

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 964**

51 Int. Cl.:

A61K 49/22 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C12P 21/04 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006 E 06840164 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1966388**

54 Título: **Conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos**

30 Prioridad:

09.12.2005 US 749240 P

25.07.2006 US 833342 P

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

12.11.2013

73 Titular/es:

**BRACCO SUISSE SA (100.0%)
VIA CANTONALE 2
6928 MANNO, CH**

72 Inventor/es:

**BUSSAT, PHILIPPE;
CHERKAOUI, SAMIR;
FAN, HONG (HELEN);
LAMY, BERNARD;
NANJAPPAN, PALANIAPPA;
PILLAI, RADHAKRISHNA K.;
POCHON, SIBYLLE;
SONG, BO y
SWENSON, ROLF E.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 428 964 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

Conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos y en particular a conjugados de péptidos específicos de una diana-fosfolípidos, que son útiles en composiciones terapéuticas y de diagnóstico y a métodos de preparación de los mismos. La invención incluye agentes de contraste para ultrasonidos dirigidos, y especialmente microburbujas dirigidas que incluyen tales conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos.

Antecedentes de la invención

10 La angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos, se produce no solo durante el desarrollo embrionario y el crecimiento del tejido normal y la reparación, sino que también está involucrada en el ciclo reproductor femenino, el establecimiento y el mantenimiento del embarazo, y la reparación de heridas y fracturas. Además de la angiogénesis que se produce en el individuo normal, los acontecimientos angiogénicos están implicados en una serie de procesos patológicos, en particular, el crecimiento tumoral y la metástasis, y otras afecciones en las que se incrementa la proliferación de los vasos sanguíneos, tales como retinopatía diabética, psoriasis y artropatías. Además, la angiogénesis es importante en la transición de un tumor con crecimiento hiperplásico a neoplásico. Por consiguiente, la inhibición de la angiogénesis se ha convertido en un campo de investigación de una terapia activa contra el cáncer.

15 La angiogénesis inducida por tumores se cree que depende de la producción de factores de crecimiento proangiogénicos en las células tumorales, que superan otras fuerzas que tienden a mantener los vasos existentes inactivos y estables. El mejor caracterizado de estos agentes proangiogénicos o factores de crecimiento es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Cohen et al., FASEB J., 13: 9-22 (1999)). El VEGF se produce de forma natural en una variedad de tipos de células como respuesta a la hipoxia y a algunos otros estímulos. Muchos tumores también producen grandes cantidades de VEGF y/o inducen a células cercanas del estroma para que produzcan VEGF (Fukumura et al., Cell, 94: 715-725 (1998)). El VEGF, también conocido como VEGF-A, se sintetiza como cinco isoformas diferentes por corte y empalme de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos. El VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ son las principales formas producidas, en particular en tumores (véase Cohen et al. 1999, *supra*). 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, a diferencia de VEGF₁₆₅.

20 Los miembros de la familia de VEGF actúan principalmente uniéndose a las cinasas de tirosina receptoras. En general, las cinasas de tirosina receptoras son glicoproteínas que tienen un dominio extracelular capaz de unirse a uno o varios factores de crecimiento específicos, un dominio transmembranal (por lo general una hélice alfa), un dominio yuxtamembranal (en donde el receptor puede estar regulado, por ejemplo, mediante fosforilación), un dominio de cinasa de tirosina (el componente catalítico del receptor), y una cola carboxi-terminal que en muchos receptores está implicada en el reconocimiento y la unión de los sustratos de la cinasa de tirosina. Hay tres cinasas de tirosina receptoras específicas de células endoteliales, conocidas por unirse a VEGF: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR o Flk-1) y VEGFR-3 (Flt4). Flt-1 y KDR (también conocidas como VEGFR-2 o Flk-1, que se utilizan indistintamente en este documento) se han identificado como los principales receptores de VEGF de alta afinidad. Aunque Flt-1 tiene una mayor afinidad hacia VEGF, KDR muestra una expresión más abundante en las células endoteliales (Bikfalvi et al., J. Cell. Physiol., 149: 50-59 (1991)). Por otra parte, se cree que KDR domina la respuesta angiogénica y por lo tanto tiene un mayor interés terapéutico y de diagnóstico (véase Cohen et al. 1999, *supra*). La expresión de KDR está muy regulada al alza en los vasos angiogénicos, especialmente en tumores que inducen una fuerte respuesta angiogénica (Veikkola et al., Cancer Res., 60: 203-212 (2000)). El papel fundamental de KDR en la angiogénesis se destaca por la ausencia total de desarrollo vascular en embriones de ratón con genes desactivados, homocigotos para KDR (Folkman et al., Cancer Medicine, 5ª edición (B.C. Decker Inc.; Ontario, Canadá, 2000) págs. 132-152).

25 KDR (región del dominio cinasa) se compone de 1336 aminoácidos en su forma madura. La forma glicosilada de KDR 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 cuales, los tres primeros son los más importantes en la unión a VEGF (Cohen et. al, 1999, *supra*). El propio VEGF es un homodímero capaz de unirse a dos moléculas de KDR simultáneamente. El resultado es que dos moléculas de KDR se dimerizan después de la unión y se autofosforilan, volviéndose mucho más activas. El aumento de la actividad cinasa, a su vez, inicia una vía de señalización que media en los efectos biológicos del VEGF específicos de KDR.

30 Por lo tanto, no solo la actividad de unión a VEGF de KDR *in vivo* es decisiva para la angiogénesis, sino que la capacidad de detectar la regulación al alza de KDR en las células endoteliales o de detectar complejos de unión de VEGF/KDR sería extremadamente beneficiosa para detectar o vigilar la angiogénesis.

35 Es bien conocido que agentes de contraste para ultrasonidos llenos de gas son reflectores de ultrasonidos excepcionalmente eficaces para la ecografía. Tales agentes de contraste para ultrasonidos incluyen, por ejemplo, micro-

vesículas llenas de gas tales como microburbujas llenas de gas y microglobos llenos de gas. Las microburbujas llenas de gas son agentes de contraste para ultrasonidos particularmente preferidos. (En esta descripción, el término "microburbujas" designa específicamente una burbuja gaseosa rodeada o estabilizada con fosfolípidos). Por ejemplo, la inyección en el torrente sanguíneo de suspensiones de cuerpos vivos de microburbujas llenas de aire o de gas en un vehículo líquido, reforzará fuertemente la formación de imágenes ecográficas con ultrasonidos, ayudando de este modo a la visualización de estructuras anatómicas internas. La obtención de imágenes de vasos y órganos internos puede ayudar mucho en el diagnóstico médico, por ejemplo, para la detección de enfermedades neoplásicas, cardiovasculares y otras.

El documento WO03/074005 describe polipéptidos que se unen a KDR o al complejo VEGF/KDR, que se pueden incorporar en agentes de contraste para ultrasonidos llenos de gas.

Para los fines diagnósticos y terapéuticos sería particularmente beneficioso incorporar en agentes de contraste para ultrasonidos llenos de gas, composiciones de vectores específicos de una diana que muestran una alta afinidad en la unión a una diana deseada (tal como, por ejemplo, KDR o el complejo VEGF/KDR). Por ejemplo, los conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos y en particular los conjugados de péptidos específicos de una diana-fosfolípidos se pueden utilizar para preparar agentes de contraste para ultrasonidos dirigidos llenos de gas. Además, sería particularmente beneficioso disponer de métodos para la producción a gran escala de formas altamente purificadas de tales conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos. Tales composiciones y métodos permitirían la producción de composiciones para uso en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas, tales como, por ejemplo, dirigir de forma precisa a un sitio diana restos indicadores, agentes tumorocidas o inhibidores de la angiogénesis.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos y en particular conjugados de péptidos específicos de una diana-fosfolípidos que son útiles en la preparación de agentes de contraste para ultrasonidos llenos de gas. En una realización preferida, los conjugados de péptidos específicos de una diana-fosfolípidos incluyen péptidos específicos de una diana que muestran una alta afinidad en la unión a KDR y, por lo tanto, son componentes útiles de agentes de contraste para la formación de imágenes de procesos angiogénicos.

La presente invención también proporciona conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros y dímeros (también denominados en este documento como lipopéptidos) que son útiles en la preparación de agentes de contraste para ultrasonidos llenos de gas, y en particular, en la preparación de agentes de contraste para ultrasonidos que se dirigen a KDR y se pueden utilizar para obtener imágenes de procesos angiogénicos.

La presente invención también proporciona métodos y procedimientos para la producción a gran escala de conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros y dímeros de alta pureza, particularmente conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros y dímeros que tienen una alta afinidad en la unión a KDR.

La presente invención también proporciona métodos y procedimientos para la producción a gran escala de conjugados de fosfolípidos y péptidos dímeros muy puros que tienen niveles mínimos de ácido trifluoroacético (TFA).

También se describen en esta memoria métodos para sintetizar péptidos monómeros con pureza elevada y construir conjugados de fosfolípidos y péptidos a partir de múltiples subunidades peptídicas.

También se describen en esta memoria péptidos monómeros que se unen a KDR o al complejo VEGF/KDR con alta afinidad, así como métodos de síntesis y de uso de tales péptidos monómeros.

La presente invención también proporciona agentes de contraste para ultrasonidos dirigidos, preparados a partir de tales conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos. Tales agentes de contraste para ultrasonidos dirigidos son útiles para obtener imágenes de un tejido portador de una diana. En una realización preferida, los agentes de contraste para ultrasonidos dirigidos, son microburbujas dirigidas y los conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos incluyen péptidos específicos de una diana que muestran una alta afinidad en la unión a KDR y, por lo tanto, son componentes útiles de agentes de contraste para obtener imágenes de un tejido portador de KDR y, en particular, para la formación de imágenes de tumores y de procesos angiogénicos. También se proporcionan métodos de preparación y de uso de tales agentes de contraste para ultrasonidos dirigidos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un método para la producción de un conjugado de fosfolípido y péptido monómero (1) a partir de un monómero de péptido lineal (2).

La Figura 2 ilustra un conjugado de fosfolípido y péptido monómero (1) que incluye un péptido con una alta afinidad en la unión a KDR.

La Figura 3 ilustra un método para la producción de un péptido dímero precursor (16) a partir de monómeros peptídicos

cos.

La Figura 4 ilustra un método para la conjugación del péptido dímero precursor mostrado en la Figura 1 con DSPE-PEG2000-NH₂ para formar un conjugado de fosfolípidos y péptidos dímeros (11) que contiene péptidos que se unen con alta afinidad a KDR.

5 La Figura 5 ilustra un conjugado de péptido-fosfolípido (11) que contiene péptidos que se unen con alta afinidad a KDR.

La Figura 6 ilustra un método para la producción de conjugados de péptidos dímeros-fosfolípidos (tal como (21)) que tienen niveles mínimos de TFA.

10 La Figura 7 ilustra otro método para la producción de conjugados de péptidos dímeros-fosfolípidos (tal como (21)) que tienen niveles mínimos de TFA.

La Figura 8 ilustra otro método para la producción de conjugados de péptidos dímeros-fosfolípidos que tienen niveles mínimos de TFA.

La Figura 9 ilustra otro péptido monómero representativo (32) que tiene una alta afinidad en la unión a KDR.

15 La Figura 10 ilustra otro conjugado de péptido monómero-fosfolípido (31) que incluye el péptido monómero mostrado en la Figura 9.

Las Figuras 11A-C muestran imágenes obtenidas mediante el uso del conjugado de péptido dímero-fosfolípido (11) (mostrado en la Figura 5) en un agente de contraste en: 1) valor de referencia (FIG. 11A); 2) después de 25 minutos (FIG. 11B); y 3) después de la sustracción del valor de referencia y las burbujas que circulan libres (FIG. 11C).

20 Las Figuras 12A-C muestran imágenes obtenidas mediante el uso del conjugado de fosfolípidos y péptidos monómeros (1) (que se muestra en la Figura 2) en un agente de contraste como valor de referencia (FIG. 12A); después de 25 minutos (FIG. 12B); y después de la sustracción del valor de referencia y las burbujas libres circulantes (FIG. 12C).

Descripción detallada

25 Los solicitantes han descubierto de forma inesperada conjugados de péptidos y fosfolípidos, que son útiles en la producción de agentes de contraste para ultrasonidos dirigidos y que tienen una eficacia excepcional en la unión a KDR. Dos de estos compuestos son conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros que incluyen un monómero de péptido lineal que se une con alta afinidad a KDR, mientras que el otro es un conjugado de fosfolípidos y péptidos dímeros que incluye dos subunidades monómeras distintas, uniéndose cada una de ellas a KDR. Además, se han descubierto métodos muy eficaces para la producción a gran escala de formas purificadas de estos conjugados y materiales precursores. Tales métodos incluyen la producción de conjugados de fosfolípidos y péptidos dímeros que tienen niveles mínimos de TFA.

