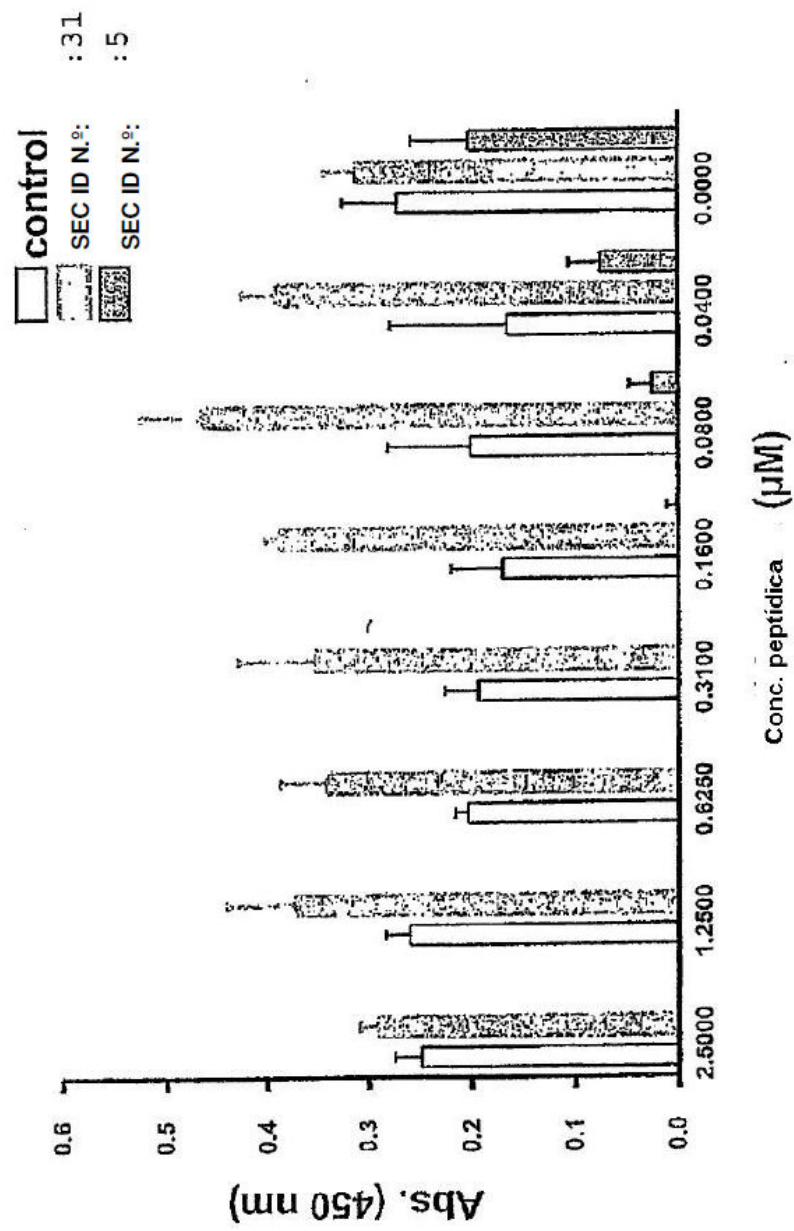


FIG. 8

Secuencia	SEC ID N.º:	K_D , B (μ M)
GDSRVCWEDSWGGEVCFRYDPGGK	31	0.069
<u>VCWEDSWGGEVCFGGK</u>	76	0.91
GDSRVCWEDSWGGEVCFGGK	77	1.30
<u>VCWEDSWGGEVCFRYDPGGK</u>	78	0.040
<u>SRVCWEDSWGGEVCFRYGGGK</u>	79	0.035
<u>GDSRVCWEDSWGGEVCFRYGGK</u>	80	0.060