30 El fosfolípido se puede seleccionar entre el grupo que consiste en: fosfatidiletanolaminas y fosfatidiletanolaminas modificadas. Los fosfolípidos particularmente preferidos incluyen fosfatidiletanolaminas modificadas mediante la unión de un polímero hidrófilo a las mismas. Ejemplos de fosfatidiletanolaminas modificadas son fosfatidiletanolaminas (PE) modificadas con polietilenglicol (PEG), brevemente "PE-PEG", es decir, fosfatidiletanolaminas en donde el resto hidrófilo etanolamina está unido a una molécula de PEG de peso molecular variable (por ejemplo, 300 a 5000 Dalton), tales como DPPE-PEG, DSPE-PEG, DMPE-PEG o DAPE-PEG. DSPE-PEG2000, DSPE-PEG3400, DPPE-PEG2000 y DPPE-PEG3400 se prefieren, siendo DSPE-PEG2000 particularmente preferida. Obsérvese que se puede utilizar una forma salina del fosfolípido, tal como por ejemplo, la sal de trimetilamonio, la sal de tetrametilamonio, la sal de trietilamonio, la sal de sodio, etc.

35 Estos compuestos se pueden incorporar en agentes de contraste para ultrasonidos llenos de gas, tales como por ejemplo, microburbujas llenas de gas, para formar agentes de contraste que proporcionan una excelente formación de imágenes del tejido portador de la diana. En una realización preferida, los conjugados de vectores específicos de una diana-fosfolípidos que incluyen péptidos específicos de una diana que se unen con alta afinidad a KDR, se incorporan en microburbujas dirigidas. Tal y como se muestra en este documento, tales microburbujas dirigidas se restringen selectivamente al tejido portador de KDR, lo que permite la formación de imágenes de dicho tejido y, en particular, la formación de imágenes de tumores y de procesos angiogénicos, incluyendo los procesos asociados con un desarrollo neoplásico.

Conjugados monómeros

50 En general

La Tabla 1 proporciona una descripción de las etiquetas de identificación que se muestran en las Figuras 1, 2, 9 y 10.

presente invención proporcionan por lo menos las siguientes ventajas: mayor rendimiento de la síntesis peptídica; grado reducido de racemización; prevención de la formación de amida de piperidina observada previamente durante la síntesis, purificación eficaz de los péptidos monómeros (2) y (32), desarrollo de un procedimiento para conjugar los péptidos monómeros (2) y (32) a gran escala; y desarrollo de protocolos de purificación que permitan una separación adecuada de los conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros (1) y (31) de la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ de partida (4).

Los conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros se pueden preparar tal y como se describe a continuación. Se debe apreciar que los valores numéricos mencionados en esta descripción representativa de la síntesis de conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros son representativos.

Los monómeros de péptidos lineales se pueden preparar mediante SPPS. La secuencia de los monómeros de péptidos lineales se puede construir como una carboxamida C-terminal en una Pal-PEG-PS-resina (nivel de sustitución: 0,2 mmol/g). La síntesis de péptidos se puede realizar usando química con Fmoc en un sintetizador de péptidos SONATA[®]/Pilot. Los problemas observados anteriormente con este procedimiento han sido la racemización, los acoplamientos incompletos y la formación de amida de piperidina, cada uno de los cuales contribuye a un rendimiento y una pureza subóptimos. Una disminución drástica en la formación de amida de piperidina se puede conseguir empleando 25% de piperidina en DMF que contiene HOBt (0,1 M) como reactivo para la eliminación de Fmoc. La racemización se puede reducir considerablemente mediante el uso de DIC/HOBt como activador para la mayoría de los acoplamientos; un tiempo de acoplamiento de 3 h usando un exceso de cuatro veces de Fmoc-aminoácido preactivado con un lavado intercalado con DMF anhidro (6x). Los N^α-Fmoc-aminoácidos se pueden disolver justo antes de su turno de acoplamiento y preactivar con DIC/HOBt en DMF durante 4 min y transferir al recipiente de reacción. Esto se puede lograr con el aparato Sonata, cargando los Fmoc-aminoácidos sólidos en los recipientes de aminoácidos del aparato y, a continuación, programando el aparato para añadir DMF, HOBt/DMF y DIC/DMF secuencialmente con burbujeo de la solución.

Para optimizar el rendimiento, se puede considerar el problema de la agregación de la resina durante la síntesis de péptidos más largos, que puede ser catastrófico incluso cuando se emplean reactivos de acoplamiento óptimos. Para reducir la agregación durante el ensamblamiento de péptidos, se puede utilizar la estrategia de utilización de dipéptidos de pseudoprolina para incorporar X-Thr o X-Ser como dipéptidos en lugar de acoplamientos secuenciales de X y Thr o X y Ser. Para monómeros de péptidos lineales, los acoplamientos secuenciales de Leu¹¹-Ser¹² y Leu²²-Ser²³ se pueden sustituir por el acoplamiento único del dipéptido de pseudoprolina, Fmoc-Leu-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-OH. La optimización adicional se puede conseguir mediante la reducción del número de acoplamientos empleando Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH y Fmoc-Gly-Gly-OH, en lugar de acoplamiento en serie de Fmoc-Gly-OH. La activación de segmentos de -Gly-Gly-OH puede conducir a la ciclación de la función ácido activada con la función amida distal, para producir una dicetopiperazina inactiva; esto puede reducir los rendimientos del acoplamiento de una manera dependiente del tiempo. Este problema se puede evitar mediante la adición de Fmoc-Gly-OH (n = 2, 3) al recipiente de reacción y la adición secuencial de HOBt y DIC; el Fmoc-Gly-OH activado puede ser interceptado por el grupo amino unido a la resina antes de que tenga lugar una ciclación apreciable con la dicetopiperazina. Con estas mejoras, la síntesis de los monómeros de péptidos lineales se puede completar en el sintetizador de péptidos Sonata con una escala de síntesis de 10 mmol.

Después de la elongación de la cadena, el Fmoc se puede eliminar del extremo N-terminal. El péptido y el grupo amino libre se pueden acetilar. A continuación, la secuencia peptídica se puede escindir de la resina y desproteger usando el "Reactivo B" (TFA:agua:fenol:triisopropilsilano, 88:5:5:2, v/v/p/v) durante 4 h. Después de la reacción de escisión, el péptido crudo se puede aislar como un sólido por evaporación de los elementos volátiles, trituración del residuo con éter dietílico y lavado del sólido obtenido de este modo utilizando el mismo disolvente. En otra variación, el péptido se puede precipitar desde la mezcla de reacción, añadiendo éter dietílico a la mezcla de reacción, recogiendo el sólido así formado y lavando con el mismo disolvente.

Los monómeros peptídicos lineales se pueden purificar tal y como se describe a continuación. Una vez más, las referencias numéricas son representativas. Los monómeros de péptidos lineales crudos (0,5 g) se pueden disolver en CH₃CN (40 mL/g) y esta solución se puede diluir con agua hasta tener un volumen final de 100 mL. A continuación, se puede filtrar la solución. La solución filtrada se puede cargar en la columna preparativa de HPLC (Waters, XTerra[®] Prep MS C18, 10 μ, 300 Å, 50 x 250 mm) equilibrada con 10% de CH₃CN en agua (0,1% de TFA). Después de la carga, la composición del eluyente se puede incrementar paulatinamente hasta 20% de CH₃CN-agua (0,1 % de TFA) durante 1 min, y se puede iniciar un gradiente lineal con una tasa de 0,6%/min de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA) y ejecutar durante 50 min. En las fracciones eluidas se puede verificar la pureza sobre una columna analítica C18 de fase inversa (Waters XTerra MS-C18, 10 μ, 120 Å, 4,6 x 50 mm) y las fracciones que contienen el producto con >95% de pureza se pueden combinar y liofilizar. Por cada 0,5 g de péptido crudo purificado, se pueden aislar de manera constante 0,12 g (24%) de monómero de péptido lineal y se proporcionará el péptido con el mismo rendimiento y pureza.

La síntesis de conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros se puede realizar tal y como se describe a continuación. Las referencias numéricas son de nuevo representativas. La última etapa de la síntesis puede ser la conjugación del fosfolípido, tal como por ejemplo, un fosfolípido pegilado, tal como la sal de amonio del fosfolípido DSP-

PEG2000-NH₂ con un monómero de péptido lineal. El resto PEG2000 de la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (4) está compuesto formalmente por 45 unidades de etilenglicol. Se debe entender, sin embargo, que este material es una distribución de especies que contienen PEG cuyo centroide es el compuesto formal que contiene 45 unidades de etilenoxi. La conjugación de un monómero de péptido lineal con la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ se puede llevar a cabo mediante la preparación del mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico de un monómero de péptido lineal y la reacción de éste con el grupo amino libre de la sal de amonio del fosfolípido. De este modo, un monómero de péptido lineal puede reaccionar con DSG (4 eq.) en DMF en presencia de DIEA (5 eq.) durante 30 min. La mezcla de la reacción se puede diluir con acetato de etilo, lo que puede dar lugar a la precipitación del mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico del péptido. El material sobrenadante que contiene DSG sin reaccionar se puede decantar y el mono-éster de NHS del péptido intermedio se puede lavar varias veces con acetato de etilo para eliminar las trazas de DSG. Los datos de espectros de masas confirman la formación del mono-éster de NHS del péptido como un producto limpio. El mono-éster de NHS sólido se puede disolver en DMF y hacer reaccionar con la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (0,9 eq.) en presencia de DIEA (4 eq.) durante 24 h. El mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico de un monómero de péptido lineal se puede utilizar en exceso para maximizar el consumo de la sal de amonio del fosfolípido porque la sal de amonio del fosfolípido libre puede complicar el aislamiento de los conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros en forma muy pura.

La mezcla de la reacción se puede diluir con una mezcla 1:1 de agua (0,1% de TFA) y CH₃CN-CH₃OH (1:1, v/v) (0,1% de TFA) (~100 mL), aplicada a una columna C2 de fase inversa (Kromase Prep C2, 10 µ, 300 Å, 50 x 250 mm, caudal 100 mL/min) y la columna se puede eluir con una mezcla de 3:1 de agua (0,1% de TFA) y CH₃CN-CH₃OH (1:1, v/v) (0,1% de TFA) para eliminar las impurezas hidrófilas. A continuación, el producto se puede eluir empleando un gradiente de CH₃CN-CH₃OH (1:1) (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA) (véase la Sección Experimental para detalles). Las fracciones recogidas se pueden analizar mediante HPLC de fase inversa usando un detector de ELS que permite la detección del producto deseado y el fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ frecuentemente difícil de separar, que tiene muy poca absorbancia de UV. Esto indica la clara separación de los conjugados de péptidos monómeros y fosfolípidos y el fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂. Las fracciones que contienen el producto puro se pueden recoger, concentrar en un evaporador rotatorio (para reducir el contenido en metanol) y liofilizar para proporcionar conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros como un sólido incoloro. Con el fin de preparar la cantidad necesaria de conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros, se pueden llevar a cabo varias migraciones empleando 0,5 g a 1,0 g de monómero de péptido lineal. En todos los casos, los conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros diana se pueden aislar con un alto rendimiento y pureza (por ejemplo, un rendimiento del 57-60% y >99% de pureza).

Conjugado dímero

En general

La Tabla 2 proporciona una descripción para la identificación de las etiquetas que se muestran en las Figuras 3, 4 y 5.

Tabla 2

11	Disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDP-GGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH ₂ }-NH ₂
12	Disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH ₂
13	Disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH ₂
14	Mono-éster de NHS de glutarilo-péptido 12 disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWGEDDWYYCWLFGTGGGK[NHS-Glut-K(ivDde)]-NH ₂
15	Dímero portador de ivDde disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(ivDde)]-NH ₂ }-NH ₂
16	Disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(-Adoa-Adoa-Glut-K)-NH ₂]-NH ₂

17	Mono-éster de NHS de glutarilo-péptido 16 disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(NHS-Glut)]-NH ₂ }-NH ₂
18	Fosfolípido DSPE-PEG2000-NH ₂

Como se muestra en estas figuras, el conjugado de fosfolípido y péptido dímero (11) disulfuro cíclico (6-13) de acetil-L-alanil-glicil-L-prolil-L-treonil-L-triptofil-L-cistinil-L-glutamil-L-aspartil-L-aspartil-L-triptofil-L-tirosil-L-tirosil-L-cistinil-L-triptofil-L-leucil-L-fenilalanil-glicil-L-treonil-glicil-glicil-glicil-L-lisil[disulfuro cíclico (2-12) de acetil-L-valil-L-cistinil-L-triptofil-L-glutamil-L-aspartil-L-seril-L-triptofil-glicil-glicil-L-glutamil-L-valil-L-cistinil-L-fenilalanil-L-arginil-L-tirosil-L-aspartil-L-prolil-glicil-glicil-glicil-L-lisil(diesteoirilfosfoetanolaminocarbonoxi-PEG2000-amino-8-amino-3,6-dioxaoctanoil-8-amino-3,6-dioxaoctanoil-glutaril-L-lisil)amida]-amida, consta de dos cadenas de péptidos monómeros que se unen a KDR: un monómero de péptido de disulfuro cíclico de 21 aminoácidos (13) disulfuro cíclico (2-12) de acetil-L-valil-L-cistinil-L-triptofil-L-glutamil-L-aspartil-L-seril-L-triptofil-glicil-glicil-L-glutamil-L-valil-L-cistinil-L-fenilalanil-L-arginil-L-tirosil-L-aspartil-L-prolil-glicil-glicil-glicil-L-lisil(8-amino-3,6-dioxaoctanoil-8-amino-3,6-dioxaoctanoil) crudo, y un monómero de péptido de disulfuro cíclico de 22 aminoácidos (12) disulfuro cíclico 6-13 de acetil-L-alanil-glicil-L-prolil-L-treonil-L-triptofil-L-cistinil-L-glutamil-L-aspartil-L-aspartil-L-triptofil-L-tirosil-L-tirosil-L-cistinil-L-triptofil-L-leucil-L-fenilalanil-glicil-L-treonil-glicil-glicil-glicil-L-lisinamida unido a un enlazador de glutarilo.