FIG. 9

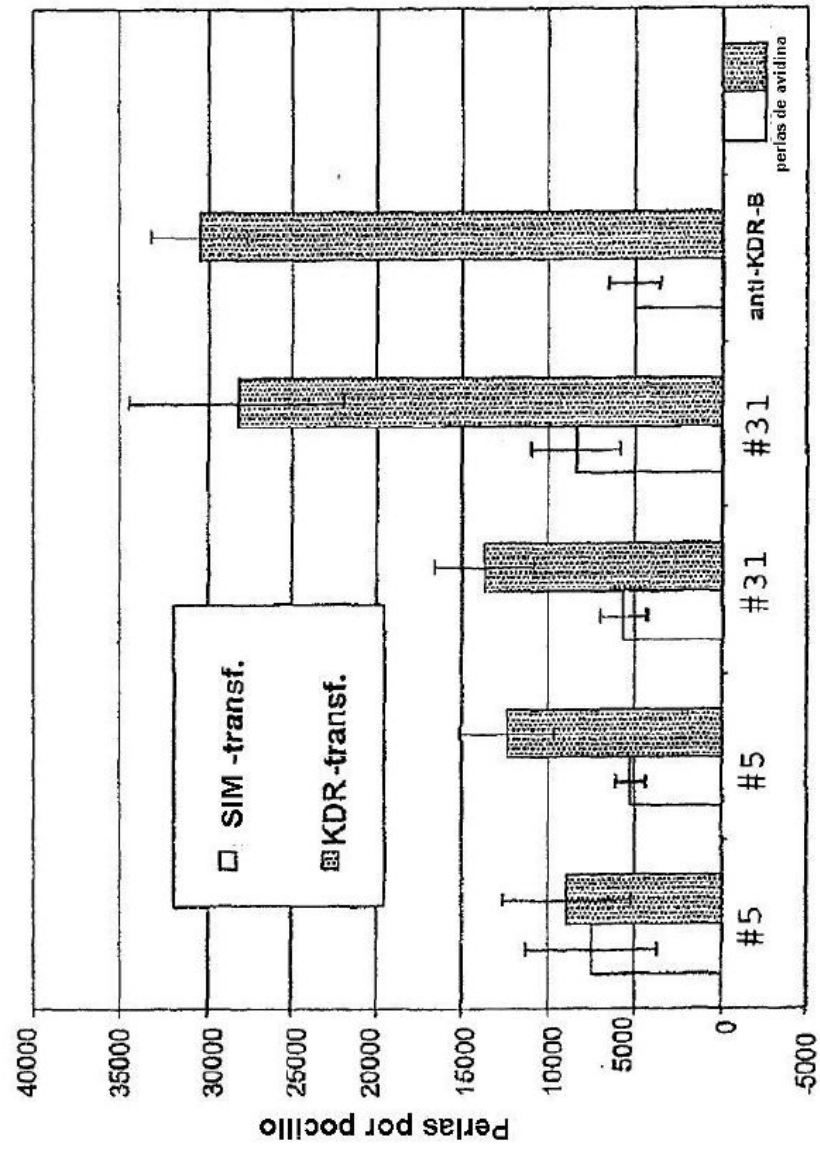


FIG. 10

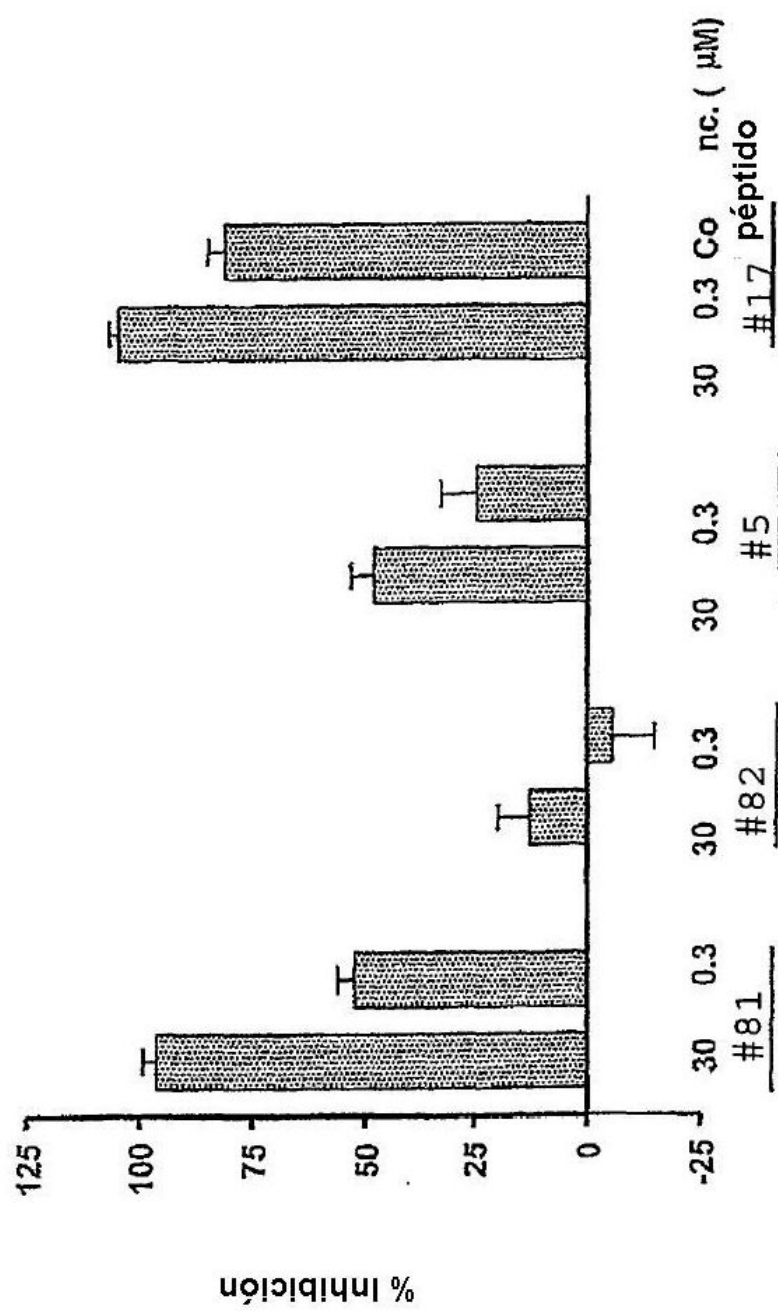


FIG. 11

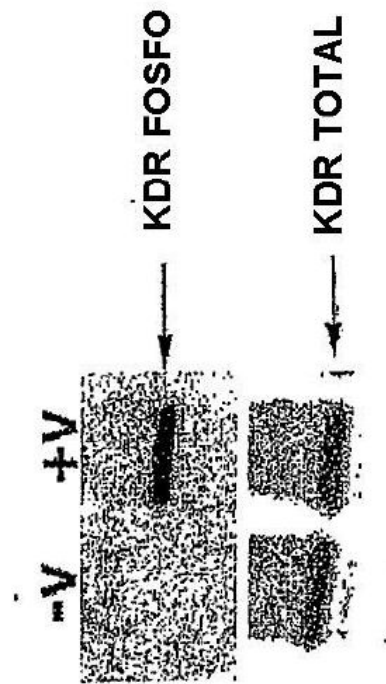


FIG. 12

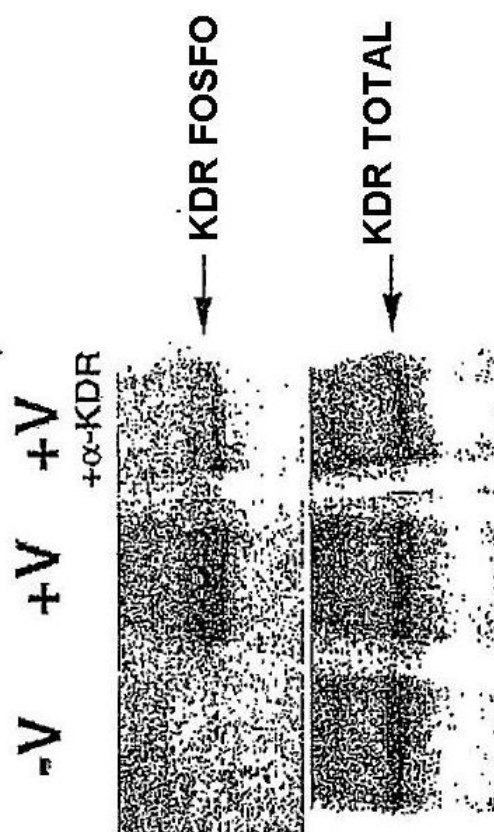


FIG. 13

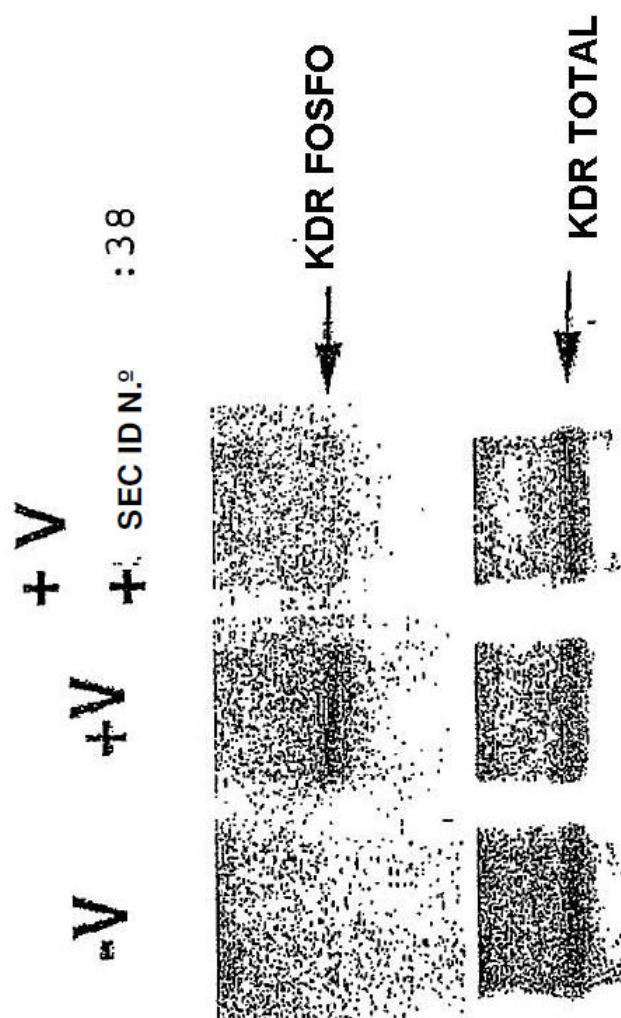


FIG. 14

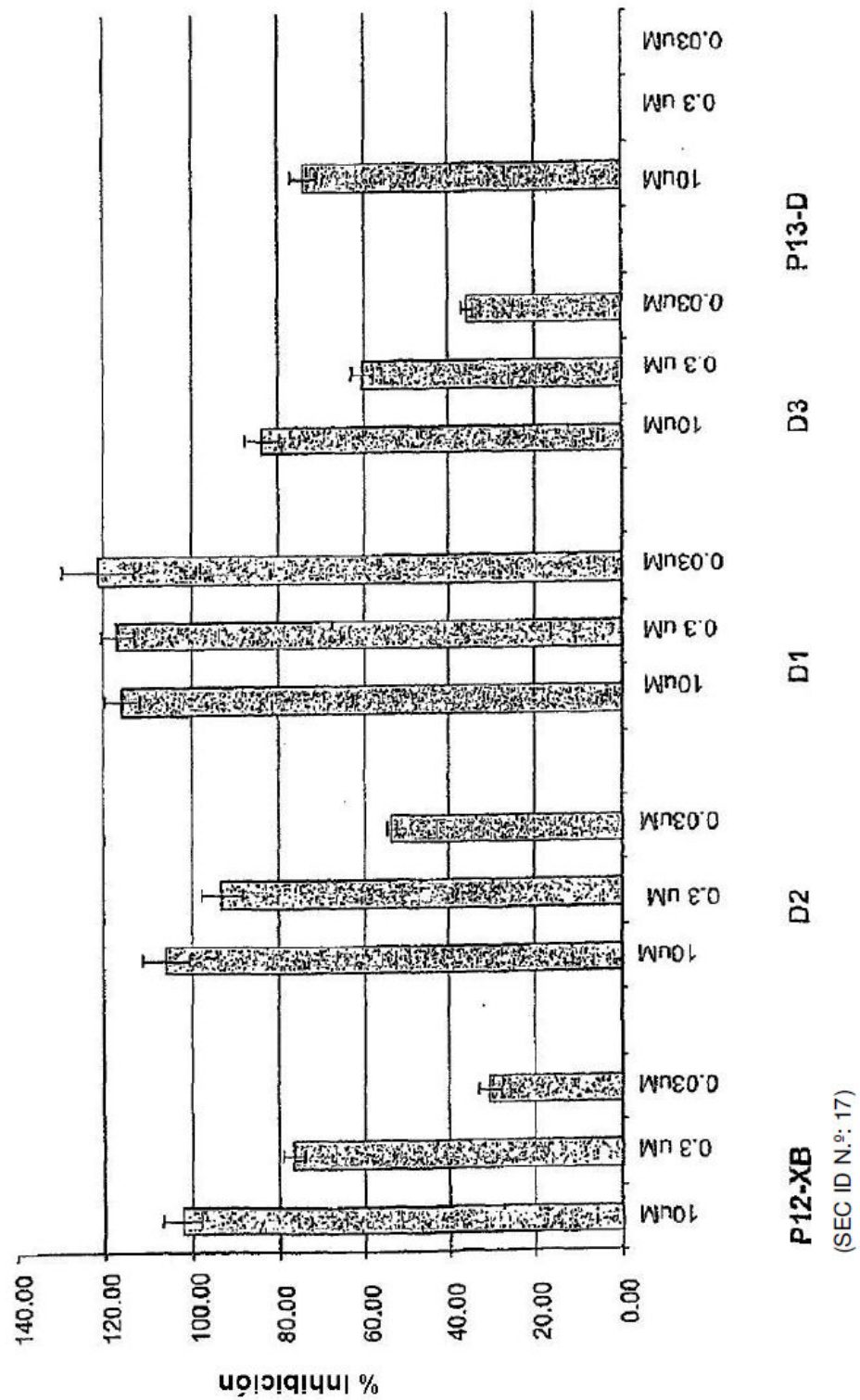


FIG. 15

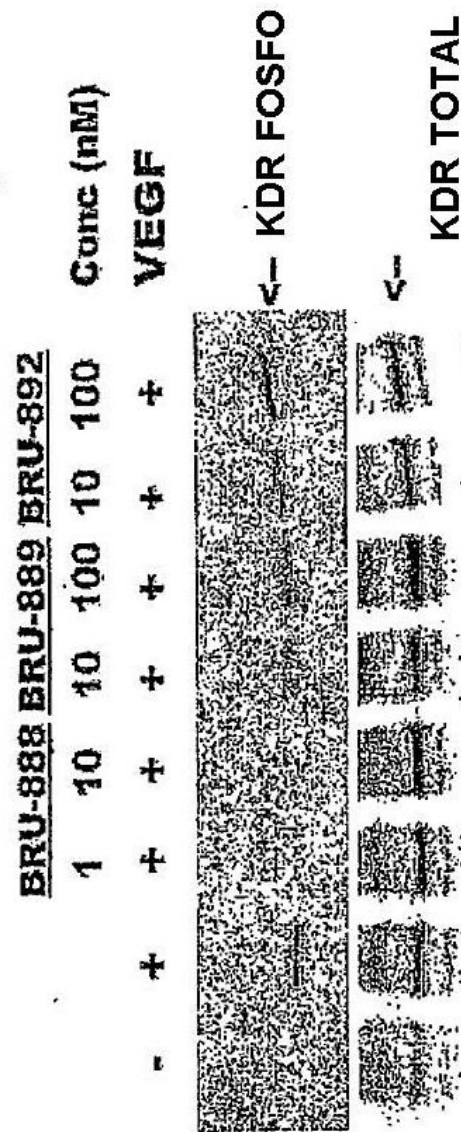


FIG. 16

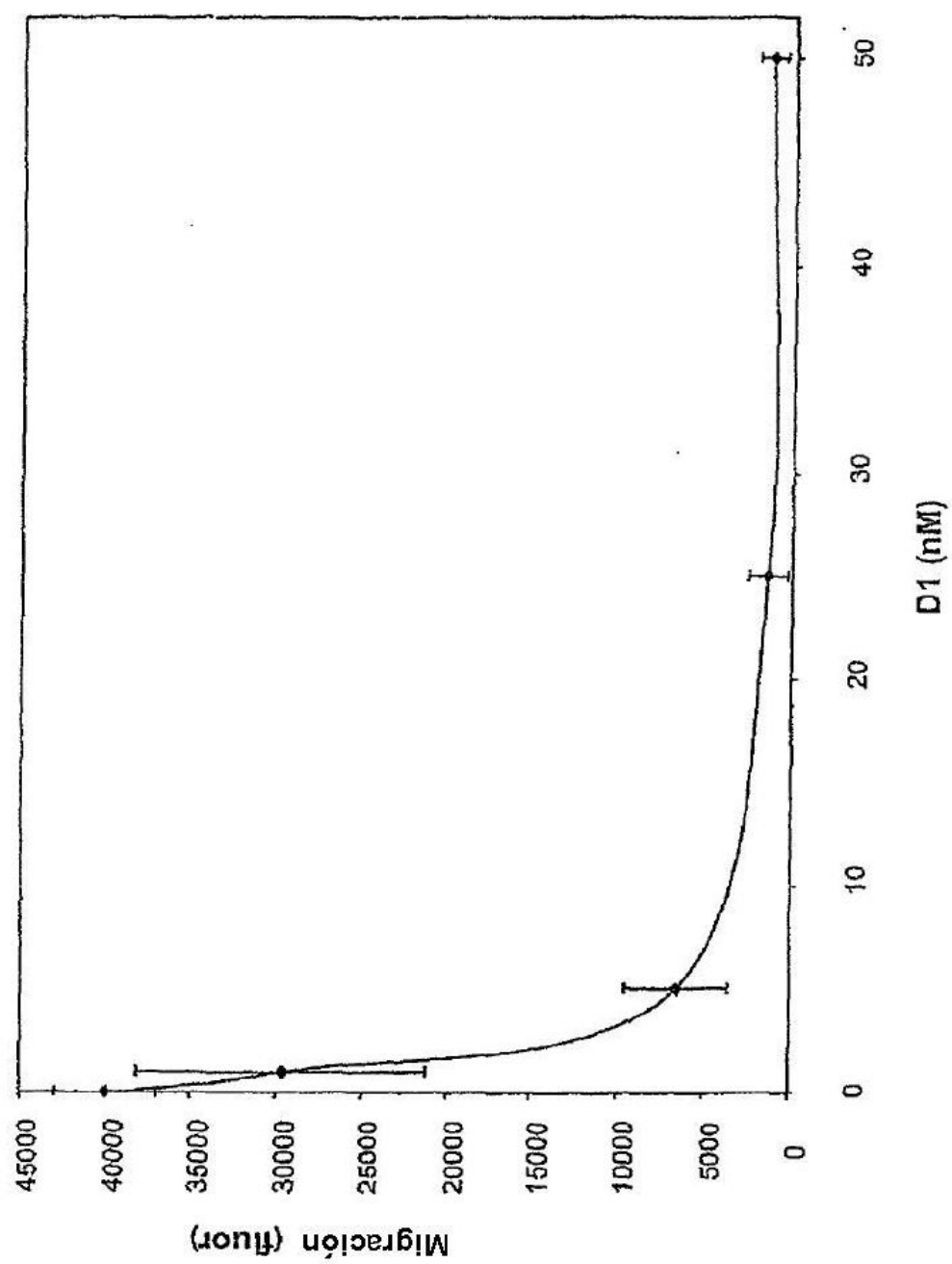


FIG. 17

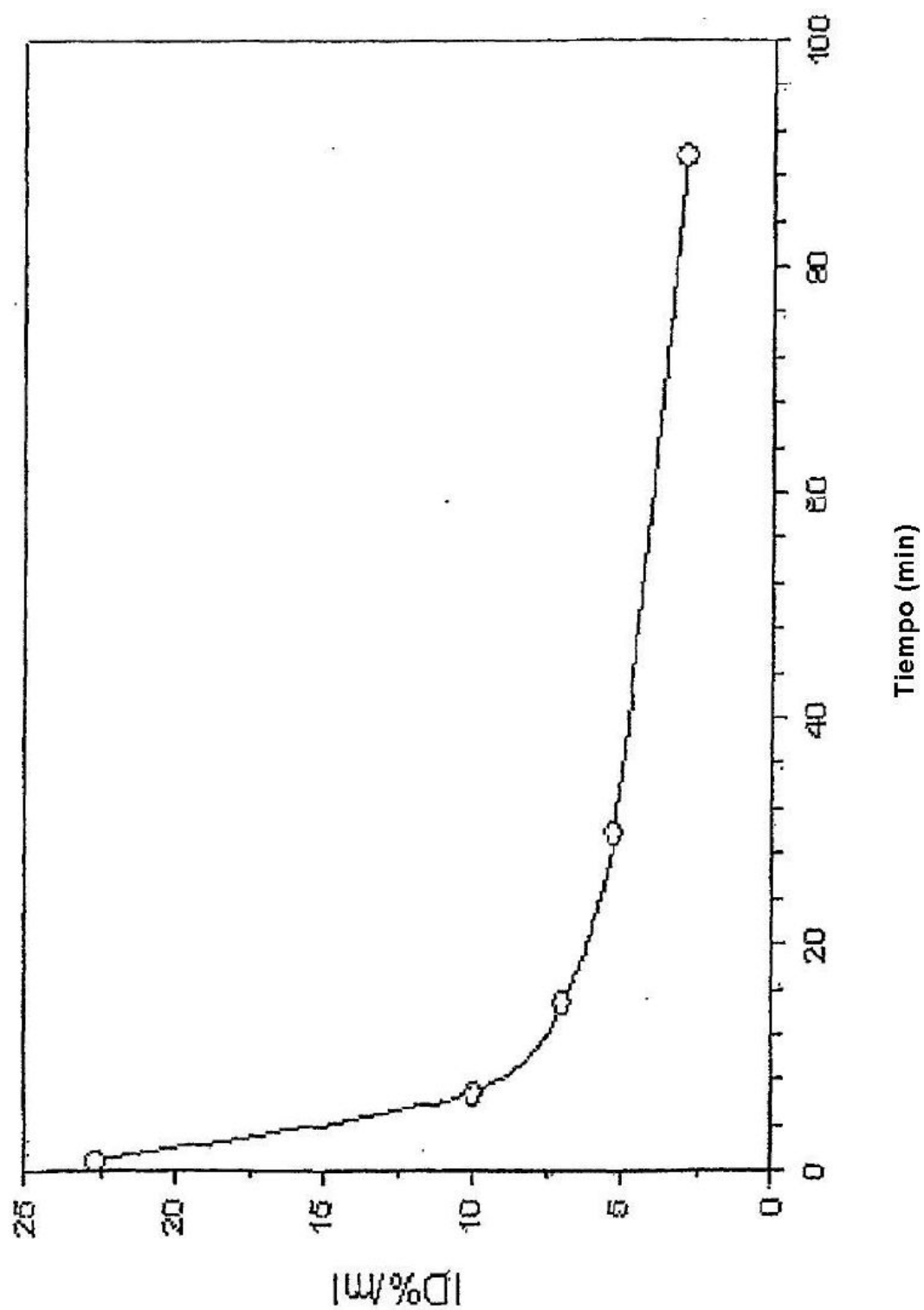


FIG. 18

Cromatogramas SEC de ^{125}I -DX-1235 en plasma de ratón

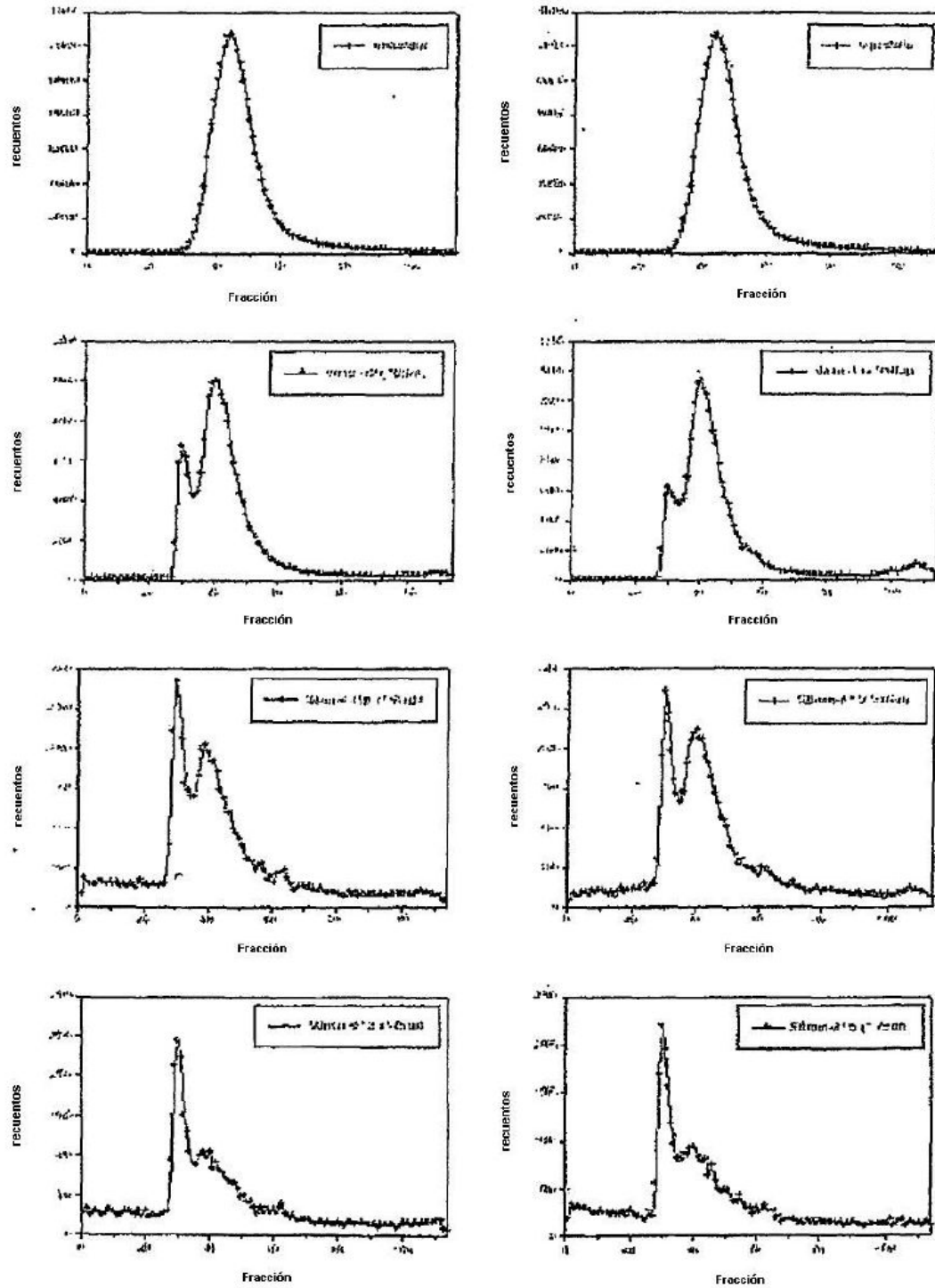


FIG. 19

péptidos de HUVEC y KDR, proliferación, 020613.