Los agentes de contraste para ultrasonidos (por ejemplo, microburbujas llenas de gas) formulados con el conjugado de fosfolípido y péptido dímero (11) mostraban alta afinidad en la unión a KDR, lo que fue confirmado mediante un examen ecográfico de tumores VX2 en conejos.

Métodos de preparación de conjugados de dímeros-fosfolípidos

Para llevar a cabo la síntesis del conjugado de fosfolípido y péptido dímero (11), los monómeros utilizados para este propósito se deben preparar de manera óptima a granel. A continuación, los monómeros se pueden unir entre sí empleando glutarato de disuccinimidilo como enlazador para formar el péptido dímero precursor (16), disulfuro cíclico (6-13) de acetil-L-alanil-glicil-L-prolil-L-treonil-L-triptofil-L-cistinil-L-glutamil-L-aspartil-L-triptofil-L-tirosil-L-tirosil-L-cistinil-L-triptofil-L-leucil-L-fenilalanil-glicil-L-treonil-glicil-glicil-glicil-L-lisil[disulfuro cíclico (2-12) de acetil-L-valil-L-cistinil-L-triptofil-L-glutamil-L-aspartil-L-seril-L-triptofil-glicil-glicil-L-glutamil-L-valil-L-cistinil-L-fenilalanil-L-arginil-L-tirosil-L-aspartil-L-prolil-glicil-glicil-glicil-L-lisil(8-amino-3,6-dioxaoctanoil-8-amino-3,6-dioxaoctanoil-glutaril-L-lisil)amida]-amida. A continuación, se puede utilizar la conjugación del péptido dímero precursor purificado (16) con una sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (18) de nuevo a través de glutarato de disuccinimidilo, con el fin de proporcionar el conjugado de fosfolípido y péptido dímero diana (11).

En la preparación del conjugado de fosfolípido y péptido dímero (11), los métodos de acuerdo con la presente invención proporcionan al menos las siguientes ventajas: aumento del rendimiento de la elongación automatizada de la cadena de las secuencias peptídicas; reducción del grado de racemización encontrado durante la síntesis; prevención de la formación de amida de piperidina previamente observada, durante la síntesis del péptido monómero (13); ciclación de precursores del péptido lineal que contiene dicisteína de (12) y (13) usando procedimientos susceptibles a escala multigramo, permitiendo, sin embargo, un manejo eficaz y práctico de la muestra; purificación eficaz de los péptidos monómeros (12) y (13); rendimiento y pureza maximizados del péptido dímero precursor (16); desarrollo de un procedimiento para la conjugación del péptido dímero precursor (16) a mayor escala; y desarrollo de protocolos de purificación que permiten la separación adecuada del conjugado de fosfolípido y péptido dímero diana (11) de la sal de amonio del fosfolípido (18).

El conjugado de fosfolípido y péptido dímero (11) se puede preparar mediante síntesis automatizada de los monómeros peptídicos (12), disulfuro cíclico (6-13) de Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys(ivDde)-NH₂ y (13), disulfuro cíclico (2-12) de Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-Lys(Adoa-Adoa)-NH₂, su acoplamiento eficaz utilizando glutarato de disuccinimidilo (DSG) para proporcionar un dímero protegido con ivDde, su desprotección y acoplamiento posterior a DSPE-PEG2000-NH₂, también a través de un enlace glutarilo. Usando los procedimientos según la presente invención, los péptidos monómeros se pueden sintetizar a escala de 10 mmol sin complicación y después de la purificación con HPLC, se pueden obtener con un rendimiento de aproximadamente el 20% y >95% de pureza. Tales métodos permiten reacciones de formación de dímeros y la posterior conjugación con el componente fosfolípido proporcionando que la formación del conjugado de fosfolípido y péptido dímero (11) se lleve a cabo a una escala de gramo. El péptido dímero precursor (16) se puede obtener a partir de péptidos monómeros de forma rutinaria con un rendimiento de aproximadamente el 32% y >95% de pureza. El conjugado de fosfolípido y péptido dímero (11) se puede producir a partir del péptido dímero precursor (16) con un rendimiento del 57-60% y >99% de pureza.

Los conjugados de fosfolípidos y péptidos dímeros se pueden preparar tal y como se describe a continuación. Se debe apreciar que los valores numéricos mencionados en esta descripción representativa de la síntesis de conjugados de fosfolípidos y péptidos dímeros, son representativos.

5 A continuación se describe un método representativo para la síntesis en fase sólida y la ciclación con disulfuro de un péptido monómero (12) disulfuro cíclico (6-13) de Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys(ivDde)NH₂ y un péptido monómero (13), disulfuro cíclico (2-12) de Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-Lys(Adoa-Adoa)-NH₂.

10 Los péptidos se pueden construir como sus carboxamidas C-terminales sobre una resina de Pal-Peg-PS (nivel de sustitución: 0,2 mmol/g). La elongación de la cadena se puede realizar usando química de Fmoc, empleando protocolos de desprotección y acoplamiento optimizados en un sintetizador de péptidos SONATA[®]/Pilot a una escala de síntesis de 10 mmol. La síntesis optimizada de los péptidos mediante SPSS automatizada se puede desarrollar mediante el estudio de las impurezas peptídicas y el efecto de los cambios de elementos particulares de los protocolos sobre el rendimiento y la pureza globales de los péptidos obtenidos.

15 El análisis de las impurezas obtenidas a partir de síntesis no optimizadas de los péptidos monómeros indica que los principales problemas son la racemización, los acoplamientos incompletos y la formación de amida de piperidina (presumiblemente a través de una aspartimida o glutarimida intermedia), cada uno de los cuales contribuye a un rendimiento y pureza subóptimos. Una disminución drástica en la formación de amida de piperidina se puede conseguir mediante el uso de 25% de piperidina en DMF que contiene HOBt (0,1 M) como reactivo para la eliminación de Fmoc. La racemización se puede reducir considerablemente empleando DIC/HOBt como activador para la mayoría de los acoplamientos; y un tiempo de acoplamiento de 3 h usando un exceso de cuatro veces de Fmoc-aminoácido preactivado con un lavado intercalado con DMF anhidro (6x). Los N^α-Fmoc-aminoácidos se pueden disolver justo antes de su turno de acoplamiento y preactivar con DIC/HOBt en DMF durante 4 min y transferir al recipiente de la reacción. Esto se puede lograr en el instrumento Sonata cargando los Fmoc-aminoácidos sólidos en los recipientes de los aminoácidos del instrumento y programando a continuación el instrumento para añadir DMF, HOBt/DMF y DI-
25 C/DMF secuencialmente con burbujeo de la solución después de cada adición.

Para optimizar el rendimiento, se puede abordar el problema de la agregación de la resina durante la síntesis de péptidos más largos, que puede ser desastroso incluso cuando se emplean reactivos de acoplamiento óptimos. Para reducir la agregación durante el ensamblamiento del péptido, se puede emplear la estrategia de emplear dipéptidos de pseudoprolina para incorporar X-Thr o X-Ser (X se refiere al aminoácido n-1 de la secuencia) como dipéptidos en lugar de acoplamientos secuenciales de X y Thr o X y Ser. Por lo tanto, para el monómero (12), disulfuro cíclico (6-13) de Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-**Thr-Gly**-Gly-Gly-Lys(ivDde)-NH₂, el acoplamiento secuencial de Thr y Gly protegidas de forma adecuada (mostradas más arriba en negrita) se puede sustituir por el acoplamiento simple del dipéptido de pseudoprolina, Fmoc-Gly-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-OH. De forma similar, en la síntesis del monómero (13), disulfuro cíclico (2-12) de Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-Lys(Adoa-Adoa)-NH₂, el dipéptido de pseudoprolina, Fmoc-Asp(OtBu)-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-OH se puede emplear para sustituir el acoplamiento secuencial de Ser y Asp (mostradas con letras en negrita más arriba). Una optimización adicional se puede lograr mediante la reducción del número de acoplamientos empleando Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH y Fmoc-Gly-Gly-OH, en lugar del acoplamiento en serie de Fmoc-Gly-OH. La activación de segmentos -Gly-Gly-OH puede conducir a la ciclación de la función ácido activada con la función amida distal, para producir una dicetopiperazina inactiva; esto puede reducir los rendimientos del acoplamiento de una manera dependiente del tiempo. Este problema puede evitarse mediante la adición de Fmoc-Gly_n-OH (n = 2, 3) al recipiente de la reacción y la adición secuencial de HOBt y DIC; el Fmoc-Gly_n-OH activado puede ser interceptado por el grupo amino unido a la resina antes de que tenga lugar una ciclación apreciable de la dicetopiperazina. Después de completar la elongación de la cadena, el grupo protector Fmoc N-terminal se puede eliminar de cada uno de los péptidos y el grupo amino libre se puede acetilar.
45

El derivado protegido pseudo-ortogonalmente, Fmoc-Lys(ivDde)-OH se puede utilizar para permitir el desenmascaramiento selectivo de la ε-amina de la lisina C-terminal de los péptidos monómeros y dímeros y su posterior funcionalización, que también se puede optimizar. El grupo ivDde de la ε-amina de la lisina C-terminal de cada uno de los péptidos monómeros se puede eliminar usando 10% de hidrazina en DMF. A continuación, Fmoc-Adoa, para el monómero (13) o Lys(ivDde) para el monómero (12), se pueden anexas al grupo ε-amino expuesto de la lisina, empleando 4 equivalentes del aminoácido Fmoc y 4 equivalentes de cada uno de los DIC y HOBt en DMF durante 10 h. Después de completar la síntesis, la secuencia peptídica se puede escindir de la resina y desproteger usando el "Reactivo B" (TFA:agua:fenol:triisopropilsilano, 88:5:5:2, v/v/p/v) durante 4 h. Después de finalizar la reacción de escisión, el péptido se puede precipitar, lavar con éter dietílico y secar.
50

55 Los siguientes procedimientos para la ciclación de los péptidos lineales que contienen dicisteína se pueden utilizar para proporcionar un aumento progresivo óptimo de los péptidos monómeros. En general, la oxidación al aire de los péptidos lineales con dicisteína se puede llevar a cabo a una concentración de aproximadamente 0,5-5 mg/mL (para los péptidos monómeros descritos ~0,18-1,8 mM en péptido, ~0,36-3,6 mM en cisteína tiol). Para poder trabajar a concentraciones significativamente más altas, la ciclación facilitada con DMSO de los péptidos con dicisteína, permite la ciclación de ~10 g de los péptidos lineales con buenos rendimientos en solo ~50 mL de solución. Por lo tanto,
60

los péptidos lineales crudos con dicisteína se pueden ciclar en 95% de DMSO-H₂O (5 mL/g) a pH 8,5 a temperatura ambiente. El progreso de la ciclación se puede vigilar de forma rutinaria mediante espectroscopía de masas y HPLC. Aunque la ciclación se puede completar esencialmente en ~36 h, la mezcla de la reacción se puede agitar generalmente hasta 48 h. Los péptidos con disulfuro cíclico se pueden precipitar desde la mezcla de reacción mediante dilución con CH₃CN y los péptidos sólidos crudos resultantes de color blancuzco se pueden recoger por filtración. Este es un método conveniente para la eliminación de DMSO del péptido cíclico crudo.

La purificación y el aislamiento del péptido monómero (12), Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK [K(ivDde)]-NH₂ puede llevarse a cabo tal y como se describe a continuación. Obsérvese que, tal y como se usa en este documento, la designación "C*" se refiere a un residuo de cisteína que contribuye a un enlace disulfuro. Los intentos de disolver 0,5 g del péptido crudo en un máximo de 300 mL de 30% de CH₃CN en agua (0,1% de TFA) no han tenido éxito. Por lo tanto, como una alternativa, el péptido crudo (0,5 g) se puede disolver en DMSO (5 mL/g) y esta solución se puede diluir hasta tener un volumen final de 100 mL con 20% de CH₃CN-agua. La solución se puede filtrar. La solución filtrada se puede cargar en la columna de HPLC preparativa (Waters, XTerra[®] Prep MS C18, 10 μ, 300 Å, 50 x 250 mm) equilibrada con 10% de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA), y la columna se puede eluir con 10% de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA) para eliminar por lavado el DMSO de la columna. La composición del eluyente se puede incrementar paulatinamente a 35% de CH₃CN-agua (0,1% de TFA) durante 1 min y un gradiente lineal se puede iniciar con una tasa de 0,5%/min de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA) y eluir durante 50 min. En las fracciones eluidas se puede comprobar la pureza en una columna C18 analítica de fase inversa (Waters XTerra MS-C18, 10 μ, 120 Å, 4,6 x 50 mm) y las fracciones que contienen el producto con una pureza >95% se pueden combinar y liofilizar. Para cada purificación de 0,5 g de péptido crudo, se puede aislar 0,1 g (20%) de (12), Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH₂. Se ha encontrado que purificaciones repetidas proporcionan el péptido de manera constante con el mismo rendimiento y pureza.

El péptido monómero (13), Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH₂ se puede purificar y aislar tal y como se ha descrito para el péptido monómero (12), excepto que el péptido objeto se puede disolver en 20% de CH₃CN (0,1% de TFA) en 0,1% de TFA acuoso (0,5 g de péptido/100 mL) en lugar de un diluyente que contiene DMSO. La solución resultante del péptido crudo se puede cargar en la columna preparativa de HPLC (Waters, XTerra[®] Prep MS C18, 10 μ, 300 Å, 50 x 250 mm, caudal 100 mL/min) equilibrada con 10% de CH₃CN en agua (0,1% de TFA). La columna se puede eluir con 10% de CH₃CN (0,1% de TFA)/agua (0,1% de TFA) a 100 mL/min durante 5 min. A continuación, la composición del eluyente se puede incrementar paulatinamente a 30% de CH₃CN (0,1% de TFA)/agua (0,1% de TFA) durante 1 min y se puede iniciar una tasa de gradiente lineal de 0,5%/min de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA), y mantener hasta que el péptido deseado se eluye completamente de la columna. Las fracciones que contienen el producto se pueden analizar en una columna C-18 analítica de fase inversa de Waters XTerra (10 μL, 120 Å) y las fracciones que contienen el producto con una pureza >95% se pueden agrupar y liofilizar para proporcionar el péptido monómero de disulfuro cíclico (13) (0,12 g, rendimiento del 24%) con una pureza >95%. Los 10 g de monómero de péptido crudo se pueden purificar en serie de esta manera.

A continuación se describe un método representativo para la preparación del péptido dímero precursor (16), disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(-Adoa-Adoa-Glut-K)-NH₂]-NH₂. La preparación del péptido dímero precursor se puede llevar a cabo mediante la fijación de los péptidos monómeros en un procedimiento de dos etapas. En primer lugar, Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK-[K(ivDde)]-NH₂ (12) se puede hacer reaccionar con glutarato de disuccinimidilo (DSG, 5 eq.) en DMF en presencia de DIEA (5 eq.) durante 30 min. La mezcla de la reacción se puede diluir con acetato de etilo, lo que da como resultado la precipitación del mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico del péptido. El material sobrenadante, que contiene DSG sin reaccionar, se puede decantar y el mono-éster de NHS se puede lavar varias veces con acetato de etilo para eliminar las trazas de DSG. Los datos de los espectros de masas confirman la formación del mono-éster de NHS como un producto puro. Este se puede disolver de nuevo en DMF y hacer reaccionar con péptido monómero Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH₂ (13) en presencia de DIEA (5 eq.). Los resultados de HPLC y MS indican la formación del dímero portador de ivDde, como un solo producto principal. El grupo protector ivDde sobre la ε-amina de Lys del dímero se puede eliminar agitando la mezcla de la reacción con hidrazina (10%) en DMF durante 20 min. A continuación, la solución se puede acidificar con TFA y diluir con 10% de CH₃CN (0,1% de TFA)-agua (0,1% de TFA), aplicado a una columna C18 preparativa de HPLC de fase inversa y purificar mediante una elución en gradiente de acetonitrilo (0,1% de TFA) en 0,1% de TFA acuoso. A fin de proporcionar la cantidad necesaria de péptido dímero precursor, la reacción puede llevarse a cabo empleando desde 0,5 g hasta tanto como 1 g de cada uno de los péptidos monómeros. En todos los casos el péptido dímero precursor requerido se puede aislar con un rendimiento del ~32% y una pureza >95% que confirma la capacidad de reproducción y de adaptación a demandas incrementadas de los procedimientos.

La etapa final en la síntesis puede ser la conjugación de la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (18) con el péptido dímero precursor. Como se mencionó anteriormente, el resto PEG2000 de DSPE-PEG2000-NH₂ está formado formalmente por 45 unidades de etilenglicol. Se debe entender, sin embargo, que este material es una distribución de especies que contienen PEG cuyo centroide es el compuesto formal que contiene 45 unidades de etilenoxi.

La conjugación de DSPE-PEG2000-NH₂ con el péptido dímero precursor se puede llevar a cabo mediante la preparación de un mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico del dímero precursor y la reacción de éste con el grupo amino libre de la sal de amonio del fosfolípido. De este modo, el péptido dímero precursor portador de ivDde (16) puede reaccionar con DSG (4 eq.) en DMF en presencia de DIEA (5 eq.) durante 30 min. Al igual que en la preparación del péptido dímero precursor, la solución se puede diluir con acetato de etilo para precipitar el mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico del dímero (17), como un sólido. El material sobrenadante se puede decantar para eliminar el DSG sin reaccionar. El mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico del péptido dímero (17) se puede lavar entonces varias veces con acetato de etilo para eliminar las trazas de DSG. Los resultados del espectro de masas confirman la formación del mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico del péptido dímero como un producto puro.

El mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico del dímero (17) se puede disolver en DMF-CH₂Cl₂ (8:2) y hacer reaccionar con la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (0,9 eq.) en presencia de DIEA (4 eq.) durante 24 h. El éster de NHS (17) se puede utilizar en exceso para maximizar el consumo de la sal de amonio del fosfolípido porque cualquier fosfolípido libre puede complicar la purificación y el aislamiento del producto final. La mezcla de la reacción se puede diluir con agua (0,1% de TFA)-CH₃CN-CH₃OH (1:1) (0,1% de TFA) (~100 mL), se puede aplicar a una columna C4 de fase inversa (Kromasil® Prep C4, 10 µ, 300 Å, 50 x 250 mm, caudal 100 mL/min) y la columna se puede eluir con una mezcla de disolvente y agua (0,1% de TFA)-CH₃CN-CH₃OH (1:1) (0,1 % de TFA) para eliminar las impurezas hidrófilas. A continuación, el producto se puede eluir empleando un gradiente de CH₃CN-CH₃OH (1:1) (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA). Las fracciones recogidas se pueden analizar por HPLC de fase inversa usando un detector de ELS que permite la detección del producto deseado y la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ frecuentemente de separación dificultosa que no tiene un cromóforo UV fuerte. Esto indica la clara separación del conjugado de péptido dímero y fosfolípido, y la sal de amonio de fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂. Las fracciones que contienen el producto puro se pueden recoger, concentrar en un evaporador rotatorio (para reducir el contenido en metanol) y liofilizar para proporcionar el conjugado de péptido dímero y fosfolípido como un sólido incoloro.

Con el fin de preparar la cantidad necesaria de conjugado de péptido dímero y fosfolípido, se pueden realizar varias migraciones empleando 0,5 g a 1,0 g de péptido dímero precursor. En todos los casos el conjugado de péptido dímero diana y fosfolípido se puede aislar con un rendimiento del 57-60% y una pureza >99%. La cantidad a granel de conjugado de péptido dímero y fosfolípido, obtenida a partir de las migraciones en serie descritas anteriormente, se puede obtener mediante la disolución del producto procedente de las migraciones individuales en t-butanol-acetonitrilo-agua (1:1:3) seguido de liofilización. El procedimiento de Ellman para la estimación cuantitativa de tiol libre se puede aplicar a la muestra a granel del conjugado de péptido dímero y fosfolípido; el tiol libre, si está presente, estará por debajo del límite de detección. El análisis de la composición de aminoácidos proporciona unos resultados dentro de los límites aceptables, apoyando la estructura asignada del derivado peptídico. El análisis del espectro de masas MALDI-TOF también es compatible con la presunta estructura del conjugado de péptido dímero y fosfolípido.

Métodos de preparación de conjugados de dímeros-fosfolípidos que tienen niveles bajos o insignificantes de TFA

La presente invención también proporciona métodos para producir conjugados de péptidos dímeros-fosfolípidos que tienen niveles muy bajos de TFA. Mientras que ciertos métodos proporcionan la síntesis y la purificación de tales conjugados a una escala de gramo, se ha observado la formación de una versión liso de los conjugados durante el almacenamiento de material liofilizado a 5°C o durante el almacenamiento de soluciones acuosas de los conjugados. Se cree que el compuesto liso está formado por la hidrólisis ácida favorecida por TFA de uno de los ésteres de ácido graso de los fosfolípidos en los conjugados de péptidos dímeros-fosfolípidos.

Para obtener el péptido fosfolípido como un material estable que es portador de un contraíón farmacéuticamente aceptable, se descubrieron métodos altamente eficaces para la obtención de conjugados de péptidos dímeros-fosfolípidos que convierten las sales de TFA del conjugado de péptido dímero-fosfolípido, o cualquier precursor(es) adecuado(s), en sal(es) de acetato farmacéutica(s) análoga(s). Realizaciones representativas de estos métodos se proporcionan a continuación.

La Tabla 3 proporciona una descripción de las etiquetas de identificación que se muestran en las Figuras 6, 7 y 8.

Tabla 3

21	Disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYPGGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH ₂ }-NH ₂
22	Disulfuro cíclico (2-12) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH ₂ • nNTFA
23	Disulfuro cíclico (2-12) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH ₂ • xHOAc

24	Mono-éster de NHS de glutarilo-péptido 23 disulfuro cíclico (2-12) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[NHS-Glut-K(ivDde)]-NH ₂
25	Disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH ₂ • yTFA
26	Disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH ₂ • zHOAc
27	Disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCBDDWYYCWLFGTGGGK[disulfuro cíclico (2-12) de AcVCWEDSWG-GEVCFRYDPGGGK(-Adoa-Adoa-Glut-K)-NH ₂]-NH ₂ X HOAc
28	Mono-éster de NHS de glutarilo-péptido 27 disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(NHS-Glut)]-NH ₂ }-NH ₂
29	DSPE-PEG2000-NH ₂

en donde m, n, x, y, z son variables que dependen de las condiciones de liofilización.

Haciendo referencia ahora a las Figuras 6 y 7, en ciertas realizaciones, componentes de péptidos monómeros del péptido heterodímero (27), a saber, los compuestos de sales de TFA (22) y (25), se someten a cromatografía de intercambio iónico sobre una resina macroporosa de intercambio catiónico de ácido sulfónico AG MP-50, utilizando un gradiente por etapas de acetato de amonio para convertirlos en sus sales de acetato. A continuación, los dos acetatos de péptidos monómeros (23) y (26) se pueden fijar a través de un enlazador de glutarilo para formar el dímero (27) como una sal de acetato. La purificación de la sal de acetato del dímero crudo (27), mediante HPLC preparativa con C-18 utilizando un método de gradiente lineal que emplea CH₃CN/H₂O conteniendo cada uno NH₄OAc 10 mM, proporciona el acetato de dímero puro (27). La conjugación de este dímero con DSPE-PEG2000-NH₂ (29) y la purificación final de la mezcla cruda mediante HPLC preparativa con C-3 usando CH₃CN/H₂O/NH₄OAc, proporciona el compuesto (21) como la sal de acetato.

Más específicamente, los compuestos (22), (25) y (27), todos ellos son portadores de ácido carboxílico de cadena lateral y grupos amino. AG MP-50, una resina de intercambio catiónico macroporosa, se puede utilizar para permitir la penetración completa de la resina con los péptidos y para explotar la fijación de los péptidos a través de sus grupos básicos (amino y guanidina). Las sales de TFA de los péptidos se pueden adsorber a una columna AG MP-50 (en forma de ácido sulfónico) y la columna se puede lavar con agua y luego eluir con un gradiente en etapas de NH₄OAc en 0 o 30% de CH₃CN/H₂O, dependiendo de la solubilidad de los péptidos. Los péptidos se pueden eluir a aproximadamente NH₄OAc 600 mM y la forma acetato de los péptidos se puede obtener a continuación, en forma pura. Tanto el análisis de Cl por flúor y el análisis de contraiones de TFA por EC, muestran de manera constante un contenido muy bajo en TFA de los péptidos.