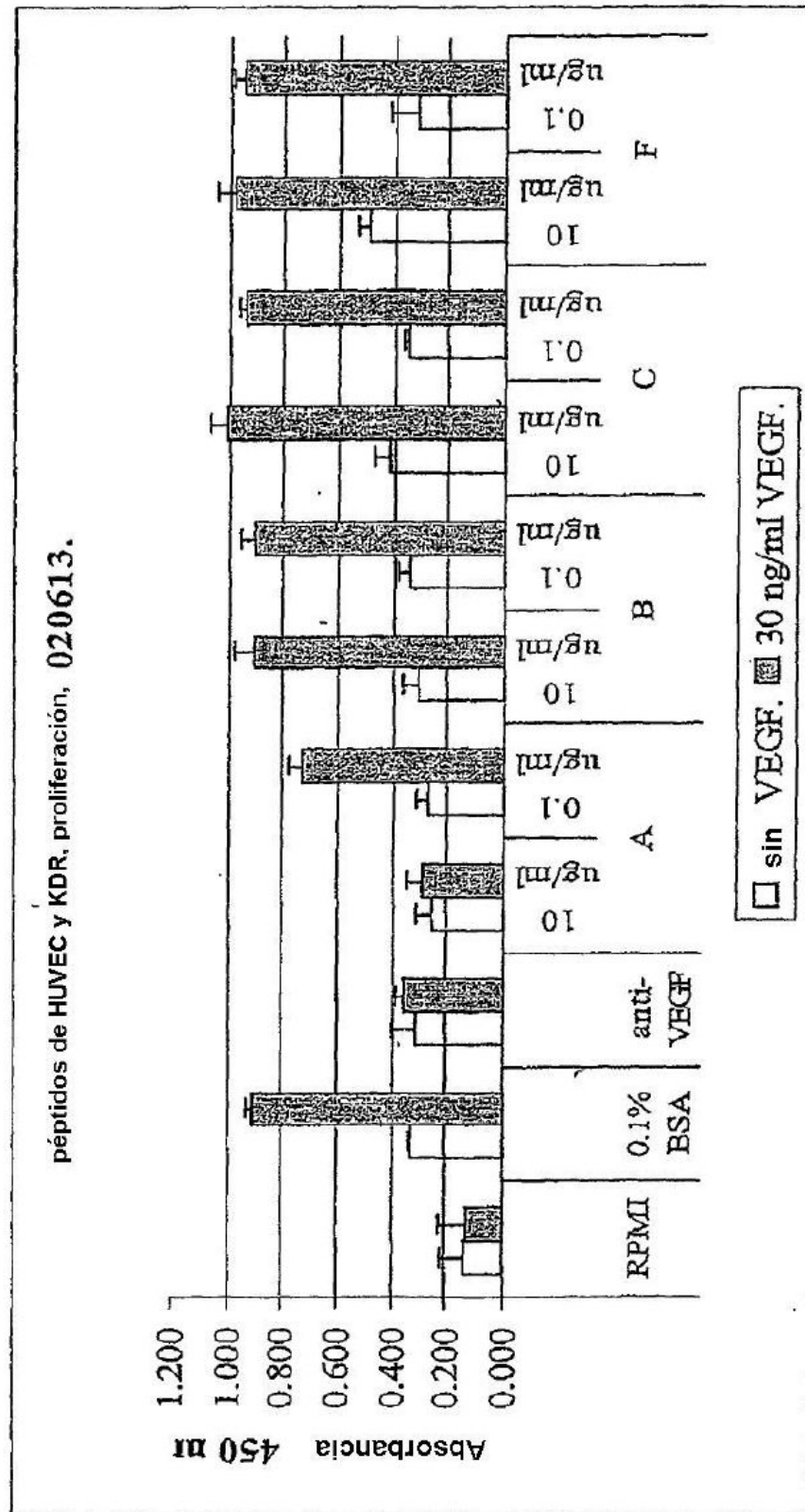


FIG. 20A

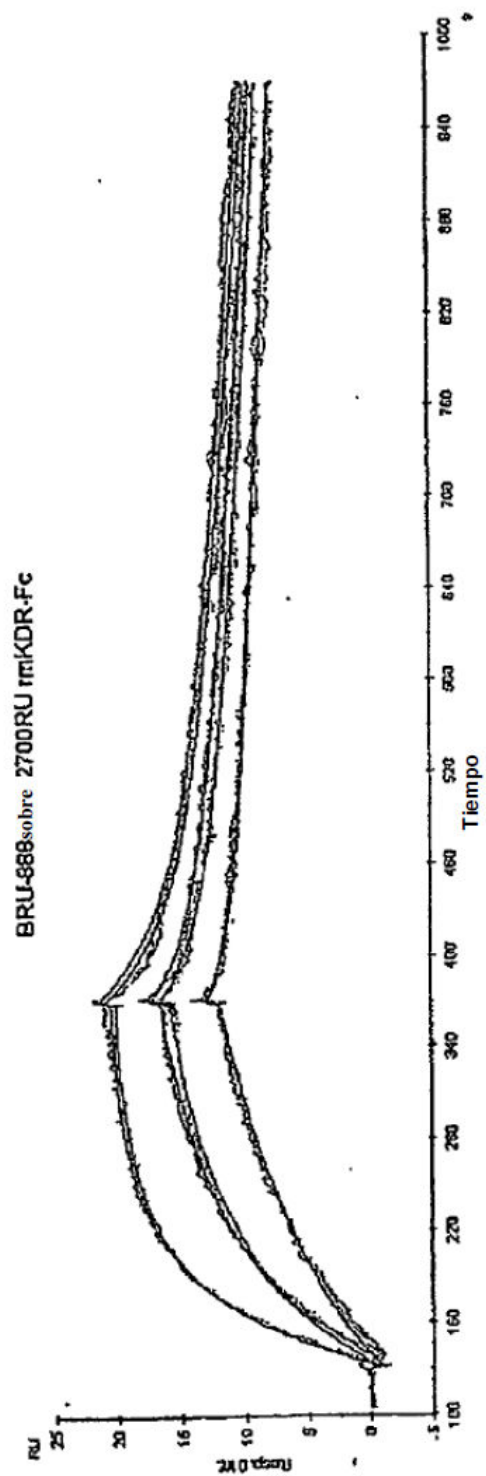


FIG. 20B

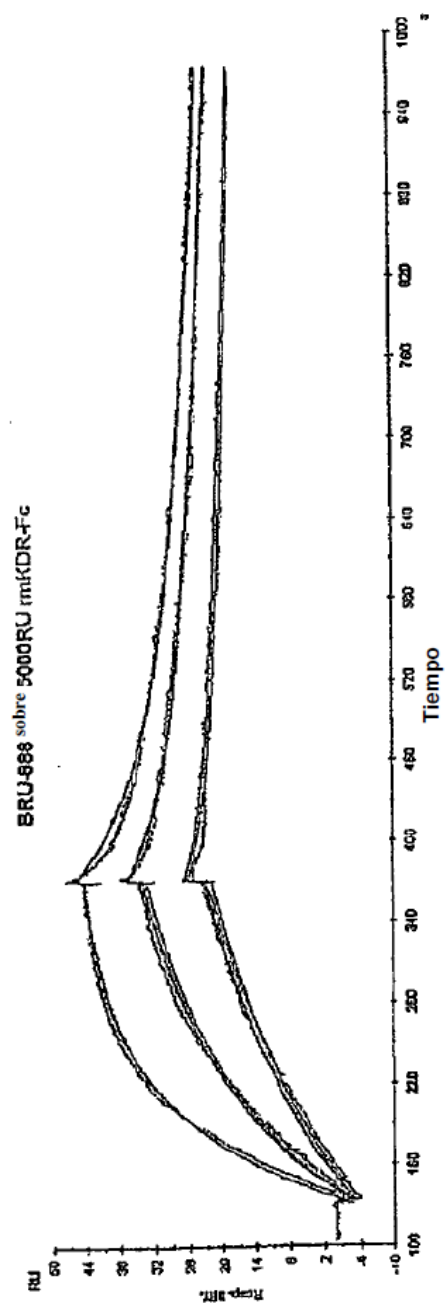


FIG. 21A

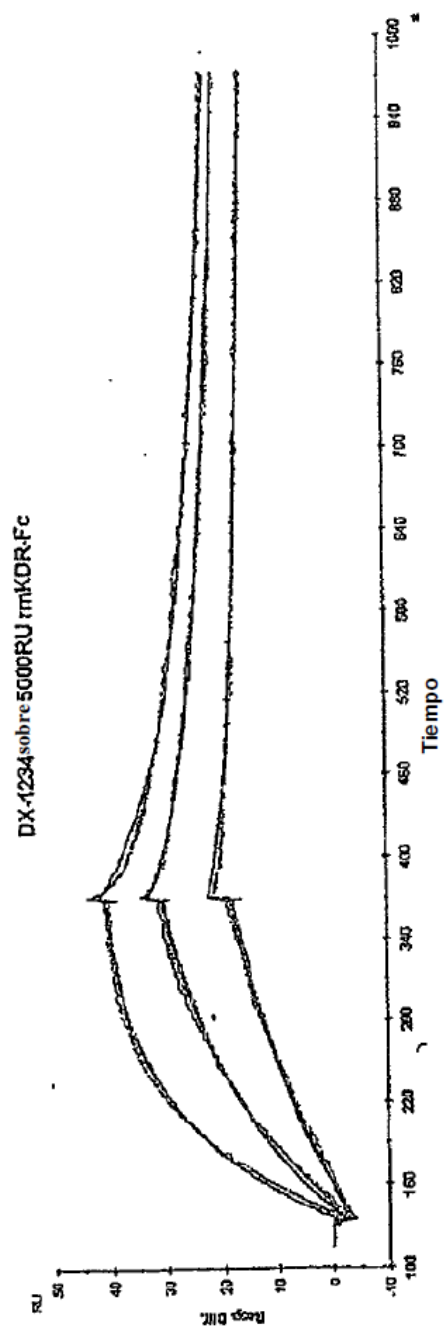


FIG. 21B

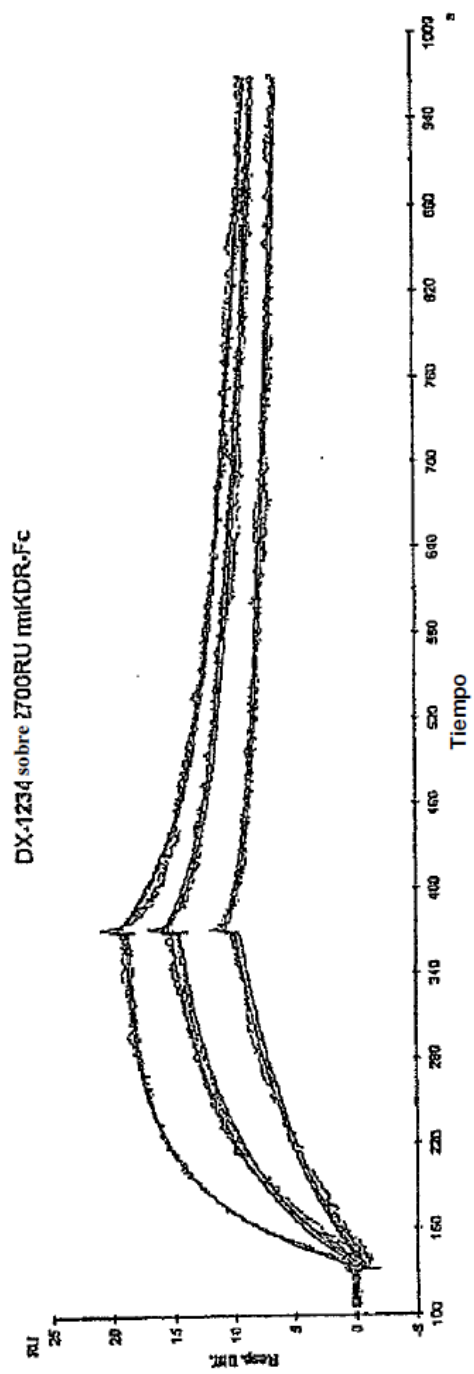


FIG. 22A

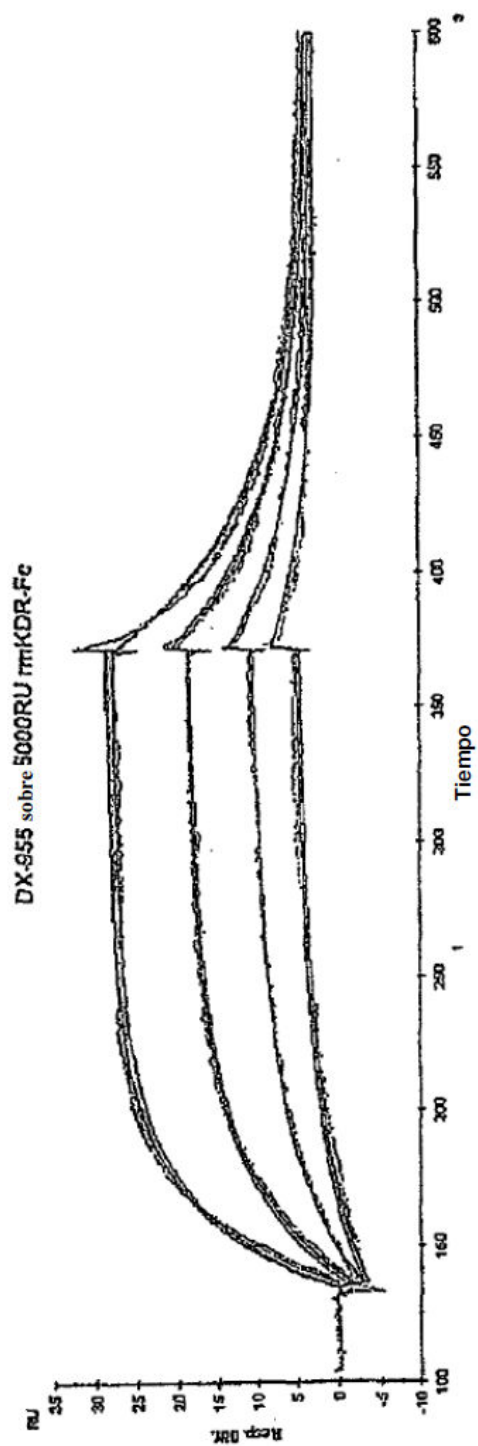


FIG. 22B

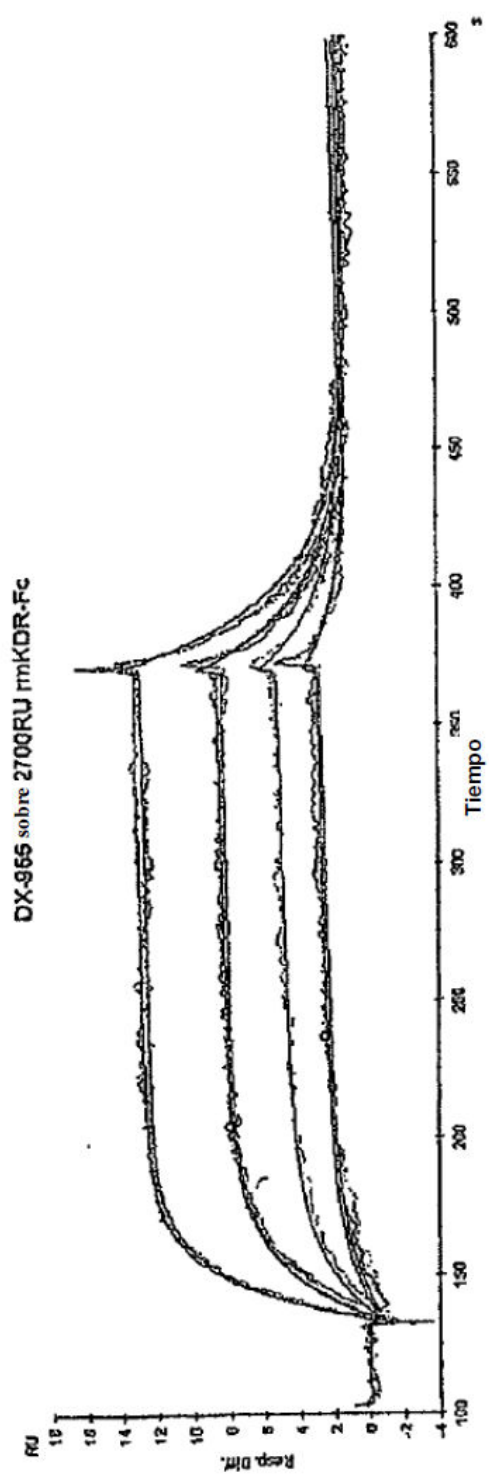


FIG. 23

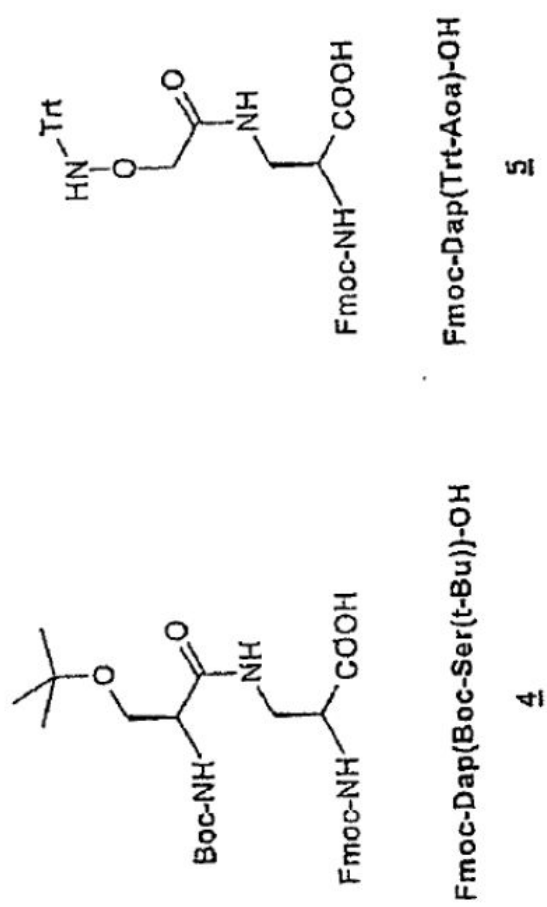
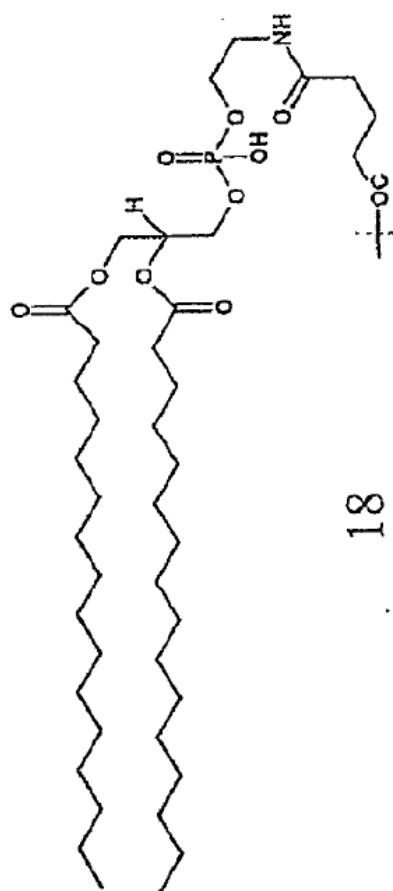
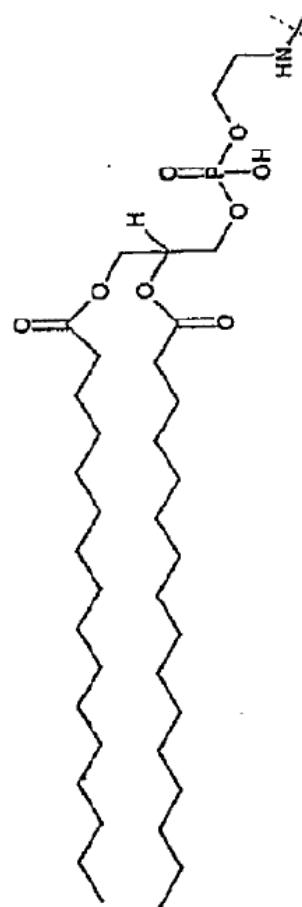