Los métodos preferidos también incluyen una redisolución/reliofilización de los péptidos finales, varias veces, para eliminar el NH₄OAc residual. De lo contrario, las trazas residuales de NH₄OAc presentes en los péptidos pueden dar lugar a amoníaco libre en presencia de DIEA. Esto puede dar como resultado la formación de péptido-Glut-amida no deseada, como un producto principal en la preparación posterior de (27) a partir de los monómeros (23) y (26) o del conjugado de péptido dímero-fosfolípido final (21) a partir de la sal de acetato de (27).

Haciendo referencia ahora a la Figura 7, otra realización proporciona la conversión de la sal de TFA del dímero (27) en su sal de acetato análoga, mediante cromatografía de intercambio iónico sobre la resina macroporosa de intercambio catiónico de ácido sulfónico, AG MP-50. Este acetato dímero se puede conjugar a continuación con DSPE-PEG2000-NH₂ seguido de purificación del material crudo mediante una columna preparativa C-3 usando CH₃CN/H₂O/NH₄OAc para proporcionar el compuesto final (21) como una sal de acetato.

Mientras que los métodos descritos anteriormente y en las Figuras 6 y 7 se proporcionan excelentes resultados, el segundo enfoque tiene la ventaja de requerir menos etapas. Detalles adicionales se proporcionan a continuación en la sección de Ejemplos.

Volviendo a la Figura 8, otra realización proporciona métodos para proporcionar conjugados dímeros que tienen cantidades mínimas de TFA, utilizando la diferencia de tamaño entre el conjugado de fosfolípido-péptido (21) y los iones de TFA. En esta realización un aducto de 21 • nTFA se puede eluir hacia abajo en una columna de exclusión por tamaño, en presencia de tampón de bicarbonato de amonio. El 21 • nTFA crudo se puede liberar inicialmente del compuesto liso mediante HPLC preparativa en una columna C-3 de Zorbax usando un gradiente lineal de acetonitrilo

en agua. Ambas fases pueden estar tamponadas con acetato de amonio 10 mM. Esto proporciona la separación del compuesto liso, tal y como se indica mediante HPLC analítica.

Para reducir aún más la cantidad de TFA, el material se puede aplicar a una columna G-25 de Sephadex y eluir con solución de bicarbonato de amonio acuoso. El eluato se puede vigilar mediante HPLC. Las fracciones que contienen el producto se pueden agrupar y liofilizar para obtener el material deseado (21), esencialmente exento de TFA y con tasas elevadas de recuperación. Más adelante se proporcionan detalles adicionales en la sección de Ejemplos.

Los conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros y dímeros descritos en este documento se pueden incorporar en agentes de contraste para ultrasonidos, tales como, por ejemplo, microvesículas llenas de gas. Tales microvesículas llenas de gas incluyen, por ejemplo, microburbujas llenas de gas, microglobos llenos de gas, microcápsulas llenas de gas, etc. En una realización preferida, los conjugados de fosfolípidos y péptidos se pueden incorporar en agentes de contraste para ultrasonidos que comprenden microburbujas llenas de gas. Los métodos de preparación de microburbujas llenas de gas a partir de fosfolípidos y de conjugados de fosfolípidos son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las microburbujas de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por métodos descritos en cualquiera de los siguientes documentos de patentes: EP 554213, WO 04/069284, Patente de EE.UU. n.º 5.413.774, Patente de EE.UU. n.º 5.578.292, EP 744962, EP 682530, Patente de EE.UU. n.º 5.556.610, Patente de EE.UU. n.º 5.846.518, Patente de EE.UU. n.º 6.183.725, EP 474833, Patente de EE.UU. n.º 5.271.928, Patente de EE.UU. n.º 5.380.519, Patente de EE.UU. n.º 5.531.980, Patente de EE.UU. n.º 5.567.414, Patente de EE.UU. n.º 5.658.551, Patente de EE.UU. n.º 5.643.553, Patente de EE.UU. n.º 5.911.972, Patente de EE.UU. n.º 6.110.443, Patente de EE.UU. n.º 6.136.293, EP 619743, Patente de EE.UU. n.º 5.445.813, Patente de EE.UU. n.º 5.597.549, Patente de EE.UU. n.º 5.686.060, Patente de EE.UU. n.º 6.187.288 y la Patente de EE.UU. n.º 5.908.610. Los métodos descritos en el documento WO 04/069284 se prefieren particularmente.

Los fosfolípidos adecuados incluyen ésteres de glicerol con una o dos moléculas de ácidos grasos (iguales o diferentes) y ácido fosfórico, en donde el residuo de ácido fosfórico a su vez está unido a un grupo hidrófilo, tal como colina, serina, inositol, glicerol, etanol amina. Los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos son en general ácidos alifáticos de cadena larga, que contienen típicamente de 12 a 24 átomos de carbono, preferiblemente de 14 a 22, que pueden estar saturados o pueden contener una o varias insaturaciones. Ejemplos de ácidos grasos adecuados son ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. Los monoésteres de fosfolípidos son conocidos en la técnica como las formas "liso" del fosfolípido.

Otros ejemplos de fosfolípidos son los ácidos fosfatídicos, es decir, los diésteres de ácido glicerol-fosfórico con ácidos grasos, esfingomielinas, es decir, aquellos análogos de fosfatidilcolina en los que el residuo diéster de glicerol con ácidos grasos está reemplazado por una cadena de ceramida, cardiolipinas, es decir, los ésteres de 1,3-difosfatidilglicerol con un ácido graso, gangliósidos, cerebrósidos, etc.

Tal y como se usa en este documento, el término fosfolípidos incluye productos ya sean de origen natural, semisintético o preparados sintéticamente que se pueden emplear ya sea individualmente o como mezclas.

Los ejemplos de fosfolípidos de origen natural son lecitinas naturales (derivados de fosfatidilcolina (PC)), tales como, típicamente, lecitinas de soja o de yema de huevo. Ejemplos de fosfolípidos semisintéticos son los derivados parcial o totalmente hidrogenados de las lecitinas de origen natural.

Ejemplos de fosfolípidos sintéticos son, por ejemplo, dilauriloil-fosfatidilcolina ("DLPC"), dimiristoil-fosfatidilcolina ("DMPC"), dipalmitoil-fosfatidilcolina ("DPPC"), diaraquidoil-fosfatidilcolina ("DAPC"), diestearoil-fosfatidilcolina ("DSPC"), 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina ("MPPC"), 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina ("PMPC"), 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina ("PSPC"), 1-estearoil-2-palmitoil-fosfatidilcolina ("SPPC"), dioleoil-fosfatidilcolina ("DOPC"), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (etil-DSPC), dilauriloil-fosfatidilglicerol ("DLPG") y sus sales de metales alcalinos, diaraquidoil-fosfatidilglicerol ("DAPG") y sus sales de metales alcalinos, dimiristoil-fosfatidilglicerol ("DMPG") y sus sales de metales alcalinos, dipalmitoil-fosfatidilglicerol ("DPPG") y sus sales de metales alcalinos, diestearoil-fosfatidilglicerol ("DSPG") y sus sales de metales alcalinos, dioleoil-fosfatidilglicerol ("DOPG") y sus sales de metales alcalinos, ácido dimiristoil fosfatídico ("DMPA") y sus sales de metales alcalinos, ácido dipalmitoil fosfatídico ("DPPA") y sus sales de metales alcalinos, ácido diestearoil fosfatídico ("DSPA"), ácido diaraquidoil fosfatídico ("DAPA") y sus sales de metales alcalinos, dimiristoil fosfatidil-etanolamina ("DMPE"), dipalmitoil fosfatidiletanolamina ("DPPE"), diestearoilfosfatidil-etanolamina ("DSPE"), dimiristoil-fosfatidilserina ("DMPS"), diaraquidoil-fosfatidilserina ("DAPS"), dipalmitoil-fosfatidilserina ("DPPS"), diestearoil-fosfatidilserina ("DSPS"), dioleoil-fosfatidilserina ("DOPS"), dipalmitoil-esfingomielina ("DPSP") y diestearoil-esfingomielina ("DSSP").

Los fosfolípidos adecuados incluyen además fosfolípidos modificados mediante el enlace de los mismos a un polímero hidrófilo. Ejemplos de fosfolípidos modificados son fosfatidiletanolaminas (PE) modificadas con polietilenglicol (PEG), brevemente "PE-PEGs", es decir, fosfatidiletanolaminas en donde el resto hidrófilo etanolamina está unido a una molécula de PEG de peso molecular variable (por ejemplo, de 300 a 5000 Dalton), tal como DPPE-PEG, DSPE-PEG, DMPE-PEG o DAPE-PEG (en donde DAPE es 1,2-diaraquidoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina). Las composiciones también pueden contener otros compuestos anfifílicos que incluyen, por ejemplo, ácidos grasos, tales como

ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquidónico o ácido oleico; esteroides, tales como colesterol, o ésteres de esteroides con ácidos grasos o con ácidos de azúcar; glicerol o ésteres de glicerol que incluyen tripalmitato de glicerol, diestearato de glicerol, triestearato de glicerol, dimiristato de glicerol, trimiristato de glicerol, dilaurato de glicerol, trilaurato de glicerol, dipalmitato de glicerol; sales de alquil-amonio terciario o cuaternario, tales como 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano (DSTAP), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP) y mezclas o combinaciones de las mismas.

Preferiblemente, la formulación comprende al menos un componente que es portador de una carga neta global, tal como, por ejemplo, ácido fosfatídico, PE-PEG, ácido palmítico, ácido esteárico, etil-DSPC o DSTAP, preferiblemente en una cantidad molar menor de aproximadamente el 50%. Las formulaciones, particularmente las preferidas, pueden incluir mezclas de dos o más de los siguientes componentes: DSPC, DPPG, DPPA, DSPE-PEG1000, DSPE-PEG2000, ácido palmítico y ácido esteárico. Algunos fosfolípidos preferidos y formulaciones se exponen en los ejemplos. Se puede emplear cualquiera de los gases descritos en este documento o conocidos por el experto en la materia; sin embargo, se prefieren los gases inertes, tales como SF₆ o perfluorocarbonos como CF₄, C₃F₈ y C₄F₁₀, opcionalmente en mezcla por adición con otros gases tales como aire, nitrógeno, oxígeno o dióxido de carbono.

Las suspensiones de microburbujas preferidas de la presente invención se pueden preparar a partir de fosfolípidos utilizando procedimientos conocidos, tales como soluciones de liofilizado o secado por pulverización de los fosfolípidos crudos en un disolvente adecuado o usando los procedimientos descritos en los documentos EP 554213; WO 04/069284; patente de EE.UU. n° 5.413.774; patente de EE.UU. n° 5.578.292; EP 744.962; EP 682.530; patente de EE.UU. n° 5.556.610; patente de EE.UU. n° 5.846.518; patente de EE.UU. n° 6.183.725; EP 474.833; patente de EE.UU. n° 5.271.928; patente de EE.UU. n° 5.380.519; patente de EE.UU. n° 5.531.980; patente de EE.UU. n° 5.567.414; patente de EE.UU. n° 5.658.551; patente de EE.UU. n° 5.643.553; patente de EE.UU. n° 5.911.972; patente de EE.UU. n° 6.110.443; patente de EE.UU. n° 6.136.293; EP 619.743; Pat EE.UU. n° 5.445.813; patente de EE.UU. n° 5.597.549; patente de EE.UU. n° 5.686.060; patente de EE.UU. n° 6.187.288; y patente de EE.UU. n° 5.908.610. Preferiblemente, tal y como se describe en el documento de solicitud de patente internacional WO 04/069284, se puede preparar una microemulsión la cual contiene los fosfolípidos (por ejemplo, DSPC y/o DSPA) en mezcla por adición con un agente lioprotector (tal como, por ejemplo, hidratos de carbono, alcoholes de azúcar, poliglicoles y mezclas de los mismos, como se indica en detalle a continuación) y, opcionalmente, otros materiales anfífilos (tales como ácido esteárico), dispersados en una emulsión de agua y de un disolvente orgánico inmiscible en agua. Los disolventes orgánicos preferidos son aquellos que tienen una solubilidad en agua de 1,0 g/l o menor, preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 g/l e incluyen, por ejemplo, pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, 1-penteno, 2-penteno, 1-octeno, ciclopentano, ciclohexano, ciclooctano, 1-metil-ciclohexano, benceno, tolueno, etilbenceno, 1,2-dimetilbenceno, 1,3-dimetilbenceno, éter dibutílico y diisopropilcetona, cloroformo, tetracloruro de carbono, 2-cloro-1-(difluorometoxi)-1,1,2-trifluoroetano (enflurano), 2-cloro-2-(difluorometoxi)-1,1,1-trifluoroetano (isoflurano), tetracloro-1,1-difluoroetano, perfluoropentano, perfluorohexano, perfluoroheptano, perfluorononano, perfluorobenceno, perfluorodecalina, éter metilperfluorobutílico éter metilperfluoroisobutílico, éter etilperfluorobutílico, éter etilperfluoroisobutílico y mezclas de los mismos. El conjugado de péptido-fosfolípido de la invención se puede mezclar por adición junto con el fosfolípido que forma la envuelta de la microvesícula, en la microemulsión. Preferiblemente, en primer lugar se prepara una suspensión acuosa del conjugado de péptido-fosfolípido y de un PE-PEG (por ejemplo, DSPE-PEG2000), la cual se mezcla por adición a continuación junto con una emulsión acuosa-orgánica que comprende el fosfolípido y el agente lioprotector. Preferiblemente dicha mezcla se efectúa con calentamiento, por ejemplo, desde aproximadamente 40°C a 80°C.

Antes de la formación de la suspensión de microburbujas mediante dispersión en un vehículo acuoso, los polvos de fosfolípido liofilizado o secados por pulverización, se ponen en contacto con aire u otro gas. Cuando se ponen en contacto con el vehículo acuoso, los fosfolípidos en polvo cuya estructura se ha visto alterada, formarán segmentos en forma de lamela o de lámina que estabilizarán las microburbujas de gas dispersas en ellos. Este método permite la producción de suspensiones de microburbujas que son estables incluso cuando se almacenan durante periodos prolongados y que se obtienen por simple disolución de los fosfolípidos secos laminados (que se han almacenado en el seno de un gas deseado) sin sacudidas o cualquier agitación violenta.

Alternativamente, las microburbujas se pueden preparar suspendiendo un gas en una solución acuosa con una velocidad de agitación elevada, como se describe, p. ej., en el documento WO 97/29783. Un procedimiento adicional para la preparación de microburbujas se describe en el documento WO 2004/069284, que comprende preparar una emulsión de un disolvente orgánico en un medio acuoso en presencia de un fosfolípido y, posteriormente, liofilizar dicha emulsión, después de un lavado opcional y/o etapas de filtración. Algunos métodos de preparación preferidos se describen en los ejemplos.

La formulación para la preparación de las microburbujas llenas de gas puede comprender además ventajosamente, un aditivo de liofilización, tal como un agente con efecto crioprotector y/o lioprotector, y/o un agente de carga, por ejemplo, un aminoácido, tal como glicina; un hidrato de carbono, por ejemplo, un azúcar tal como sacarosa, manitol, maltosa, trehalosa, glucosa, lactosa o ciclodextrina, o un polisacárido tal como dextrano; o un poliglicol tal como polietilenglicol (por ejemplo, PEG-4000).

Cualquiera de estas composiciones para ultrasonidos también debería ser, en la medida de lo posible, isotónica con

la sangre. Por lo tanto, antes de la inyección, se pueden añadir pequeñas cantidades de agentes isotónicos a cualquiera de las suspensiones de agentes de contraste para ultrasonidos anteriores. Los agentes isotónicos son soluciones fisiológicas utilizadas comúnmente en medicina y que comprenden solución salina acuosa (NaCl al 0,9%), solución de glicerol al 2,6%, solución de dextrosa al 5%, etc. Adicionalmente, las composiciones para ultrasonidos pueden incluir aditivos convencionales farmacéuticamente aceptables, que incluyen, por ejemplo, agentes emulsio-

Cualquier gas biocompatible se puede utilizar en los agentes de contraste para ultrasonidos de la invención. El término "gas", tal y 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, un cicloalcano tal como ciclopropano, ciclobutano o ciclopenteno, un alqueno tal como etileno, propeno, propadieno o buteno, o un alquino 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 varios átomos de carbono y flúor, es decir, CF₄, C₂F₆, C₃F₈, C₄F₈, C₄F₁₀, CBrF₃, CCl₂F₂, 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. Los perfluorocarbonos adecuados incluyen, por ejemplo, CF₄, C₂F₆, C₃F₈, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₁₂, C₆F₂, C₇F₁₄, C₈F₁₈ y C₉F₂₀. Más preferentemente, el gas o la mezcla de gases comprende SF₆ o un perfluorocarbono seleccionado entre el grupo que consiste en C₃F₈, C₄F₈, C₄F₁₀, C₅F₂, C₆F₁₂, C₇F₁₄, C₈F₁₈, siendo C₄F₁₀ particularmente preferido. Véanse 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 una realización preferida el gas comprende C₄F₁₀ o SF₆, opcionalmente como una mezcla por adición con aire, nitrógeno, oxígeno o dióxido de carbono.

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*, frecuentemente denominado "precursor de gases"). Preferentemente, el precursor de gases y el gas que produce son fisiológicamente aceptables. El precursor de gases puede activarse con el pH, fotoactivarse, activarse con la temperatura, etc. Por ejemplo, ciertos perfluorocarbonos se pueden usar como precursores de gases activados con la temperatura. Estos perfluorocarbonos, tales como perfluoropentano, tienen una temperatura de transición a fase líquida/gaseosa superior a la temperatura ambiente (o la temperatura a la que se producen y/o se almacenan los agentes), pero inferior a la temperatura corporal; por tanto, sufren un cambio de fase y se convierten en un gas dentro del cuerpo humano.

Como se ha descrito anteriormente, 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 entre el grupo que consiste en aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono y mezclas de los mismos, siendo el equilibrio de la mezcla el gas A.

A menos que contenga un gas hiperpolarizado, que se sabe que requiere unas condiciones de almacenamiento especiales, el producto liofilizado se puede almacenar y transportar sin necesidad de controlar la temperatura de su entorno y, en particular, se puede suministrar a hospitales y a médicos para formular en el sitio 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 puede incluir dos recipientes separados o un recipiente de doble cámara. En el primer caso, preferentemente, el recipiente es un vial sellado con tabique convencional, en el que el vial que contiene el residuo liofilizado de la etapa b) está sellado con un tabique a través del cual se puede inyectar el vehículo líquido usando una jeringuilla cargada previamente de forma opcional. En este caso, la jeringuilla usada como recipiente del segundo componente, también se usa después para inyectar el agente de contraste. En el último caso, preferentemente, el recipiente de doble cámara es una jeringuilla de doble cámara y una vez que se ha reconstituido el material liofilizado y a continuación se ha mezclado adecuadamente o agitado suavemente, el recipiente se puede usar directamente para inyectar el agente de contraste. En ambos casos se proporcionan medios para dirigir o permitir la aplicación de suficiente energía formadora de burbujas en el contenido del recipiente. 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 una agitación manual suave para proporcionar productos reproducibles con un tamaño de microburbuja estable.

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 tales sistemas, es particularmente ventajoso si la fase acuosa se puede interponer entre el gas insoluble

en agua y el entorno, para incrementar la vida útil del producto. Cuando un material necesario para formar el agente de contraste todavía no está presente en el recipiente (p. ej., un ligando específico de una diana que se va a unir al fosfolípido durante la reconstitución), se puede envasar con los otros componentes del kit, preferentemente en una forma o un recipiente adaptado para facilitar la combinación adecuada con los otros componentes del kit.

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

En aplicaciones para ultrasonidos, los agentes de contraste formados por microburbujas estabilizadas con fosfolípidos pueden administrarse, por ejemplo, en dosis tales que la cantidad de fosfolípido inyectado esté en el intervalo de 0,1 a 200 µg/kg de peso corporal, preferentemente desde aproximadamente 0,1 a 30 µg/kg.

- 15 Las técnicas de obtención de imágenes con ultrasonidos que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen técnicas conocidas, tales como técnicas de obtención de imágenes con Doppler color, Doppler de potencia, Doppler de amplitud, imágenes acústicas estimuladas y técnicas bi o tridimensionales. La formación de imágenes se puede realizar en modos armónicos (frecuencia de resonancia) o modos fundamentales, prefiriéndose el segundo armónico.
- 20 Los agentes de contraste para ultrasonidos de la presente invención se pueden utilizar además en una variedad de métodos de formación de imágenes terapéuticas. La expresión formación de imágenes terapéuticas incluye dentro de su significado un agente de formación de imágenes por contraste (por ejemplo, para la entrega de un agente terapéutico a un receptor o un tejido seleccionado) para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad en un paciente, y que es capaz de ejercer o es responsable de ejercer un efecto biológico *in vitro* y/o *in vivo*. La formación de imágenes terapéuticas puede estar asociada ventajosamente con la destrucción localizada y controlada de las microvesículas llenas de gas, por ejemplo, por medio de una ráfaga de ultrasonidos a presión acústica elevada (típicamente mayor que la empleada generalmente en los métodos no destructivos de formación de imágenes para diagnóstico). Esta destrucción controlada se puede utilizar, por ejemplo, para el tratamiento de coágulos de sangre (una técnica también conocida como sonotrombolisis), opcionalmente en combinación con la liberación localizada de un agente terapéutico adecuado. Alternativamente, dicha formación de imágenes terapéuticas puede incluir la administración de un agente terapéutico en las células, como resultado de una permeabilización transitoria de la membrana a nivel celular, inducida por una ráfaga localizada de las microvesículas. Esta técnica se puede utilizar, por ejemplo, para la administración eficaz de material genético en las células; opcionalmente, se puede administrar localmente un fármaco en combinación con material genético, permitiendo de este modo una terapia farmacéutica/genética combinada del paciente (por ejemplo, en caso de tratamiento de tumores).

- La expresión "agente terapéutico" incluye dentro de su significado cualquier sustancia, composición o partícula que se puede utilizar en cualquier aplicación terapéutica, tal como en métodos para el tratamiento de una enfermedad en un paciente, así como cualquier sustancia que es capaz de ejercer o es responsable de ejercer un efecto biológico *in vitro* y/o *in vivo*. Los agentes terapéuticos incluyen por tanto cualquier compuesto o material capaz de ser utilizado en el tratamiento (incluyendo el diagnóstico, la prevención, el alivio, el alivio del dolor o la curación) de cualquier estado patológico en un paciente (incluyendo enfermedad, malestar, lesión por enfermedad o herida). Ejemplos de agentes terapéuticos son fármacos, productos farmacéuticos, agentes bioactivos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, proteínas, péptidos naturales o sintéticos, incluyendo oligopéptidos y polipéptidos, vitaminas, esteroides y material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos y plásmidos.

Materiales y métodos analíticos

- Los disolventes para las reacciones, la purificación cromatográfica y análisis con HPLC eran disolventes de calidad E. Merck Omni de VWR Corporation (West Chester, PA). N-metilpirrolidinona (NMP) y N,N-dimetilformamida (DMF) se obtuvieron a partir de Pharmco Products Inc. (Brookfield, CT), y tenían calidad para la síntesis de péptidos o calidad requerida de Biotech bajo en agua/exenta de amina. La piperidina (calidad de secuenciación, bidestilada 99+%) y el ácido trifluoroacético (TFA) (calidad espectrofotométrica o calidad de secuenciación) se obtuvieron a partir de Sigma-Aldrich Corporation (Milwaukee, WI) o de la División Química Fluka de Sigma-Aldrich Corporation. N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), fenol (99%), N,N'-diisopropiletilamina (DIEA) y triisopropilsilano (TIS) fueron adquiridos a partir de Sigma-Aldrich Corporation. Los aminoácidos protegidos con Fmoc, los dipéptidos de pseudoprolina, Fmoc-Asp(O-tBu)-Ser(ψ^{MeMe}pro)-OH y Fmoc-Gly-Thr(ψ^{MeMe}pro)-OH y N-hidroxibenzotriazol (HOBt) se obtuvieron a partir de Novabiochem (San Diego, CA). El ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (Adoa) se obtuvo a partir de NeoMPS Corp (San Diego, CA) o Suven Life Sciences (Hyderabad, India). El glutarato de disuccinimidilo (DSG) y la sal de amonio de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-etanolamina-N-[amino(polietilenglicol)2000], [DSPE-PEG2000-NH₂] se obtuvieron a partir de Pierce Chemical Co. (Rockford, TL.) y Avanti[®] Polar Lipids (Alabaster, AL), respectivamente.

Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH y Fmoc-Gly-Gly-OH se prepararon en el laboratorio a partir de la diglicina o triglicina correspondiente mediante reacción con Fmoc-OSu. Una resina de intercambio iónico AG MP-50 se obtuvo a partir de Bio-Rad (Hercules, CA).