FIG. 24



18



19

FIG. 28

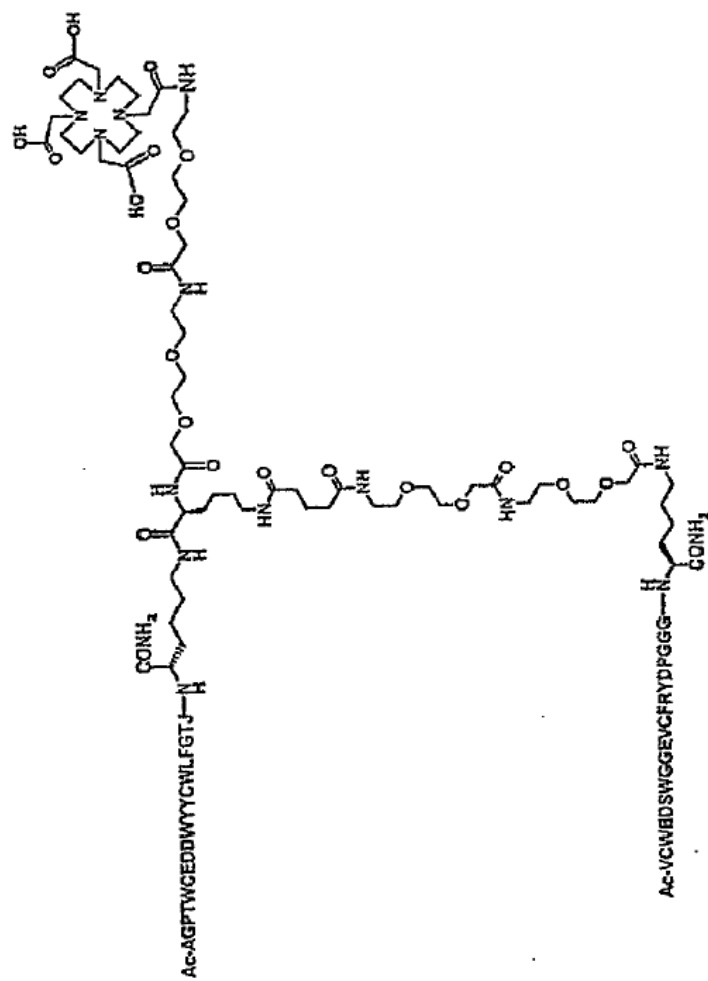


FIG. 30

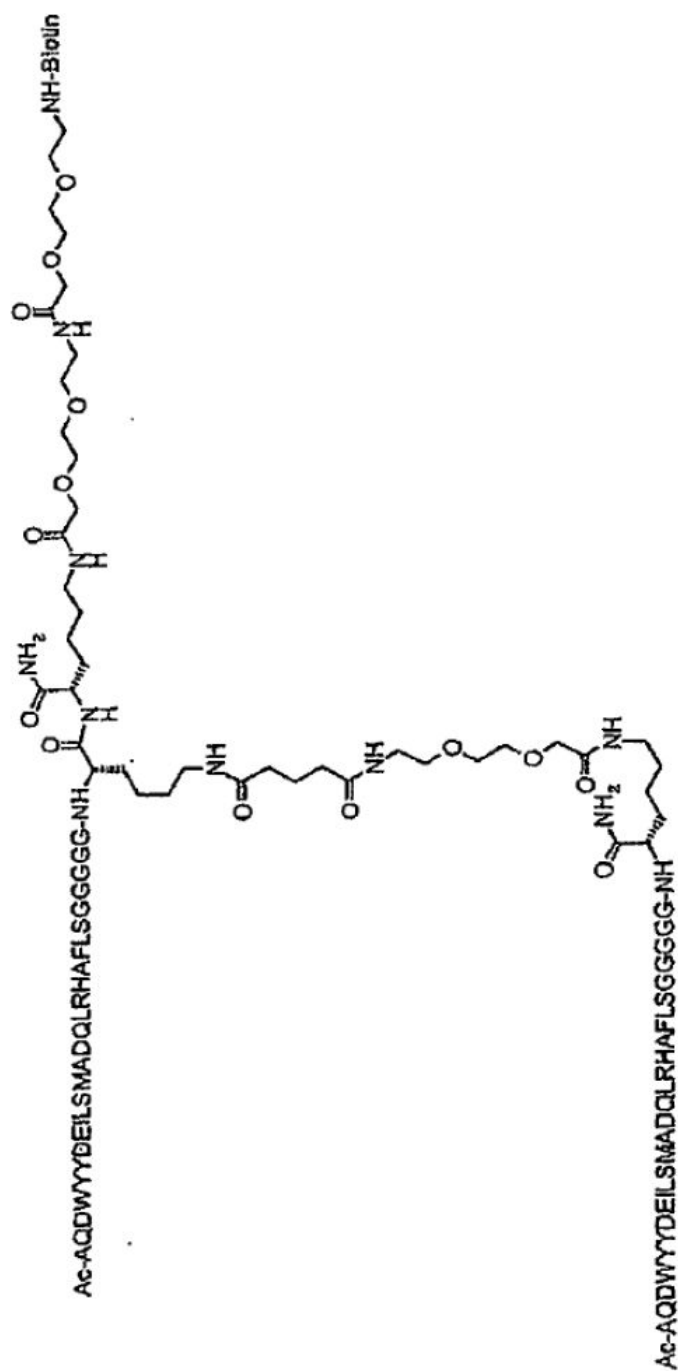


FIG. 31

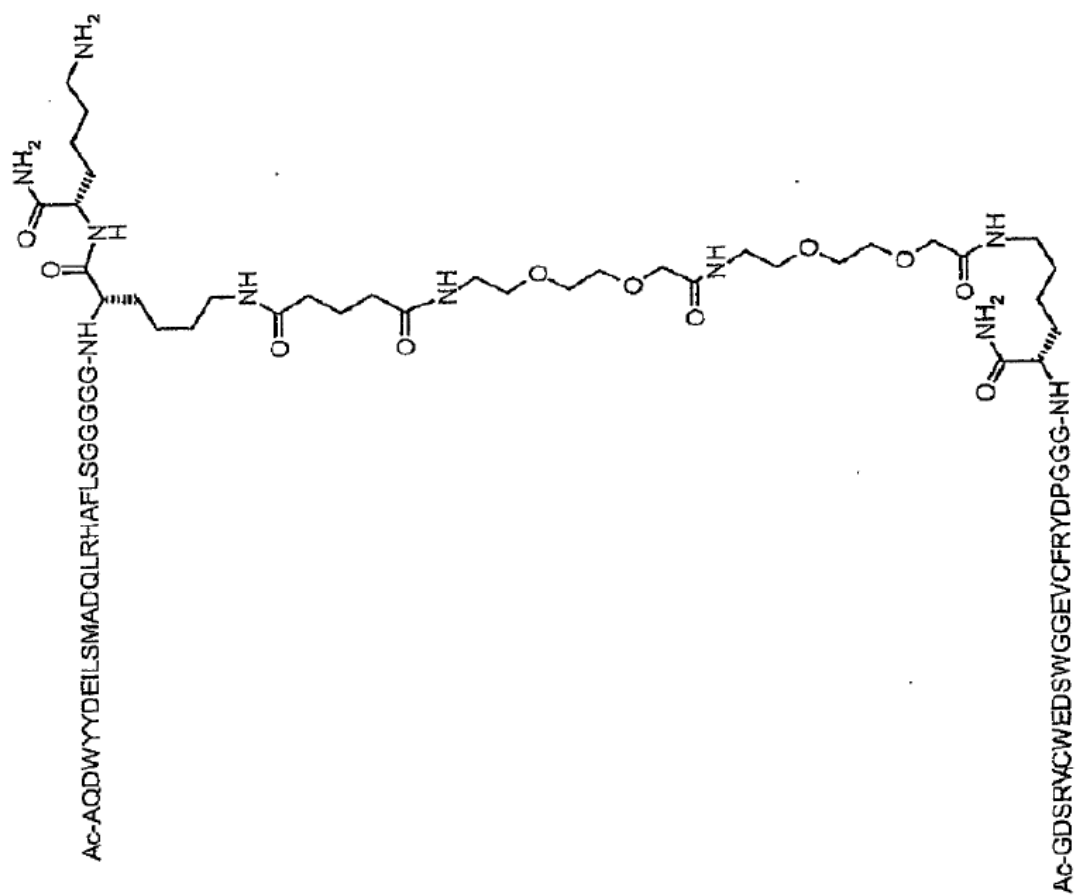
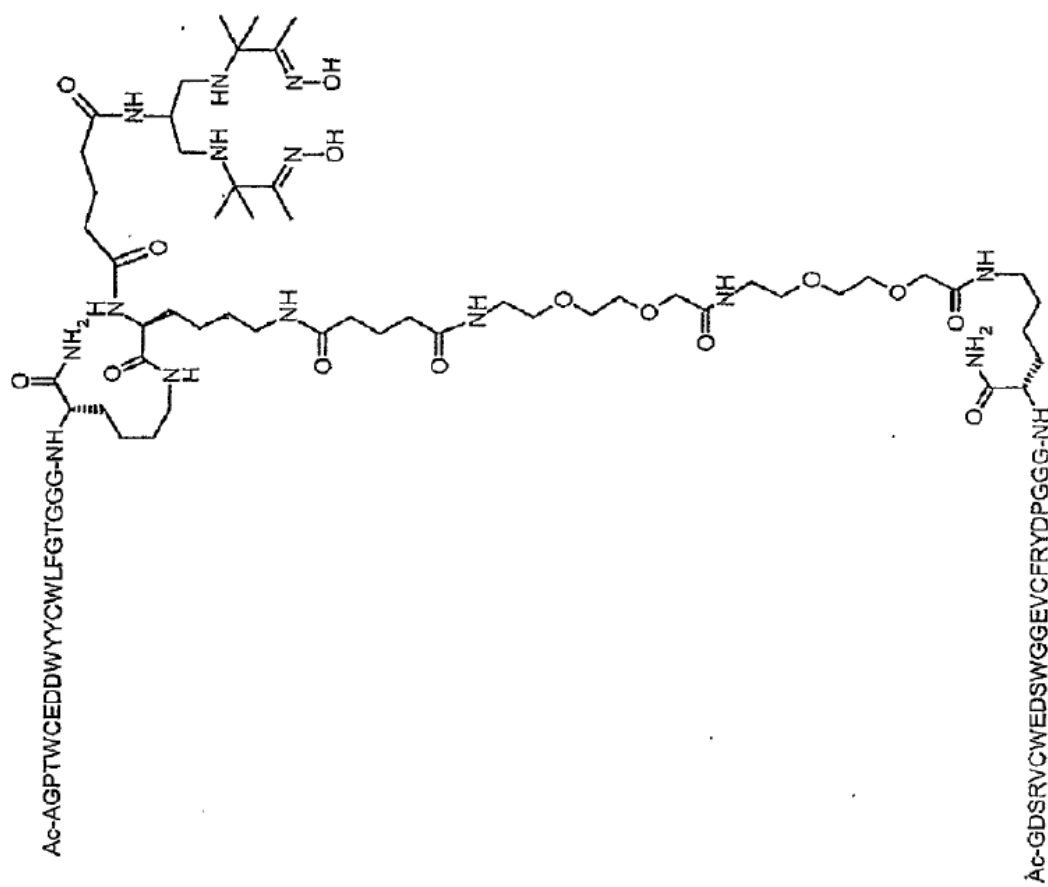


FIG. 32



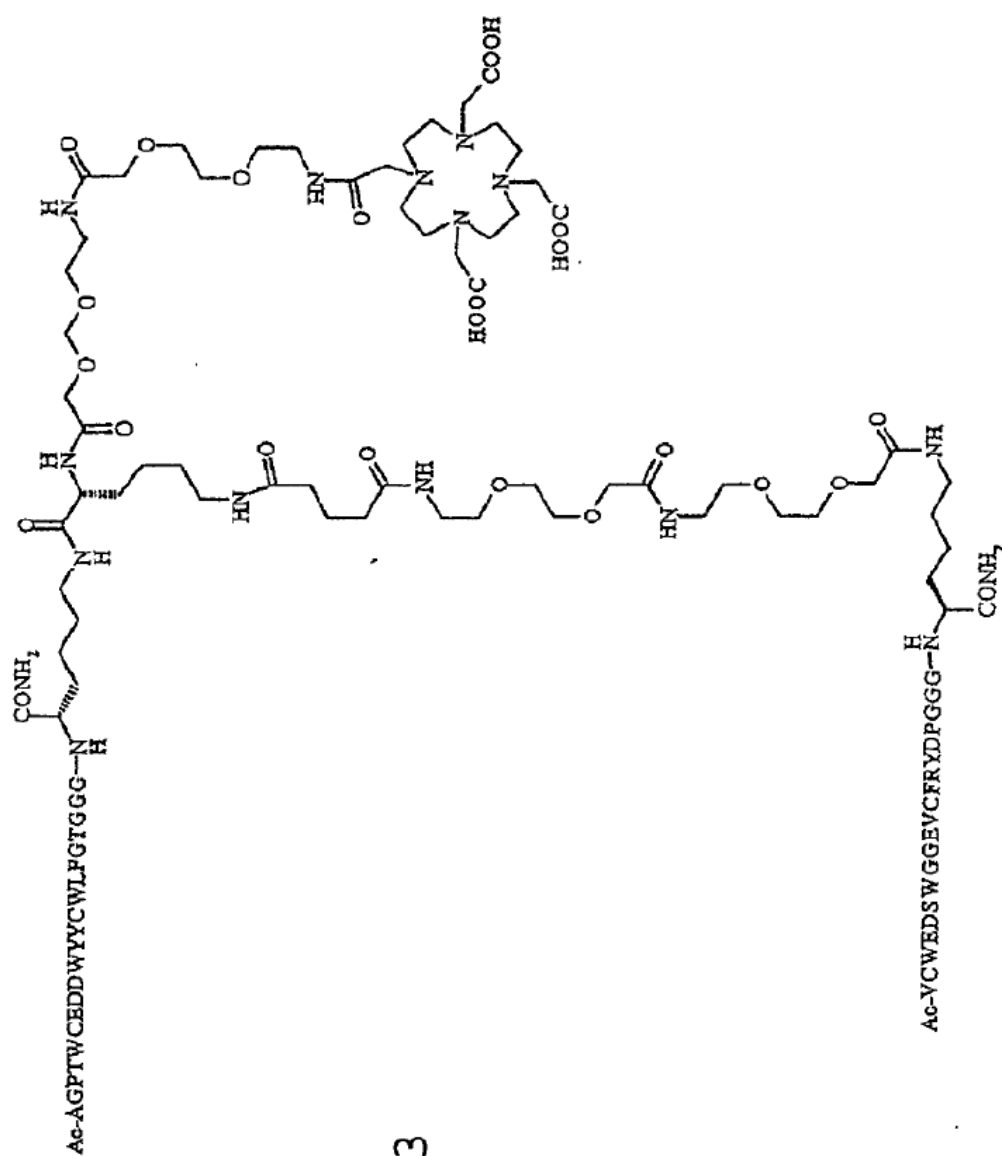


FIG. 33

FIG. 34

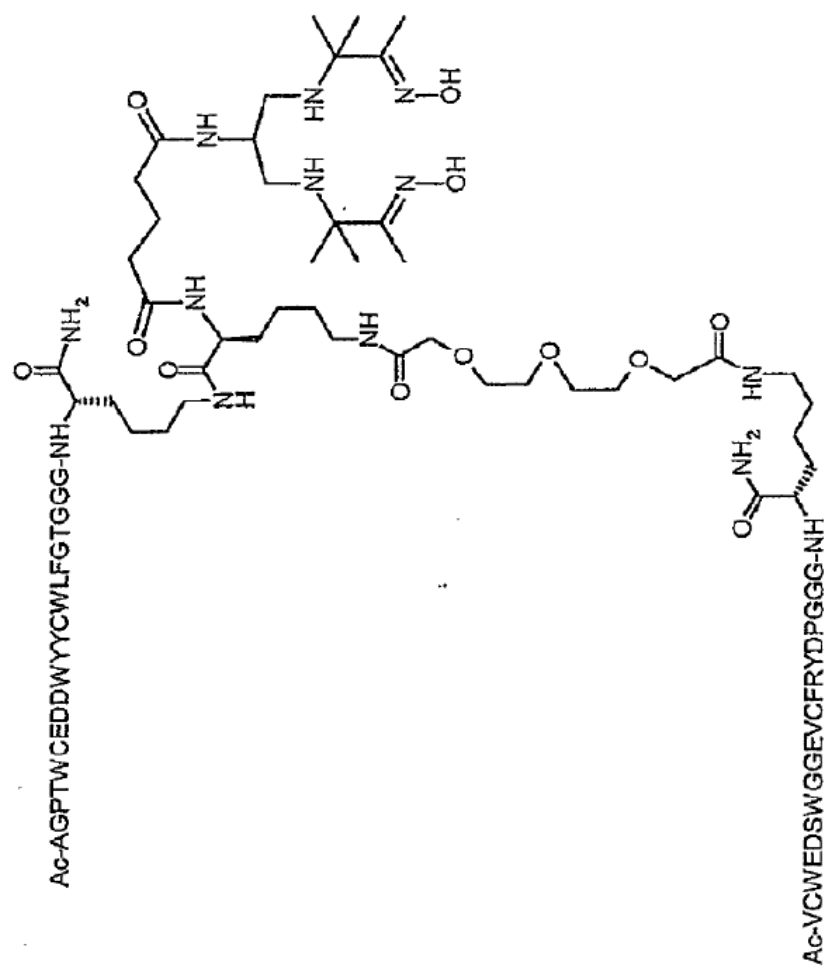
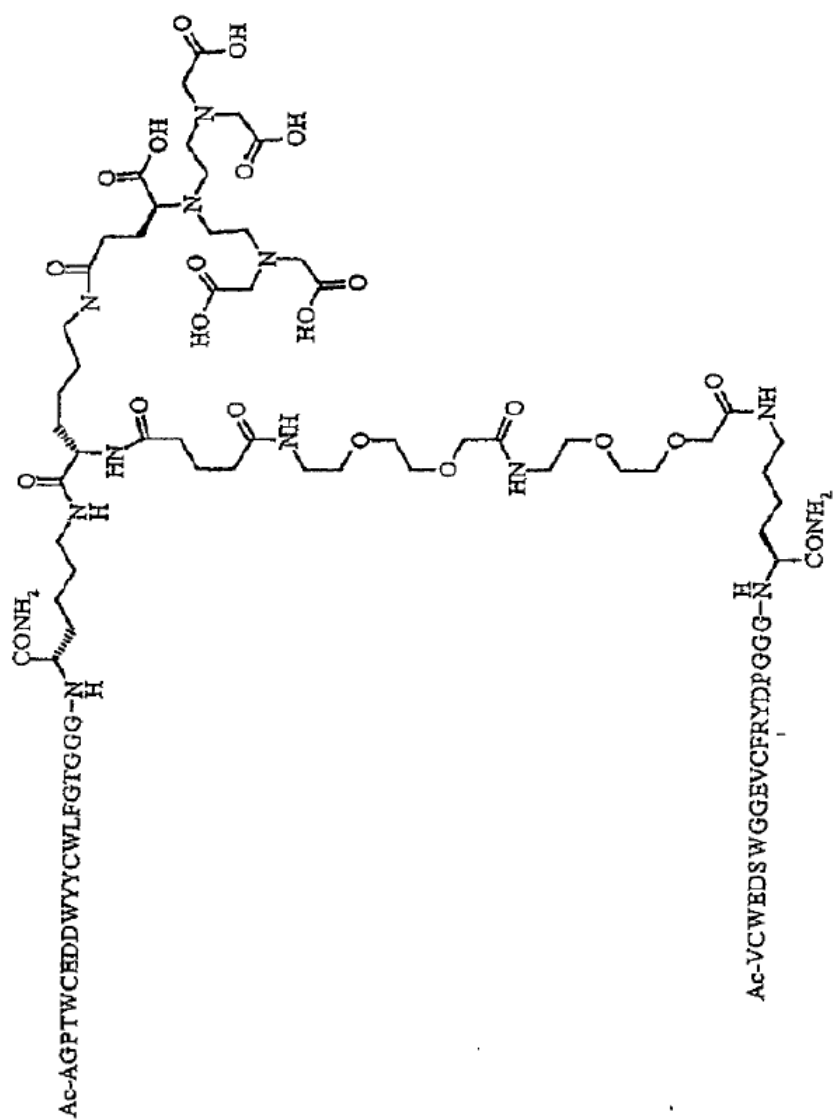