5 Los datos de la HPLC analítica se obtuvieron generalmente usando un sistema con un gradiente de doble bomba de Shimadzu LC-10AT VP, empleando una columna de 4,6 x 50 mm de Waters XTerra MS-C18, (tamaño de partícula: 5 μ ; 120 Å de tamaño de poro) y sistemas de elución con gradiente o isocráticos, empleando agua (0,1% de TFA) como eluyente A y CH₃CN (0,1% de TFA) o CH₃CN-CH₃OH (1:1, v/v) (0,1% de TFA) como eluyente B. La detección de los compuestos se realizó empleando UV a 220 y 254 nm. La pureza de los derivados de fosfolípido-PEG-péptido se determinó sobre una columna YMC C-4 (5 μ M, 300 Å, 4,6 x 250 mm) una 300 SB-C3 de Zorbax (3,5 μ M; 300 Å, 3 x 150 mm) usando un detector de dispersión de luz SEDEX 55 (LSD) y con un detector de UV.

10 La HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema de gradiente de doble bomba de Shimadzu LC-8A equipado con un detector de UV SPD-10AV equipado con una celda de flujo preparativa. En general, la solución que contenía el péptido crudo se cargó en una columna C18, C4 o C3 de fase inversa, dependiendo de las características del compuesto, utilizando una tercera bomba conectada al sistema de gradiente preparativo de doble bomba de Shimadzu LC-8A. Después de aplicar la solución de la mezcla de producto crudo a la columna de HPLC preparativa, los disolventes de la reacción y los disolventes empleados como diluyentes, tales como DMF o DMSO, se eluyeron de la columna en la composición de fase orgánica baja. A continuación, el producto deseado se eluyó usando un gradiente de elución de eluyente B en eluyente A. Las fracciones que contenían el producto se combinaron basándose en su pureza determinada por HPLC analítica y análisis espectral de las masas. Las fracciones combinadas se liofilizaron para proporcionar el producto deseado.

15 Los análisis de la composición de aminoácidos se realizaron en el Laboratorio Keck Biotechnology Resource de la Universidad de Yale, New Haven, CT. Los datos espectrales de las masas se obtuvieron a partir de MScan Tnc. (606 Brandywine Parkway, West Chester PA 19380) o se obtuvieron en nuestro laboratorio en un Espectrómetro de Masas LC-MSD Agilent 1100. Para los fines de selección y caracterización de los productos, se obtuvieron normalmente valores espectrales de masas usando APT-ES en modo de iones negativos. En general, el peso molecular de los péptidos diana era ~3000; los espectros de masas por lo general mostraban valores de masa de iones cargados negativamente de forma doble o triple en lugar de [MH]⁻. Estos se emplearon generalmente para la selección de fracciones para la recogida y la combinación para obtener el péptido puro durante la purificación por HPLC. En algunos casos, las fracciones mostraron picos dominantes atribuibles a [M-2H]/2 + 57 o [M-2H]/2 + 114 en el espectro de masas. Estos picos se deben a la formación de productos de adición de una o dos moléculas de ácido trifluoroacético por molécula del péptido. Después de una recogida cuidadosa de las fracciones comparando los resultados de MS y las purezas de HPLC y el procedimiento de liofilización, se disolvió una pequeña cantidad del sólido esponjoso aislado disuelto en agua (0,5 mg/ml) y se trató con una gota de N-metil-D-glucamina acuosa (~0,5 M). Esta solución se analizó por HPLC y MS para obtener resultados de pureza final del péptido purificado. Las soluciones de péptido en presencia de N-metil-D-glucamina no mostraron los picos de valores de masa [M-2H]/2 + 57 o [M-2H]/2 + 114 en el espectro de masas, en su lugar se observaron los picos esperados [M-2H]/2 o [M-3H]/3.

20 Los siguientes Ejemplos proporcionan un detalle adicional de los procedimientos eficaces utilizados para la obtención de grandes cantidades de formas de pureza elevada de los conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros y dímeros. Estos Ejemplos también describen la preparación de microburbujas dirigidas representativas que incluyen estos conjugados de fosfolípidos y péptidos monómeros y dímeros. Estos ejemplos también describen el uso de tales microburbujas dirigidas en ensayos de unión estática en células transfectadas con KDR y ensayos de unión dinámica en proteína quimérica rh VEGF-R2/Fc. Los Ejemplos describen adicionalmente la evaluación de agentes de contraste para ultrasonidos que contienen lipopéptidos que se unen a KDR en un modelo de tumor VX2 de conejo.

45 **EJEMPLOS**

Los Ejemplos 1-2 a continuación se refieren al conjugado de péptido monómero y fosfolípido mostrado en la Figura 2. Un procedimiento para la síntesis de este compuesto se muestra en la Figura 1. Aunque estos Ejemplos se refieren más específicamente al procedimiento para sintetizar el compuesto mostrado en la Figura 2, se puede utilizar un procedimiento similar para preparar el conjugado de péptido monómero y fosfolípido mostrado en la Figura 10 y el monómero de péptido lineal (32) mostrado en la Figura 9, así como otros conjugados de péptidos monómeros-fosfolípidos. Además, el documento de solicitud de patente de EE.UU. en tramitación nº 10/661.156, presentada el 11 de septiembre de 2003, expone los métodos para la preparación de los péptidos monómeros.

EJEMPLO 1

55 Síntesis en fase sólida (SPPS) y purificación del péptido monómero lineal (2) Ac-RAQDWYYDEILSMADQLRHAFSLSGGGGK-NH₂, (SEQ ID NO. 2) Ac-Arg-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-NH₂; N-acetil-L-alanil-L-glutamil-L-aspartil-L-triptofil-L-tirosil-L-tirosil-L-aspartil-L-glutamil-L-isoleucil-L-leucil-L-seril-L-metionil-L-alanil-L-aspartil-L-glutamil-L-leucil-L-arginil-L-histidil-L-alanil-L-fenilalanil-L-leucil-L-seril-glicil-glicil-glicil-glicil-glicil-L-lisinamida.

El péptido monómero lineal (2) se sintetizó mediante un protocolo automatizado establecido en un sintetizador de péptidos SONATA[®]/Pilot usando resina Fmoc-Pal-Peg-PS (0,2 mmol/g), aminoácidos protegidos con Fmoc y activación con éster de HOBt mediado por DIC en DMF. La secuencia peptídica se sintetizó de manera escalonada por métodos de SPPS sobre la resina Fmoc-Pal-Peg-PS, típicamente a una escala de 10 mmol. Los acoplamientos de aminoácidos se llevaron a cabo con un exceso de 4 veces de cada aminoácido y la pareja de reactivos DIC-HOBt en DMF.

En un acoplamiento típico de un aminoácido, se utilizaron 5 mL de DMF seco por gramo de resina. El volumen total de DMF, calculado basándose en la resina usada, se distribuyó entre los aminoácidos, HOBt y DIC para la preparación de la solución. Por ejemplo, para la síntesis que implicaba 50 g (escala 10 mmol) de resina, el volumen calculado de 250 mL de DMF se distribuyó entre los aminoácidos (150 mL), HOBt (50 mL) y DIC (50 mL). El recipiente con aminoácidos en el sintetizador de péptidos Sonata Pilot se cargó con el aminoácido sólido seco (un exceso de 4 veces con respecto a la resina). Al inicio de la etapa de acoplamiento, el programa informático del aparato se empleó para administrar sucesivamente el volumen elegido de DMF (para la dilución del aminoácido) y HOBt (4 eq.) en DMF y DTC (4 eq.) en DMF y la mezcla por burbujeo de nitrógeno se inició y se llevó a cabo durante 4 min. Esto sirvió para preactivar el aminoácido y para asegurar la disolución completa de todos los componentes de la mezcla. Después de la activación, el programa informático mediaba en la transferencia de la solución del Fmoc-aminoácido activado al recipiente de reacción que contenía la resina. Después de completar la transferencia, el recipiente se agitó durante 3 h con burbujeo de nitrógeno recurrente. Después de 3 h de tiempo de acoplamiento, la resina se lavó a fondo con DMF (5 mL/g, 6x) y la escisión del grupo Fmoc se llevó a cabo con 25% de piperidina en DMF (5 mL/g) que contenía HOBt (0,1 M) (2 x 10 min). La resina se lavó a fondo con DMF (5 mL/g, 6x) para asegurar la eliminación completa de piperidina de la resina en la preparación para el acoplamiento de aminoácidos subsiguiente. En el caso de Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH y Fmoc-Gly-Gly-OH, la preactivación en la botella de aminoácidos no se llevó a cabo con el fin de minimizar la formación de dicetopiperazina durante el tiempo de activación tal y como se ha descrito en el texto. Por lo tanto, en estos dos casos, las soluciones de aminoácidos, HOBt y DIC se añadieron al recipiente de reacción de forma secuencial y el proceso de acoplamiento se llevó a cabo con activación "in situ".

Después de completar la elongación de la cadena, el grupo Fmoc del aminoácido N-terminal se eliminó de manera convencional, seguido por el lavado con DMF (*vide supra*). Después, el aminoácido N-terminal se protegió mediante tratamiento con mezcla de acetilación recién preparada (anhídrido acético 0,5 M, DIEA 0,125 M y HOBt 0,015 M en DMF/6 mL/g de resina), 2 x 20 min. Después de terminar la síntesis peptídica, la resina se trató con la mezcla de escisión, 'Reactivo B' (TFA:agua:fenol:triisopropilsilano, 88:5:5:2, v/v/p/v) (10 mL/g de resina) durante 4 h. Los elementos volátiles se eliminaron y la pasta obtenida de este modo se trituró con éter para proporcionar un sólido que se lavó con éter (3x) con centrifugación intercalada (para compactar los sólidos en suspensión con el fin de permitir la decantación del material sobrenadante) y después se secó a vacío para proporcionar el péptido requerido en forma de un sólido de color blancuzco. Una síntesis a escala 10 mmol del péptido monómero lineal (2) proporcionó 33,82 g (103% de la teoría) del péptido crudo. El rendimiento mayor que el teórico fue debido más probablemente a la humedad y a los disolventes residuales.

Purificación del péptido monómero lineal (2) Ac-RAQDWYYDEILSMADQLRHAFSLGGGGGK-NH₂, (SEQ ID NO. 2) Ac-Arg-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-NH₂; N-acetil-L-alanil-L-glutamil-L-aspartil-L-triptofil-L-tirosil-L-tirosil-L-aspartil-L-glutamil-L-isoleucil-L-leucil-L-seril-L-metionil-L-alanil-L-aspartil-L-glutamil-L-leucil-L-arginil-L-histidil-L-alanil-L-fenilalanil-L-leucil-L-seril-glicil-glicil-glicil-glicil-L-lisnamida.

Una porción de ~0,5 g del péptido monómero lineal crudo (2) se disolvió en una cantidad mínima de CH₃CN (~20 mL). El volumen de la solución se ajustó a ~100 mL con agua y, empleando una tercera bomba, la solución se cargó en una columna C18 preparativa de fase inversa (Waters, XTerra[®] Prep MS C18, 10 μ, 300 Å, 50 x 250 mm, caudal 100 mL/min), que se había equilibrado previamente con 10% de CH₃CN en agua (0,1% de TFA). La columna no se eluyó con el eluyente de equilibrado durante la aplicación de la solución de la muestra. Después, la solución de la muestra se aplicó a la columna, la composición del eluyente fue elevada paulatinamente a 20% de CH₃CN-agua (0,1% de TFA) durante 1 min, y un gradiente lineal con una tasa de 0,6%/min de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA) se inició y se mantuvo durante 50 min. Las fracciones se recogieron manualmente (15 mL) usando UV a 220 nm como un indicador de la elución del producto. Las fracciones recogidas se analizaron en una columna analítica C-18 de fase inversa de Waters XTerra (partícula de 5 μ, poro de 120 Å) y las fracciones que contenían el producto con una pureza >95%, se reunieron y se liofilizaron para proporcionar el correspondiente péptido monómero lineal puro (2). Típicamente, la purificación de 0,5 g de crudo (2) proporcionaron 0,12 g (rendimiento del 24%) del producto deseado (pureza >95%).

55 EJEMPLO 2

Preparación del conjugado de péptido monómero y fosfolípido (1) Ac-RAQDWYYDEILSMADQLRHAFSLGGGGGK(DSPE-PEG2000-NH-Glut)-NH₂ (SEQ ID NO.1); Ac-Arg-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-(DSPE-PEG2000-NH-Glut)-NH₂; N-acetil-L-arginil-L-alanil-L-glutamil-L-aspartil-L-triptofil-L-triptofil-L-aspartil-L-isoleucil-L-glutamil-L-leucil-L-serinil-L-metionil-L-alanil-L-aspartil-L-glutamil-L-leucil-L-arginil-L-histidil-L-alanil-L-fenilalanil-L-

leucil-L-serinil-glicil-glicil-glicil-glicil-L-lisinamida.

El conjugado de péptido monómero y fosfolípido (1), Ac-RAQDWYYDEILSMADQLRHAFSLGGGGGK(DSPE-PEG2000-NH-Glut)-NH₂ (SEQ ID NO. 1), se preparó por conjugación de (3), el mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico de péptido monómero (2), con la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (4).