FIG. 35



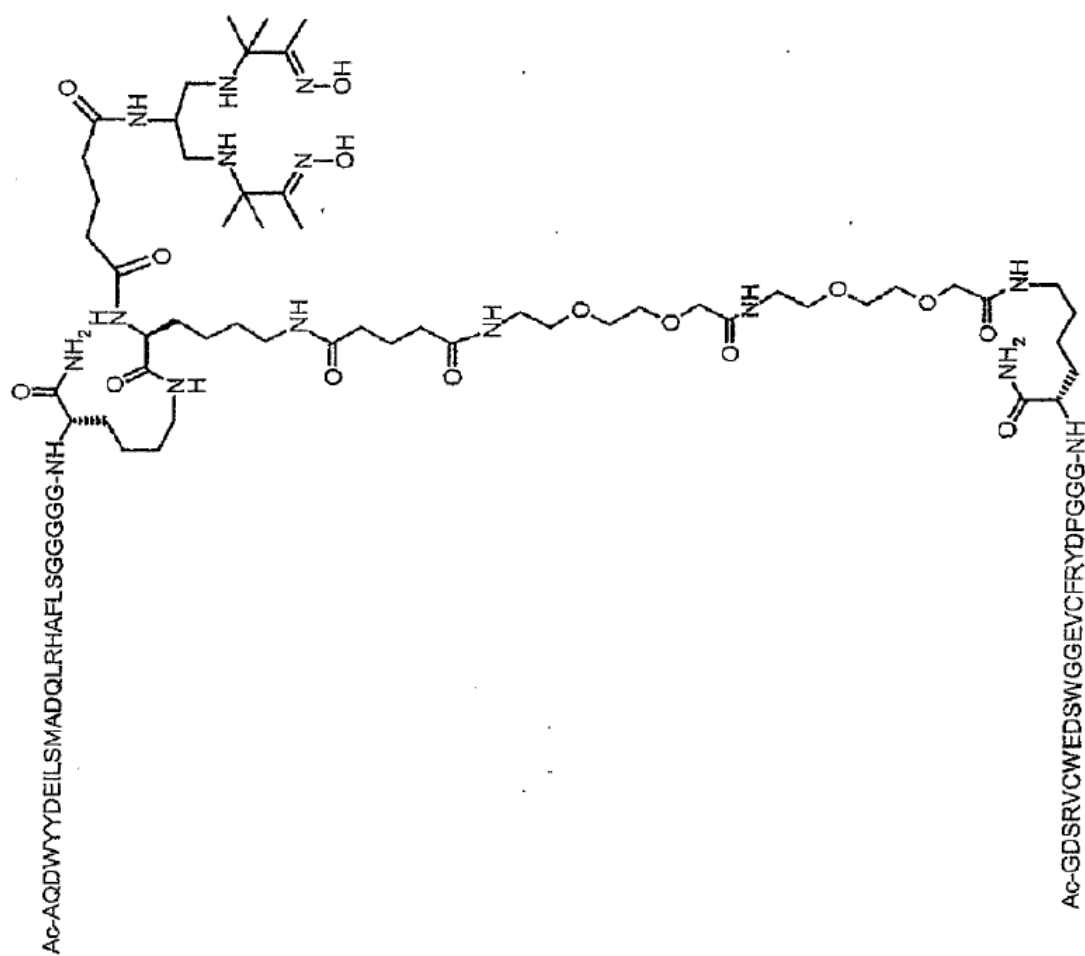


FIG. 36

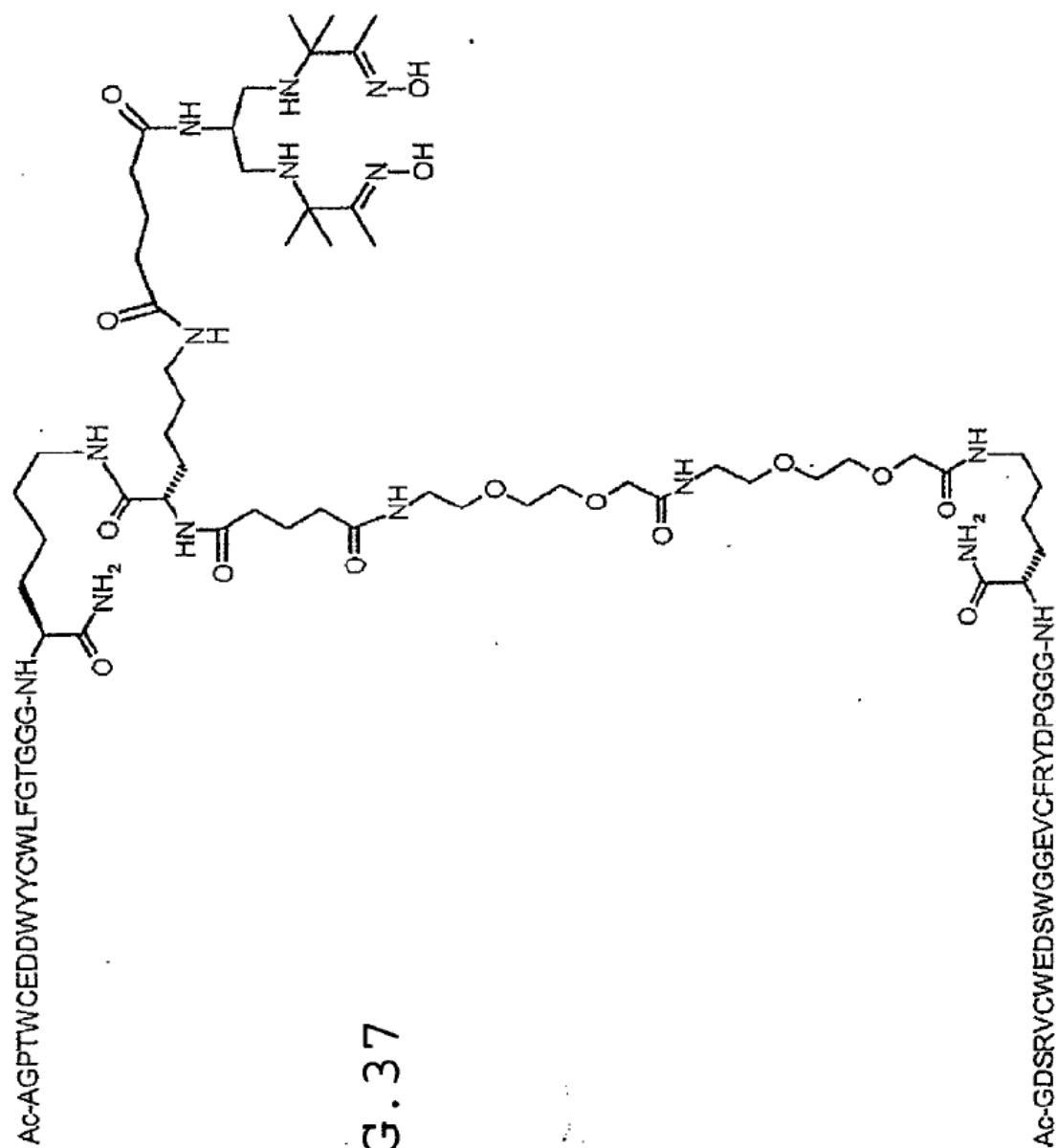


FIG. 37

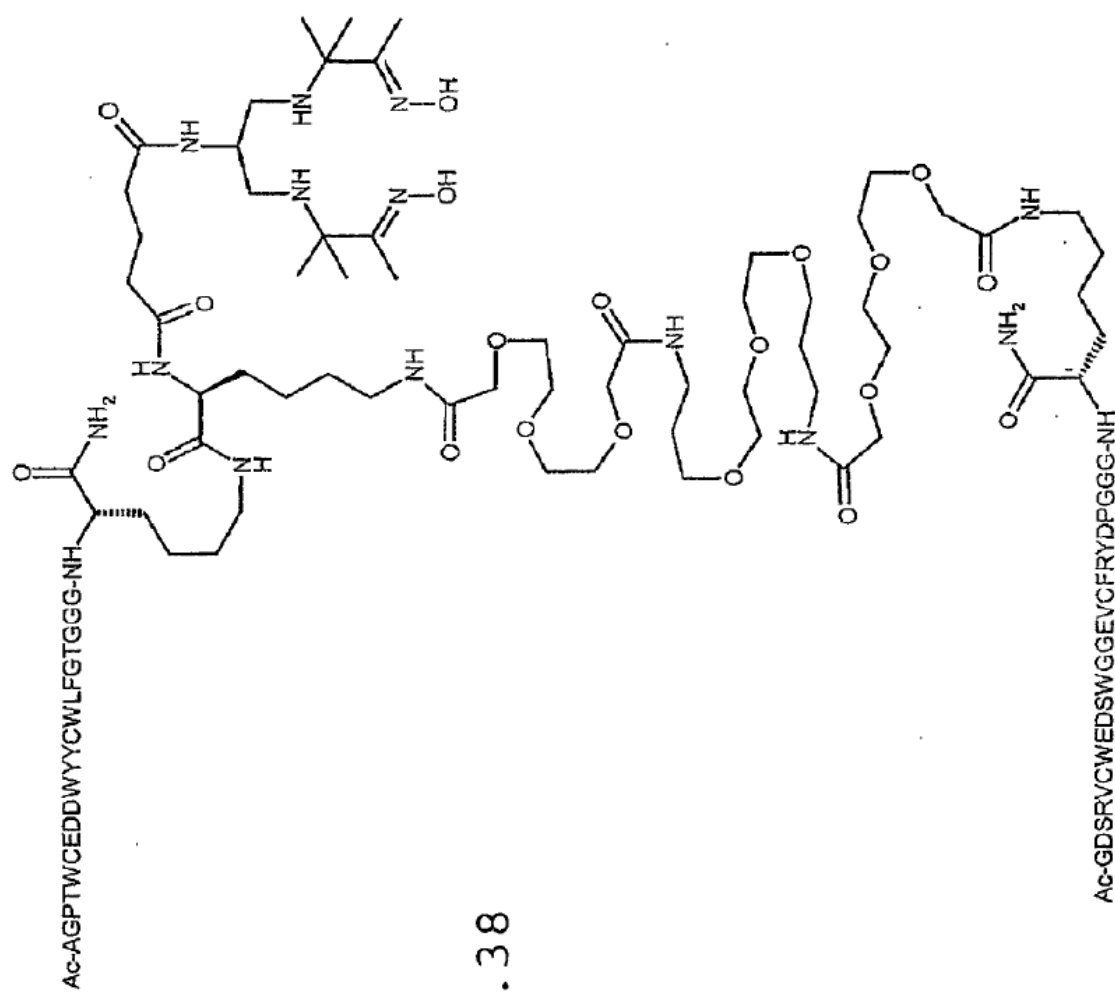


FIG. 38

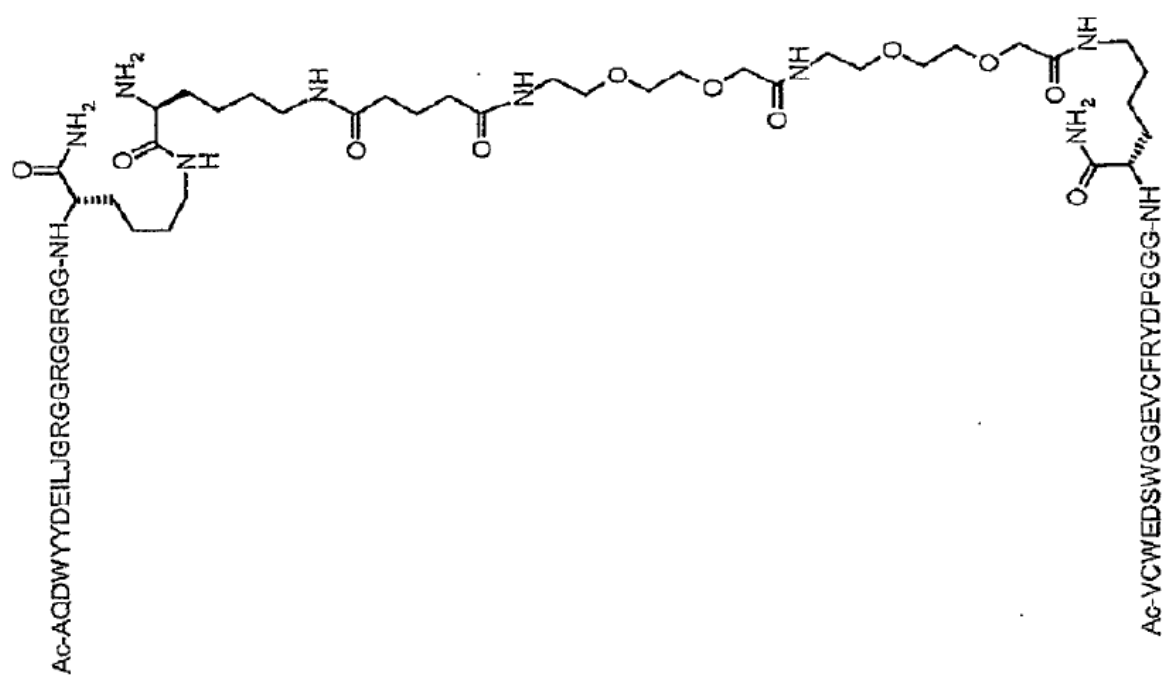


FIG. 39

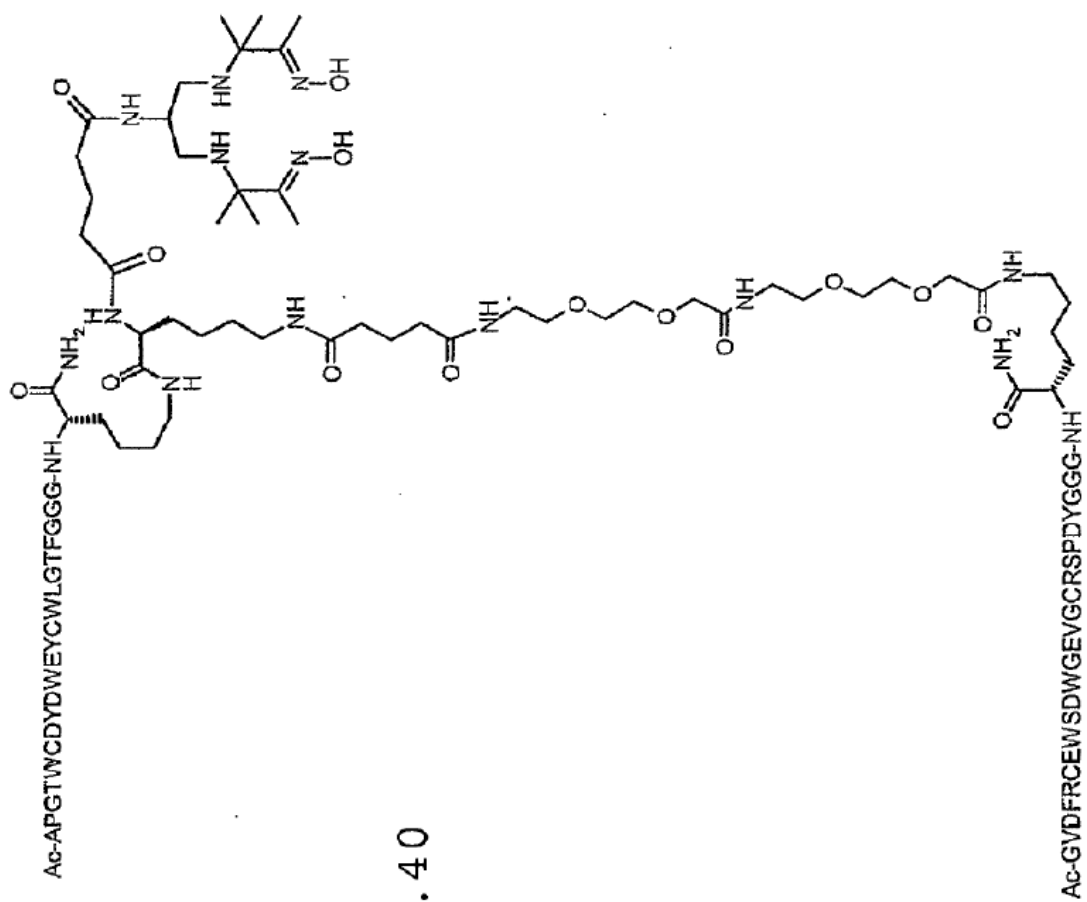


FIG. 40

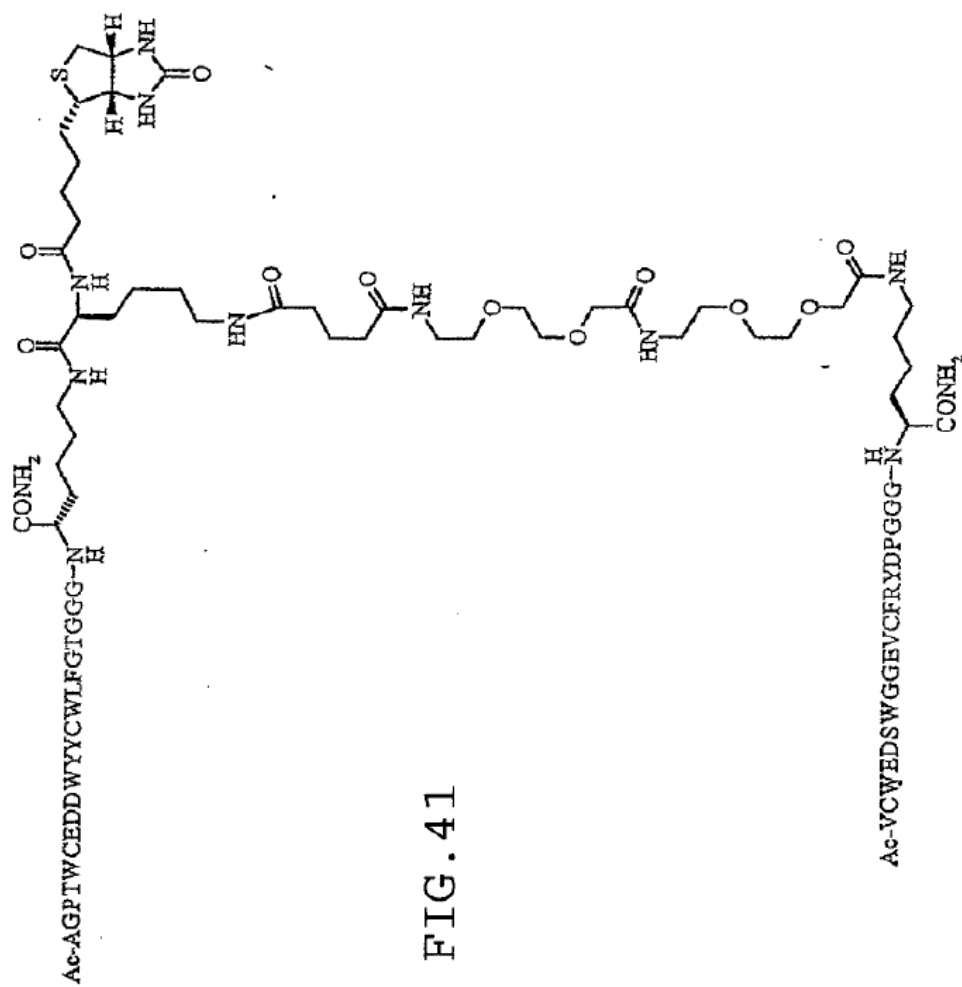


FIG. 42

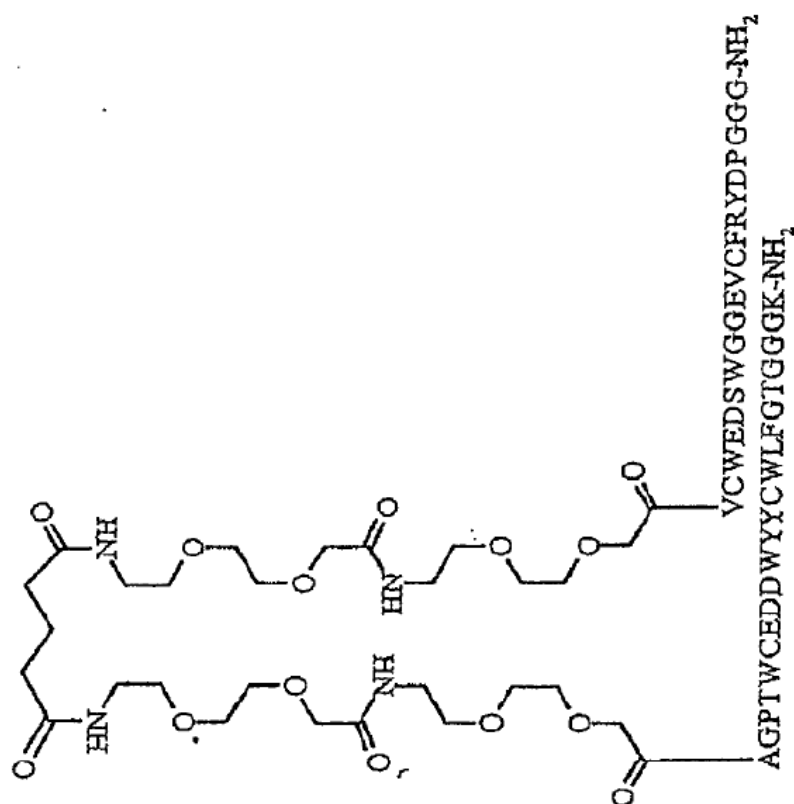


FIG. 43

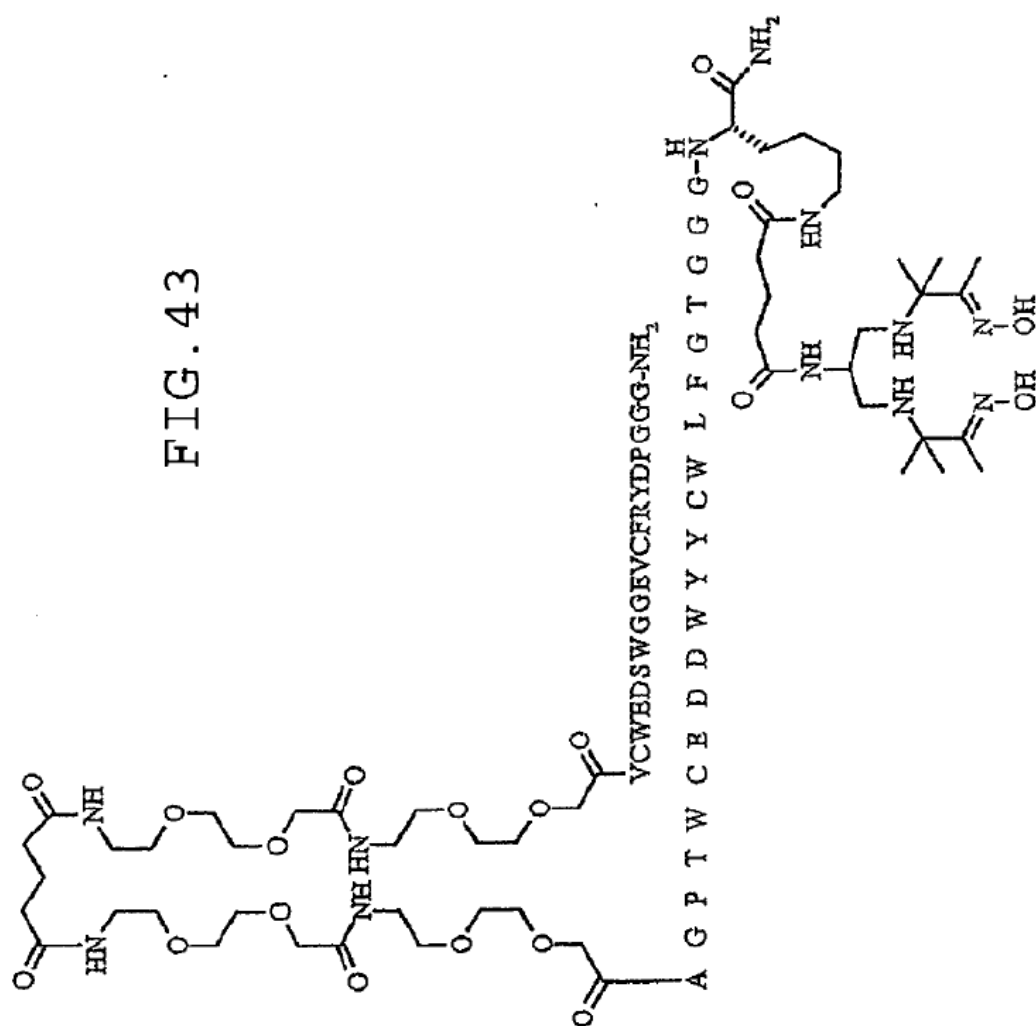
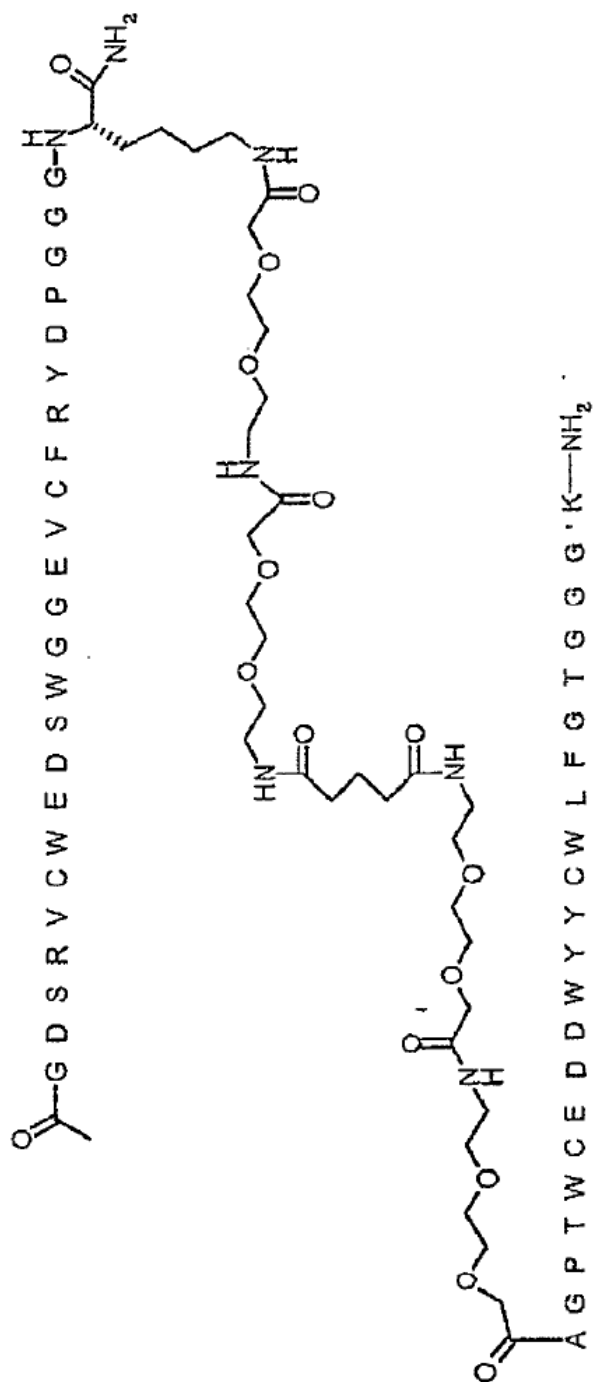


FIG. 44



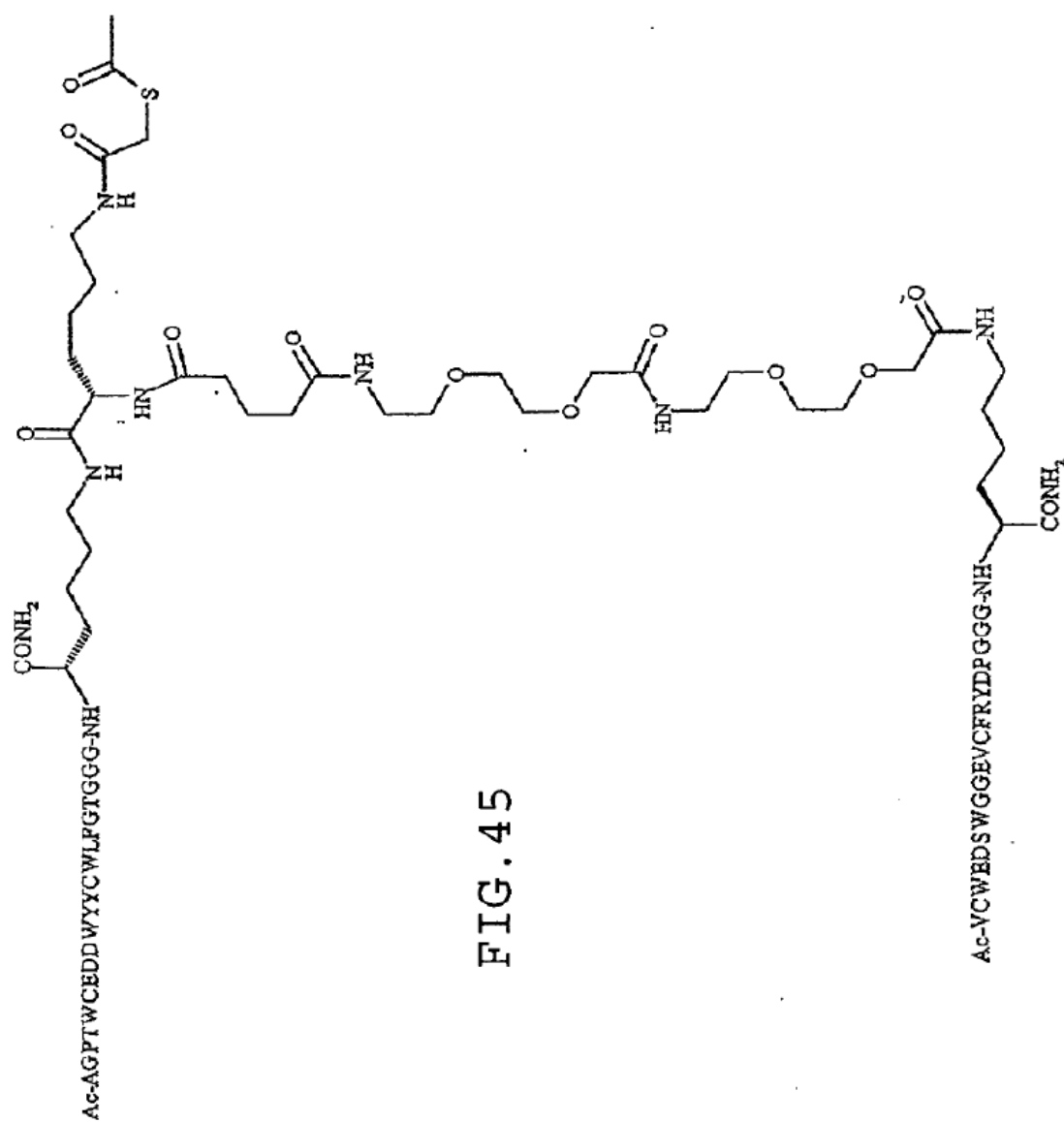
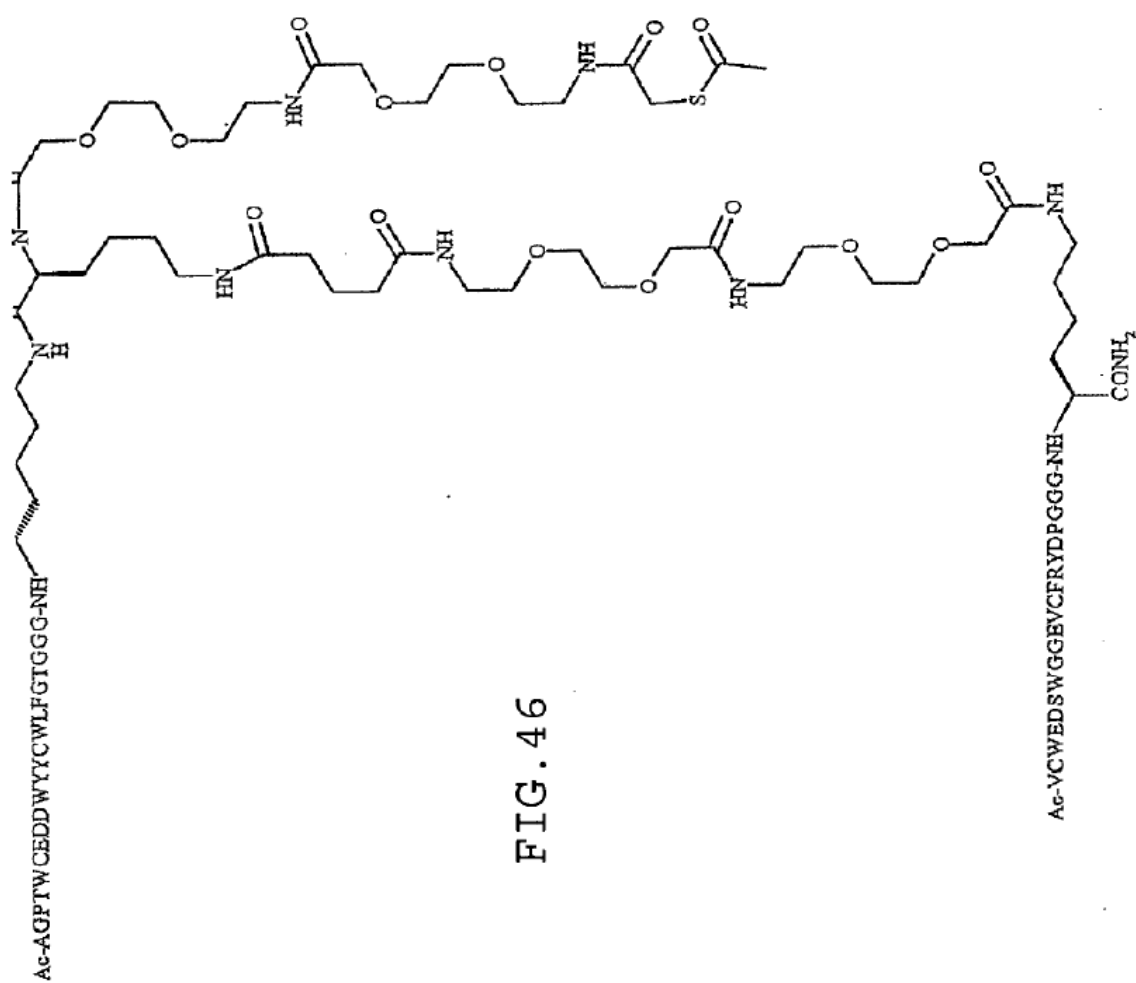


FIG. 45



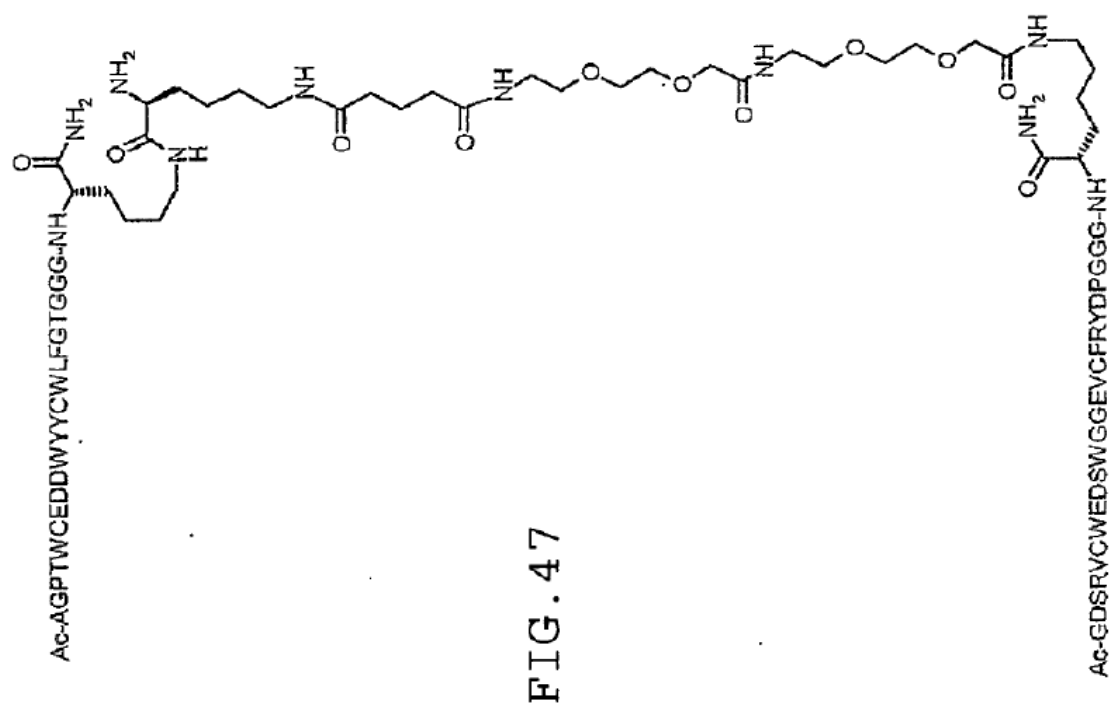


FIG. 47

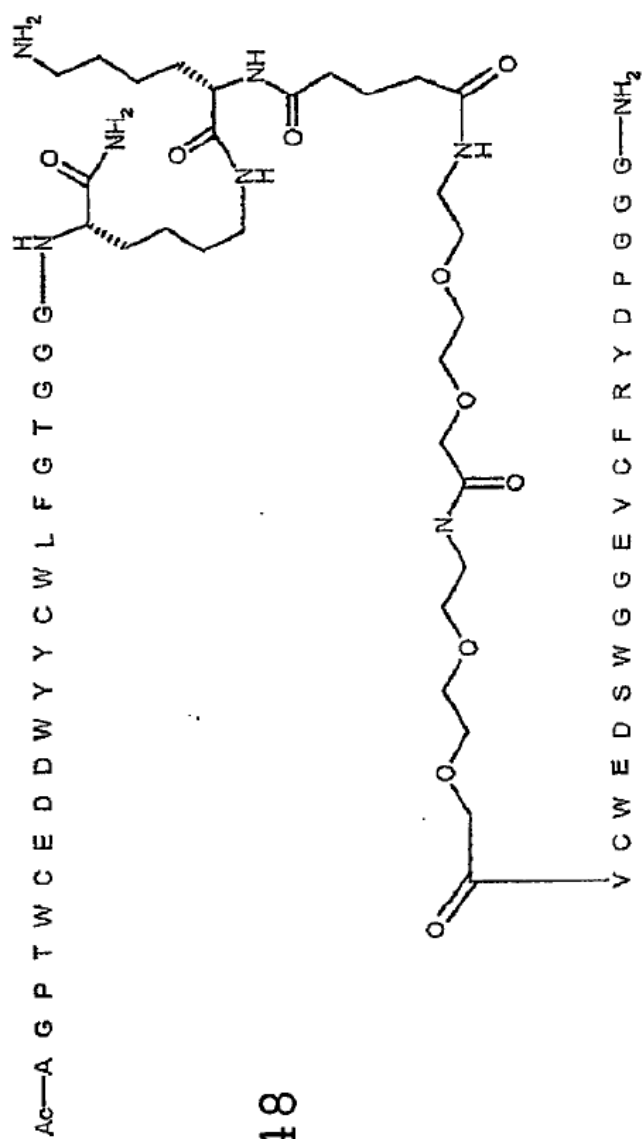


FIG. 48

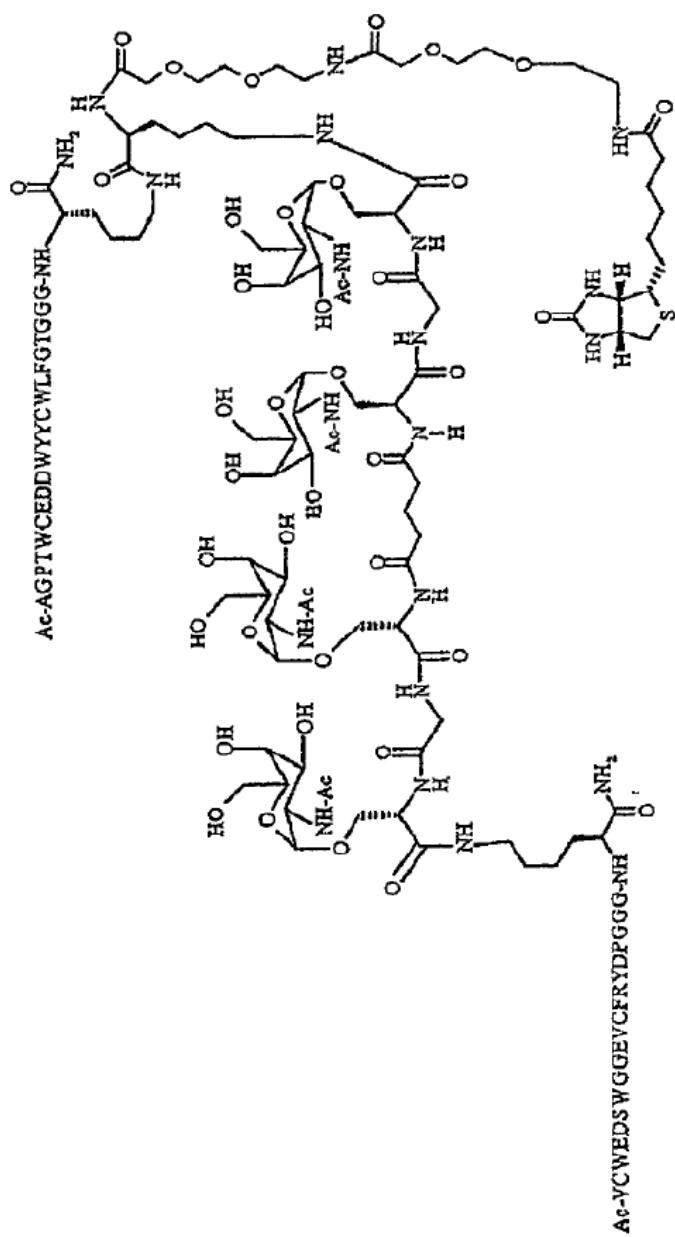


FIG. 49

FIG. 50

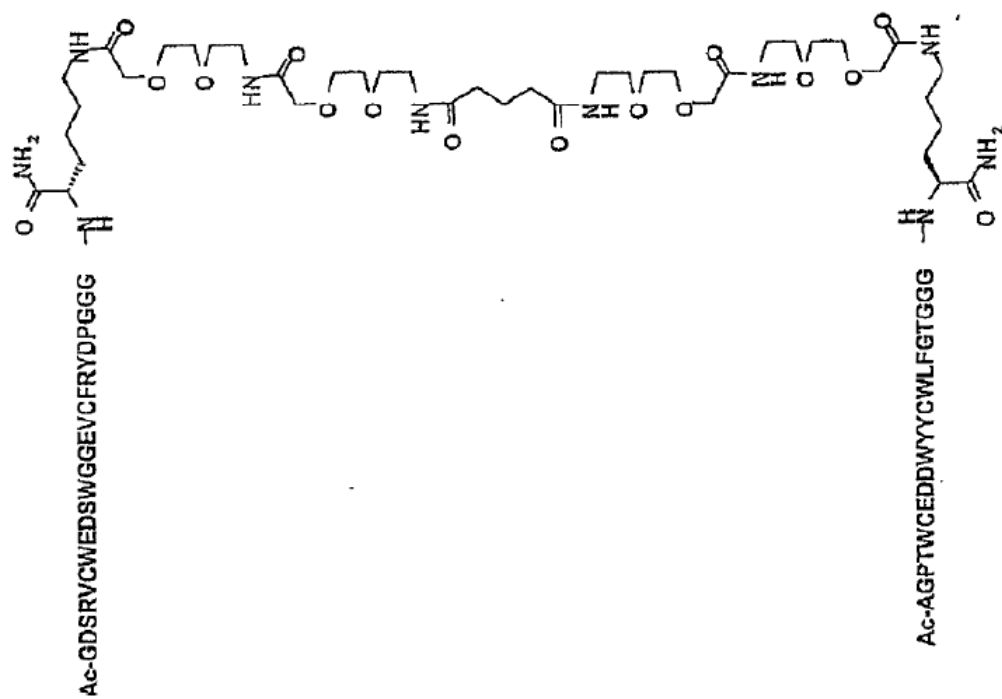


FIG. 51

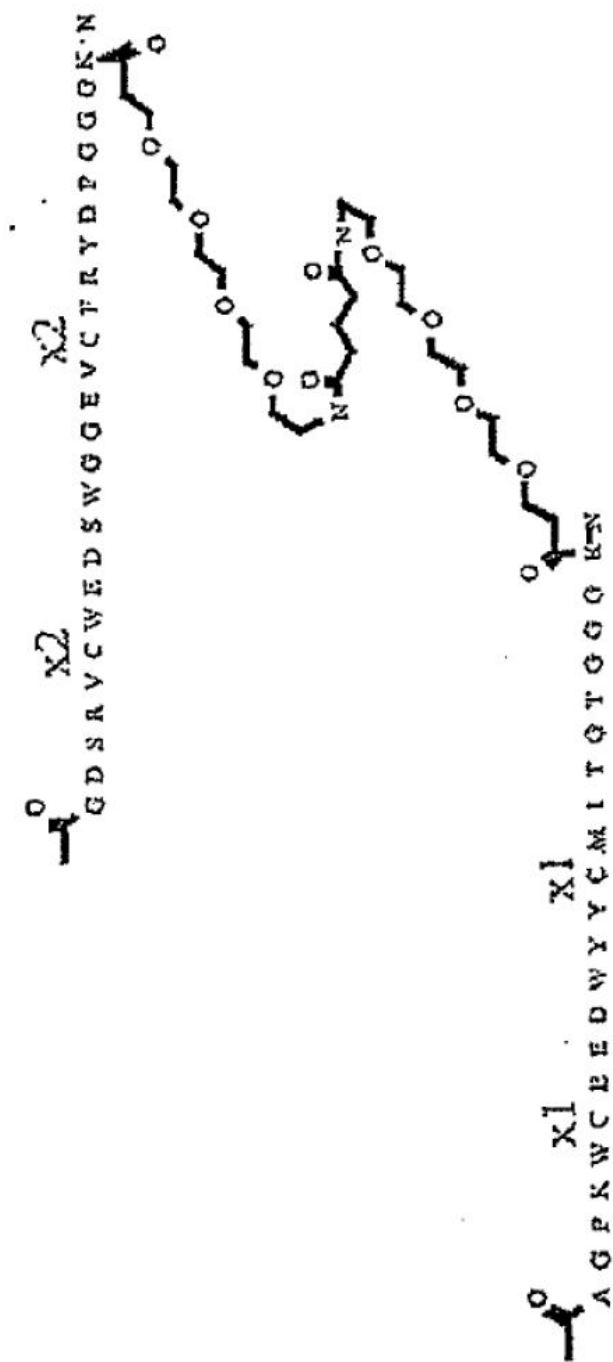


FIG. 52

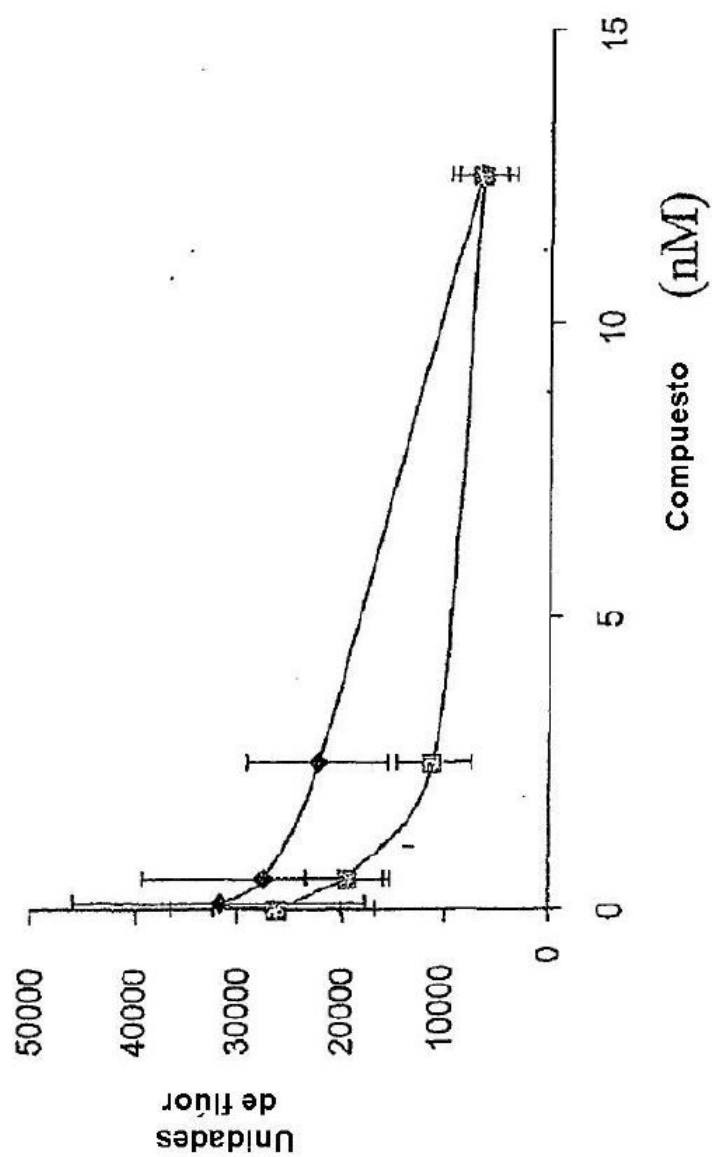


FIG. 53

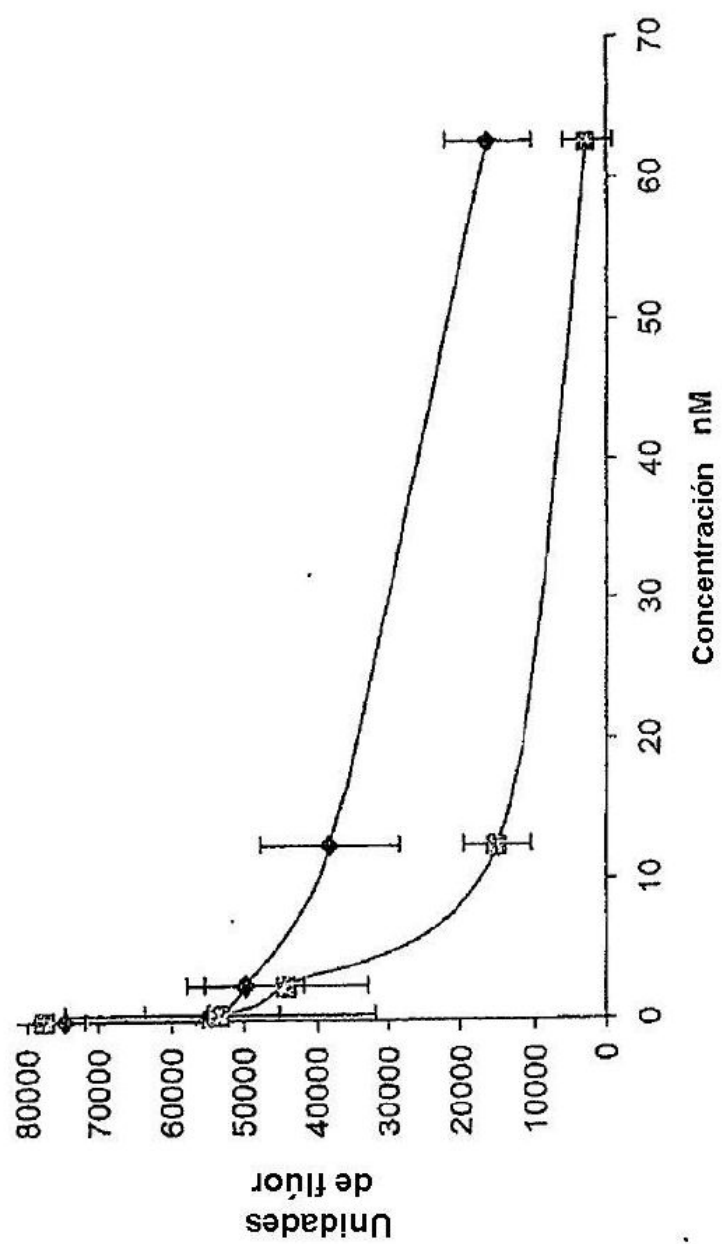
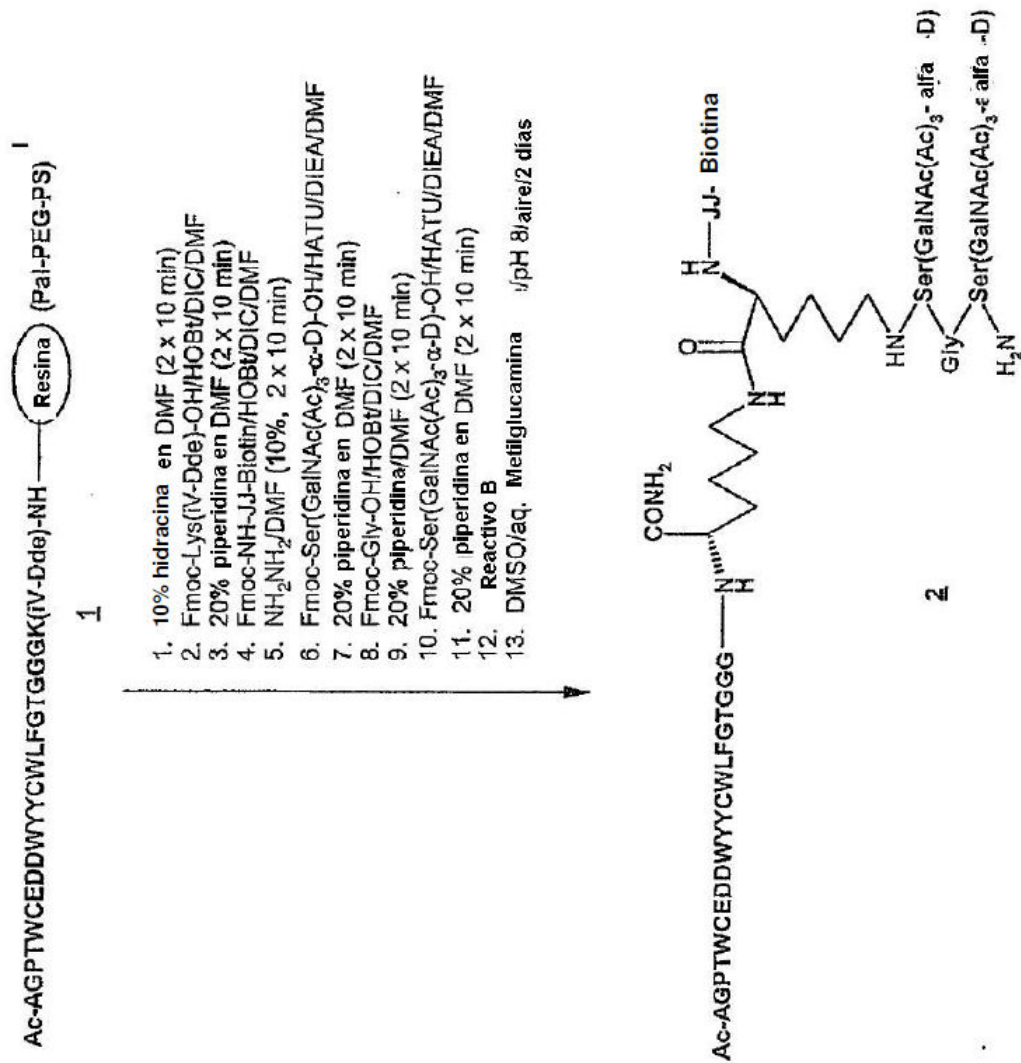


FIG. 54



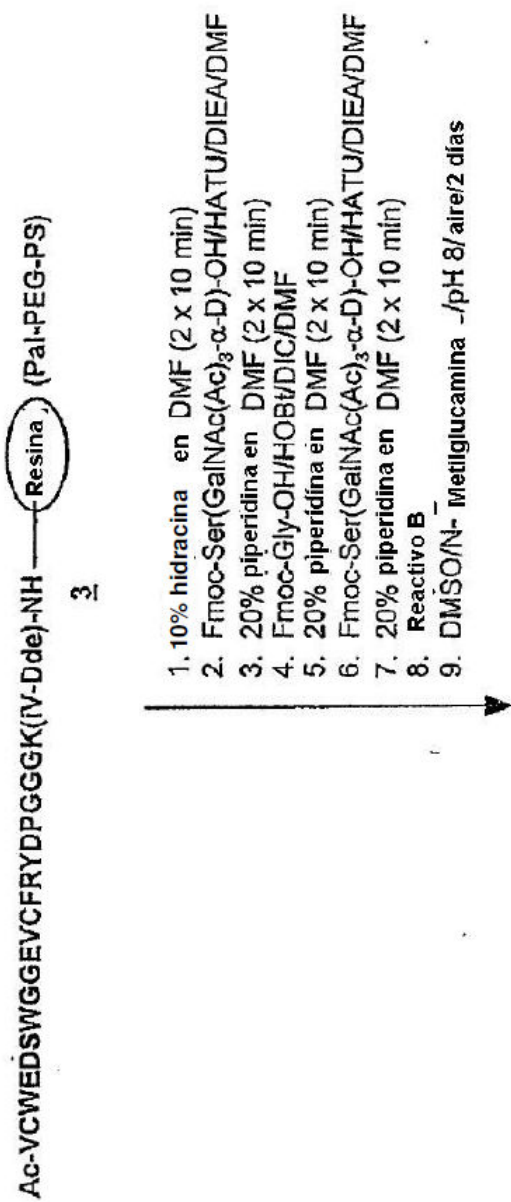
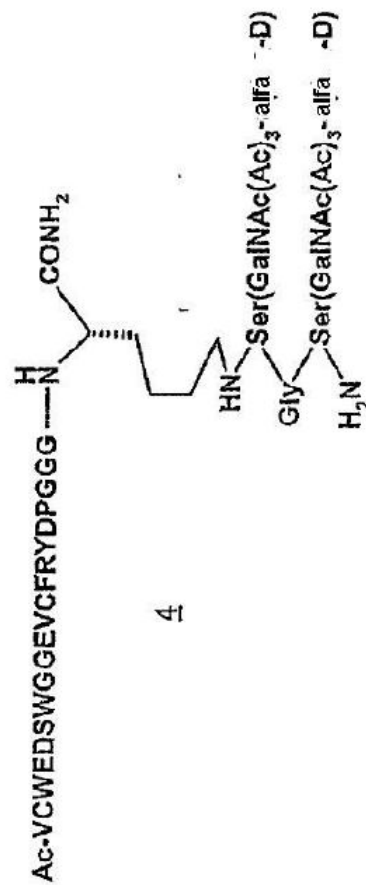


FIG. 55



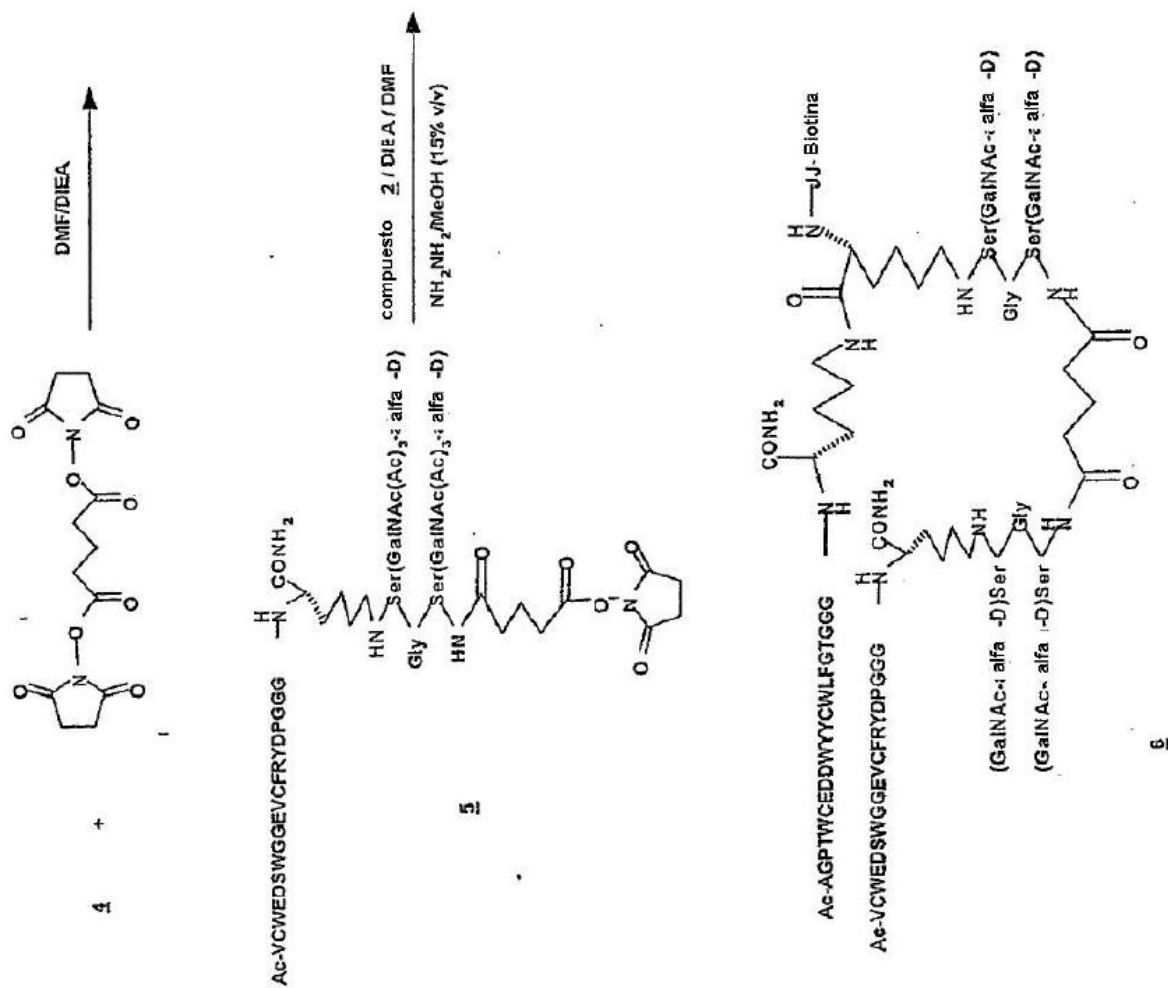


FIG. 56

Explicación de las abreviaturas: Otras abreviaturas: BOA = (S)-2-[Bis-[2-(bis-carboximetilamino)-etil]-amino]-pentanodioic-4-oilo; Glut= glutarilo o 1,5-pentanodioilo, SATA= S-acetil-alfa-tioacetilo, GalNac (Ac)3-alfa-D= O-Betal[2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil-alfa-D-galatosipiranosilo]-L-serinilo, iV-Dde= 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)-3-metilbutilo, 5CF= 5-carboxifluoresceinilo; J= 3,6-dioxa-8-aminooctanoilo, Dpr= 2,3-diaminopropanoilo, Adca3) 3B,5a,7a,12a)-3-amino-7,12-dihidroxicolan-24-oilo, PnAO6) 4-{2-(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etilamino)-1-[(2-hidroxiimino-1,1-dimetil-etilamino)-metil]-etilcarbamoil)-butanoilo.

Secuencia del compuesto/Estructura (secuencia parental en rojo)	¿Obtenido? S/N	SEQ ID NO	Datos de EM
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(Tc-Chelator)-NH ₂		277	
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(PnAO6-NH-(O=C(CH ₂) ₂ C(=O)-J)-NH ₂	Y	277	1611.7 [M-2H] ² /2, 1074.4 [M-3H] ³
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH ₂		277	
H ₂ N-JIK(iV-Dde)-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGG-NH ₂	Y	277	1501.5 [M-2H] ²
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(BOA-K)-NH ₂	Y	277	1561.9 [M-3H] ³
H ₂ N-JIAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(iV-Dde)-NH ₂	Y	277	1501.5 [M-2H] ² , 1000.8 [M-3H] ³
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH ₂	Y	277	1274.4 [M-2H] ²
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH ₂	Y	277	1274.4 [M-2H] ²
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(5CF)-NH ₂	Y	277	1453.5 [M-2H] ² , 966.7 [M-3H] ³
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK(Biotin-JJ)-NH ₂	Y	379	1539.8 [M-2H] ²
Ac-AQXXXXXXXXXXXXXXXXXGGGGGK(Biotin-JJ)-NH ₂		380	
Ac-AQPDNWKEFYSGWKYPSLYKPLGGGGGK(Biotin-JJ)-NH ₂	Y	381	1878.9 [M+2H] ²
Ac-AQIEYVNDKWWYWTGGYWNVPFPGGGGK(Biotin-JJ)-NH ₂	Y	382	1866.6 [M-2H] ²
Ac-AQDALEAPKRDWYYDWFLNHSPPGGGGK(Biotin-JJ)-NH ₂	Y	383	1845.5 [M-2H] ²
Ac-AQWYHDGLHNERKPPSHWIDNVGGGGGK(Biotin-JJ)-NH ₂	Y	384	1833.7 [M-2H] ²
Ac-AQDWYWQERDKLREHYDDAFWGGGGGK(Biotin-JJ)-NH ₂	Y	385	1990.8 [M-2H] ²
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK-NH ₂	Y	277	2549.7 [M-H], 1274.7 [M-2] ²
Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDFGGGK(Biotin-JJ)-NH ₂	Y	337	1449.3 [M-2H] ² , 955.6 [M-3H] ³

FIG. 57A

Secuencia del compuesto/Estructura (secuencia parental en rojo)	¿Obtenido? S/N	SEQ ID NO	Datos de EM [†]
AGPTWCEDDWYYCWLFGTGCGK(Biotin-JJ)-NH ₂		277	
Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGCGK(nSbGJJ)-NH ₂	Y	277-nSbGJJ	1621.5 [M-2H]/2 ^a
AGPTWCEDDWYYCWLFGTGCGK-NH ₂		277	
Dansyl-NH-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGCGK(SCF)-NH ₂	Y	277-SCF	1549.1 [M-2H]/2 ^a
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGK-NH ₂	Y	356	1562.1 [M-2H]/2 ^a
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGK-NH ₂	Y	356	1562.3 (M-2H)/2 ^a
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGK(IV-Dde)-NH ₂	Y	356	1729.7 [M-2H]/2, 1152.5 [M-3H]/3 ^a
Ac-AQDWYYDEILSMADQLRHAFLSGGGGK(SATA)-NH ₂	Y	356-SATA	1620.2 [M-2H]/2 ^a

FIG. 57B

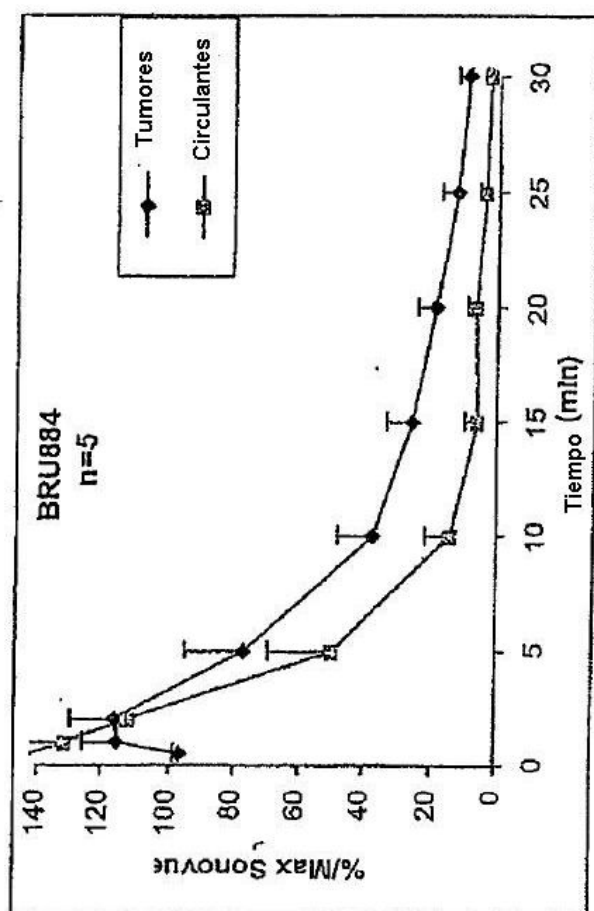


FIG. 58

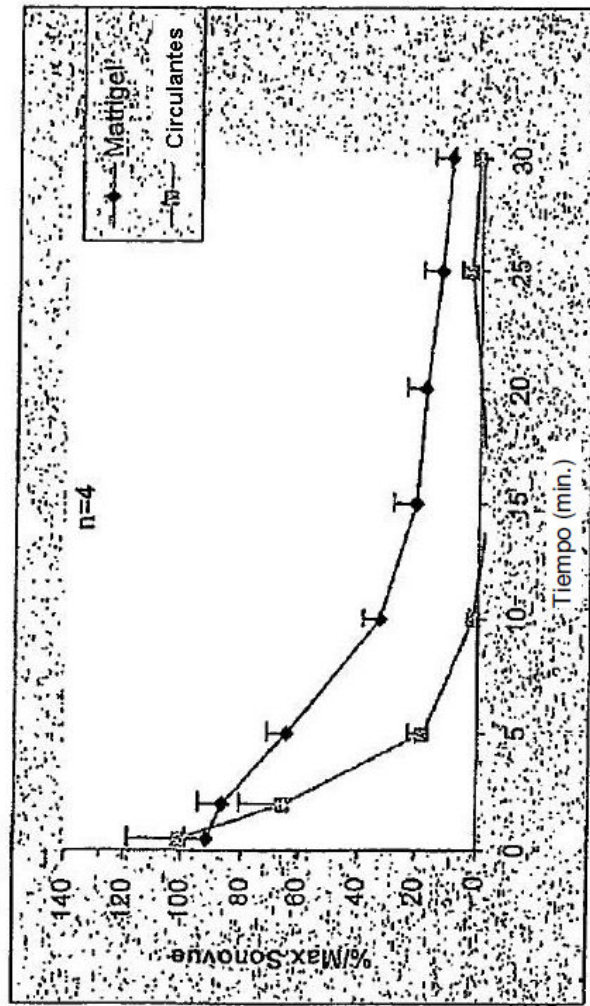


FIG. 59

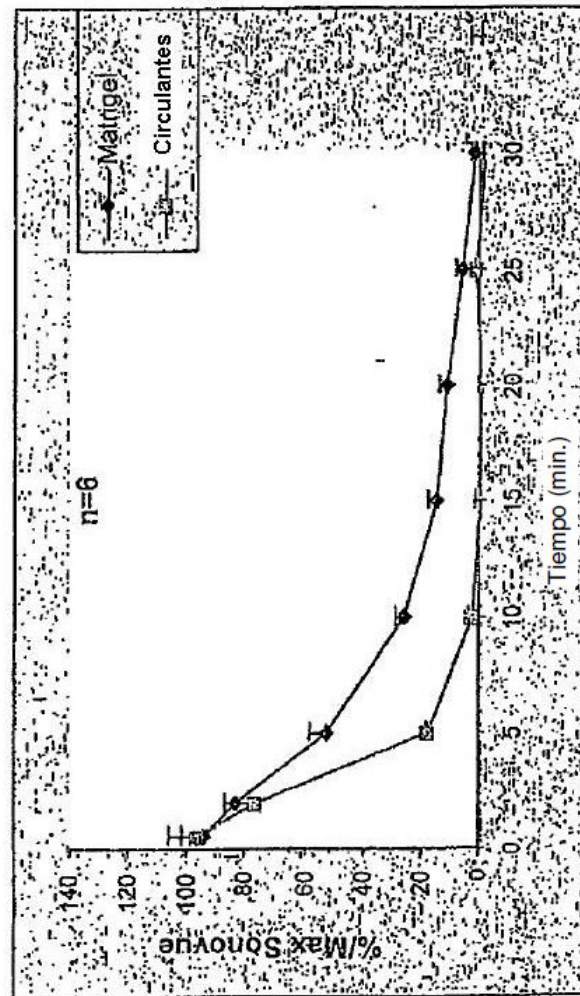


FIG. 60

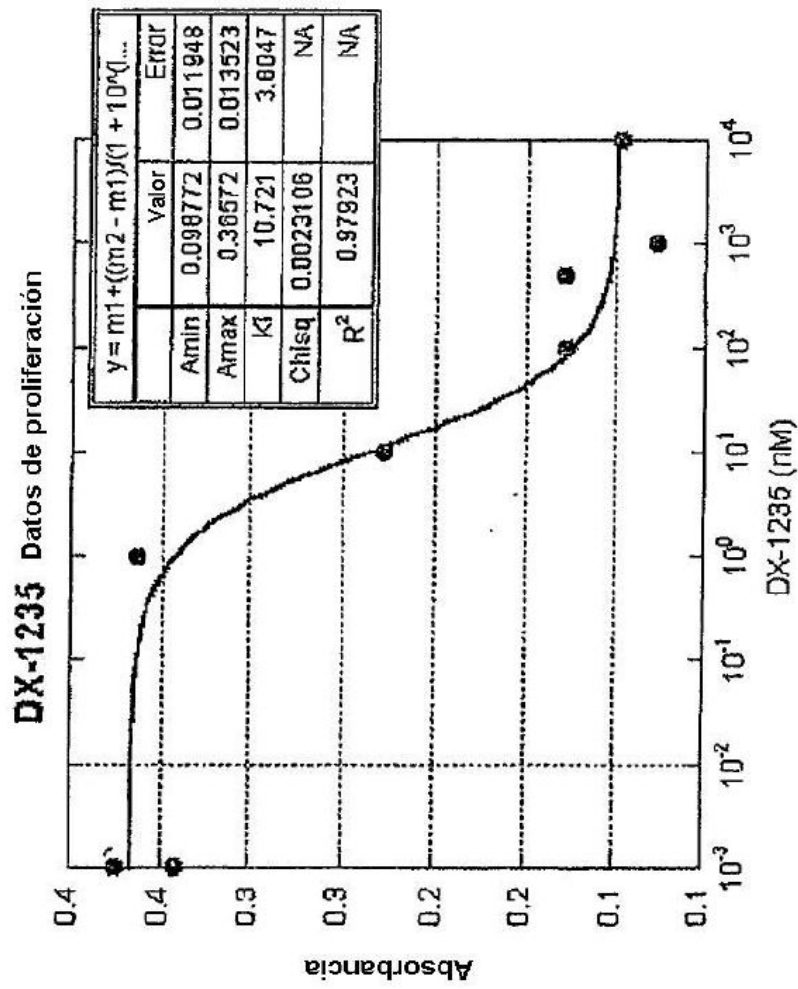


FIG. 61

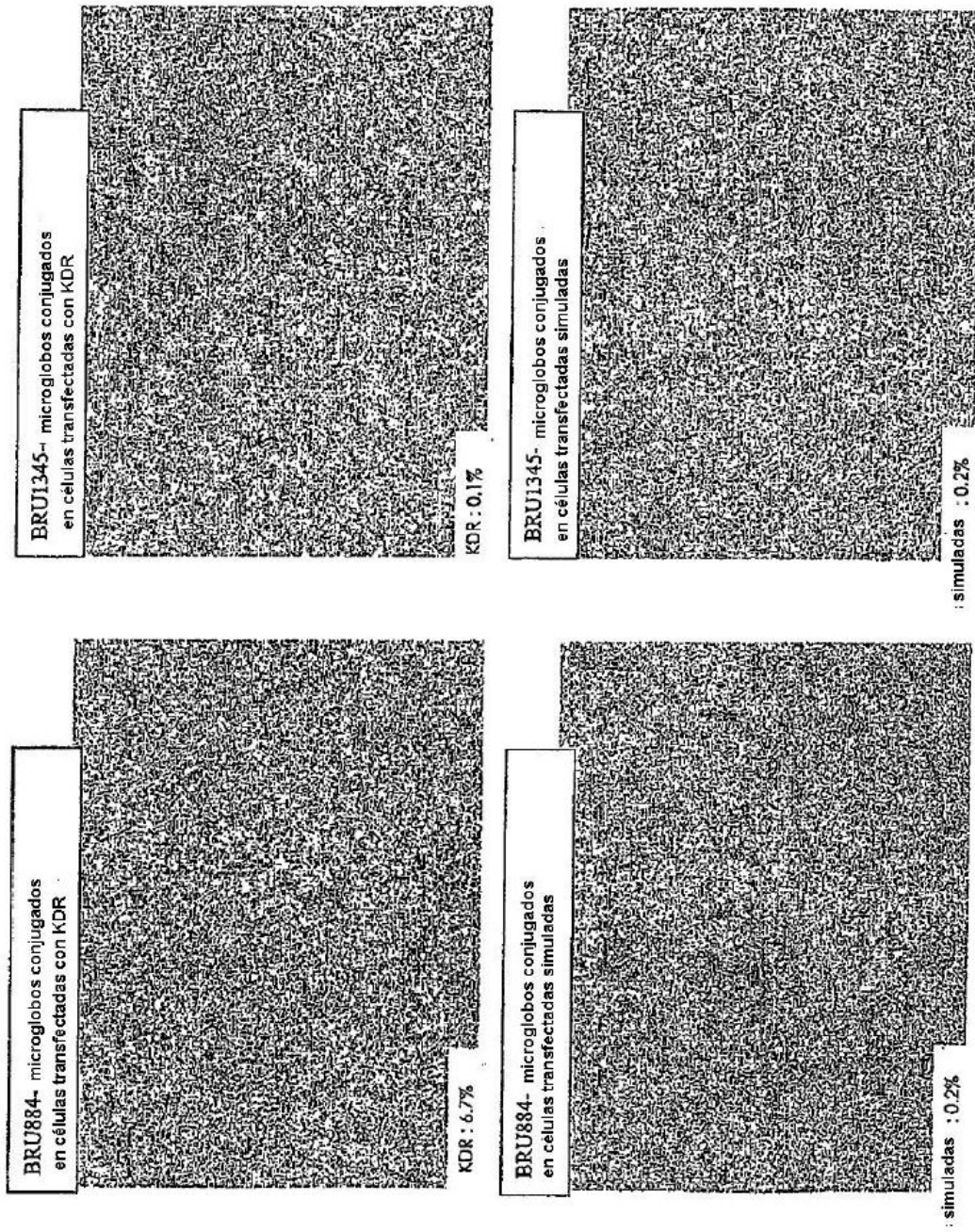


FIG. 62

Fig. 63