5 Un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación magnética y un tapón con tabique se cargó secuencialmente con dimetilformamida anhidra (7,5 mL), glutarato de disuccinimidilo (DSG, 0,25 g, 0,75 mmol) y diisopropiletamina (0,10 g, 0,78 mmol) con agitación. El péptido monómero lineal sólido (2) (0,5 g, 0,152 mmol) se añadió en porciones a la solución anterior durante un período de 2 min; a continuación, la solución se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se diluyó hasta ~50 mL con acetato de etilo anhidro; esto dio como resultado la precipitación del mono-éster de NHS intermedio (3), mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico de péptido monómero (2). La solución se centrifugó para precipitar el mono-éster de NHS (3) como un sólido incoloro. El material sobrenadante que contenía un exceso de DSG, se decantó a partir del mono-éster de NHS sólido compactado (3), que se dispersó de nuevo en acetato de etilo, se centrifugó y se lavó dos veces más para eliminar las trazas restantes de DSG. El mono-éster de NHS sólido intermedio (3) así obtenido se disolvió en DMF anhidro (10,0 mL); se añadió diisopropiletamina (0,10 g, 0,78 mmol); y la mezcla se agitó.

Mientras tanto, la sal de amonio de fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (4) (0,38 g, 0,14 mmol, 0,9 eq.) se suspendió en diclorometano seco (2 mL) en un matraz por separado y se añadió ácido trifluoroacético (2 gotas) para protonar el oxígeno fosfodiéster, facilitando la solubilización de la sal de amonio del fosfolípido en diclorometano. Después, la solución clara se evaporó en un evaporador rotatorio para eliminar los elementos volátiles y se secó adicionalmente a vacío.

La sal de amonio sólida del fosfolípido (4) se disolvió en DMF (5 mL) y se transfirió a la solución agitada de mono-éster de NHS (3) y la mezcla resultante se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se diluyó hasta 100 mL con una mezcla 1:1 de CH₃OH y CH₃CN-agua (1:1, v/v) y los elementos insolubles se filtraron. La mitad de la solución filtrada se cargó en una columna preparativa C2 de fase inversa ((Kromasil[®] Prep C2, 10 μ, 300 Å, 50 x 250 mm) que se había equilibrado previamente con una mezcla 3:1 (v/v) de agua (0,1% de TFA) y CH₃OH-CH₃CN (1:1, v/v, 0,1% de TFA) con un caudal de 100 mL/min. Se debe tener en cuenta que la columna no se eluyó con el eluyente de equilibrado durante la carga de la muestra. Después de cargar la solución de la muestra, la columna se lavó con el eluyente de equilibrado hasta que se eluyó el tapón de DMF. La composición del eluyente fue elevada paulatinamente a 70% de CH₃OH-CH₃CN (1:1, 0,1% de TFA) durante 9 min y se inició un gradiente lineal de 0,75%/min de CH₃OH-CH₃CN (1:1, 0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA) y migró durante 40 min. Se recogieron las fracciones (15 mL) usando UV (220 nm) como un indicador de la elución del producto. En las fracciones se comprobó la pureza en un sistema de HPLC analítica (columna: YMC C-4, 5 μ, 300 Å, 4,6 x 250 mm) usando UV a 220 nm y un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD). Este último detector (ELSD) se empleó para detectar la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (4) que tiene muy poca absorbancia UV a 220 nm. Las fracciones que contenían el producto con una pureza >98%, y carentes de la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (4), se combinaron y se concentraron en un evaporador rotatorio para reducir el contenido en CH₃OH. La solución concentrada se diluyó a continuación con 10% de CH₃CN en agua hasta que se formó un precipitado floculante apenas visible. La solución resultante se liofilizó para proporcionar el conjugado de péptido monómero y fosfolípido (1) como un sólido incoloro. La segunda porción del conjugado de péptido monómero y fosfolípido crudo (1) se purificó tal y como se ha descrito anteriormente. El rendimiento combinado del conjugado de péptido monómero diana y fosfolípido (1) fue de 0,40 g (rendimiento del 47%).

Los ejemplos 3-5 a continuación se refieren al conjugado de péptido dímero y fosfolípido mostrado en la Figura 5. Los métodos representativos para sintetizar el conjugado dímero se muestran en las Figuras 3, 4, 6, 7 y 8.

EJEMPLO 3

45 Síntesis en fase sólida (SPPS), ciclación y purificación de péptidos monómeros (12) Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH₂ y (13) Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH₂

Los péptidos lineales se sintetizaron mediante un protocolo automatizado establecido en un sintetizador de péptidos SONATA[®]/Pilot usando resina Fmoc-Pal-Peg-PS (0,2 mmol/g), aminoácidos protegidos con Fmoc y activación con éster de HOBt mediada con DCI en DMF. La secuencia de péptidos en la resina Fmoc-Pal-Peg-PS se sintetizó por etapas por métodos de SPPS, típicamente a una escala de 10 mmol. El acoplamiento de aminoácidos se llevó a cabo con un exceso de 4 veces de cada uno de los aminoácidos y el reactivo DIC-HOBt en DMF.

En un acoplamiento típico de un aminoácido en la secuencia, se utilizaron 5 mL de DMF seco por gramo de resina. El volumen total de DMF, calculado basándose en la resina usada, se distribuyó entre los aminoácidos, HOBt y DIC para la preparación de la solución. Por ejemplo, para la síntesis que implicaba 50 g de resina, el volumen calculado de 250 mL de DMF se distribuyó entre los aminoácidos (150 mL), HOBt (50 mL) y DIC (50 mL). El recipiente de los aminoácidos en el sintetizador de péptidos SONATA[®]/Pilot se cargó con el aminoácido sólido seco (exceso de 4 veces con respecto a la resina). Al inicio de la etapa de acoplamiento, el volumen elegido de DMF y HOBt (4 eq.) en

DMF y DIC (4 eq.) en DMF, se administró sucesivamente y después de cada administración, se realizó una mezcla por burbujeo de nitrógeno. Después de suministrar el último reactivo, la mezcla por burbujeo de nitrógeno se inició y se llevó a cabo durante 4 min. Esto sirvió para activar previamente el aminoácido y para asegurar la disolución completa de todos los componentes de la mezcla.

- 5 Después de la activación, la solución del Fmoc-aminoácido activado se transfirió al recipiente de la reacción que contenía la resina. Después de completar la transferencia, el recipiente se agitó durante 3 h con burbujeo de nitrógeno recurrente. Después de las 3 h de tiempo de acoplamiento, la resina se lavó a fondo con DMF (5 mL/g, 6x) y se realizó la escisión del grupo Fmoc con 25% de piperidina en DMF (5 mL/g) que contenía HOBt (0,1 M) (2 x 10 min).
 10 La resina se lavó a fondo con DMF (5 mL/g, 6x) para asegurar la eliminación completa de piperidina de la resina para la preparación del acoplamiento de aminoácidos subsiguientes. En el caso de Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH y Fmoc-Gly-Gly-OH, la preactivación en la botella de aminoácidos no se llevó a cabo con el fin de minimizar la formación de dicetopiperazina durante el tiempo de activación, tal y como se describe en el texto. Por lo tanto, en estos dos casos, la solución del aminoácido, HOBt y DIC se añadió al recipiente de la reacción de forma secuencial y el proceso de acoplamiento se llevó a cabo con activación "in situ". Después de completar la elongación de la cadena, el grupo Fmoc del aminoácido N-terminal se eliminó de la manera convencional, seguido por un lavado convencional con DMF (*vide supra*). Después, el aminoácido N-terminal se protegió mediante tratamiento con una mezcla de acetilación recién preparada (anhídrido acético 0,5 M, DIEA 0,125 M y HOBt 0,015 M en DMF ~6 mL/g de resina), 2 x 20 min.

- 20 La funcionalización del grupo ε-amino de los restos de la lisina C-terminal de los péptidos monómeros (con Fmoc-Adoa o con Fmoc-Lys(ivDde) en caso necesario) se logró eliminando en primer lugar el grupo ivDde del grupo ε-amino con 10% de hidrazina recién preparada en DMF (5 mL/g de resina ~2 x 10 min). Para añadir Fmoc-Adoa o Fmoc-Lys(ivDde), el tiempo de acoplamiento se aumentó a 10 h. Después de terminar la síntesis del péptido, la resina se trató con la mezcla de escisión, 'Reactivo B' (TFA:agua:fenol:triisopropilsilano, 88:5:5:2, v/v/p/v) (10 mL/g de resina) durante 4 h. Después de la evaporación de los elementos volátiles a vacío, la pasta se trituró con éter para
 25 proporcionar un sólido que se recogió por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó. Una síntesis a escala 10 mmol de (12), Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH₂ proporcionó 30 g (103% de la teoría) del péptido crudo. En el caso de (13) Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH₂, una síntesis a escala 10 mmol proporcionó 28 g (107% de la teoría) del péptido crudo. Los rendimientos mayores que los teóricos son debido probablemente a la humedad y los disolventes residuales.

- 30 Ciclación de los péptidos lineales de dicisteína en péptidos de disulfuro cíclico

- Los péptidos de disulfuro cíclico se prepararon a partir de los correspondientes péptidos lineales de dicisteína mediante oxidación facilitada con DMSO utilizando DMSO/agua (95/5, v/v). El péptido lineal crudo se disolvió en la mezcla de disolvente (5 mL/g) en un vaso de precipitados de boca ancha, y el pH de la solución se ajustó a 8,5 mediante la adición de N-metil-D-glucamina sólida en porciones. La mezcla resultante se agitó durante 36 h a temperatura ambiente. A continuación, la solución se diluyó con acetonitrilo (50 mL/g) y la mezcla se agitó durante 2 min. El péptido sólido de disulfuro cíclico se recogió por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó.

Purificación de péptidos monómeros

Péptido monómero (12) disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH₂; Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys[Lys(ivDde)]-NH₂

- 40 Una porción de ~0,5 g del péptido monómero de disulfuro cíclico crudo (12) se disolvió en una cantidad mínima de DMSO (~3 mL). El volumen de la solución se ajustó a ~100 mL con 20% de CH₃CN-agua y, empleando una tercera bomba, la solución se cargó en una columna C18 preparativa de fase inversa (Waters, XTerra[®] Prep MS C18, 10 μ, 300 Å, 50 x 250 mm, caudal 100 mL/min), que se había equilibrado previamente con 10% de CH₃CN en agua (0,1% de TFA). Durante la aplicación de la solución de la muestra a la columna, se detuvo el flujo del eluyente de equilibro
 45 procedente del sistema de HPLC preparativa. Después de que se aplicara la solución de la muestra a la columna, el flujo del eluyente de equilibrio procedente del sistema de HPLC en gradiente, se reinició y la columna se eluyó con 10% CH₃CN-agua (0,1% de TFA) hasta que se eluyó el DMSO. A continuación, la composición del eluyente fue elevada paulatinamente a 35% de CH₃CN-agua (0,1% de TFA) durante 1 min después de lo cual se inició un gradiente lineal con una tasa de 0,5%/min de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA) y se mantuvo durante 50
 50 min. Se recogieron manualmente las fracciones (15 mL) usando UV a 220 nm como un indicador de la elución del producto. Las fracciones recogidas se analizaron en una columna C-18 analítica de fase inversa de Waters XTerra (partícula de 5 μ, poro de 120 Å) y las fracciones que contenían el producto con una pureza >95% se reunieron y se liofilizaron para proporcionar el péptido monómero de disulfuro cíclico (12) correspondiente. Típicamente, la purificación de 0,5 g de péptido monómero crudo (12) produjo 0,1 g (rendimiento del 20%) del producto deseado (pureza
 55 >95%).

Péptido monómero (13) disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH₂; Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-Lys(Adoa-Adoa)-NH₂

5 Siguiendo el procedimiento empleado para la purificación por HPLC del péptido monómero de disulfuro cíclico crudo (13) Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH₂ (0,5 g) disuelto en una mezcla de 20% de CH₃CN-agua (100 mL), se cargó en una columna preparativa C-18 de fase inversa (Waters, XTerra® Prep MS C18, 50 x 250 mm, partícula de 10 μ, poro de 300 Å, caudal de 100 mL/min), que se había equilibrado previamente con 10% de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA). Durante la aplicación de la solución de la muestra a la columna, se detuvo el flujo del eluyente de equilibrado procedente del sistema de HPLC preparativa. Después de aplicar la solución de la muestra a la columna, el flujo del eluyente de equilibrado procedente del sistema de HPLC en gradiente se reinició y la columna se eluyó con 10% de CH₃CN-agua (0,1% de TFA) durante 5 min. A continuación, la composición del eluyente fue elevada paulatinamente a 30% de CH₃CN (0,1% de TFA)-agua (0,1% de TFA) durante 1 min y se inició una elución en gradiente lineal con una tasa de 0,5%/min de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% TFA) y se mantuvo durante 50 min. Se recogieron manualmente las fracciones (15 mL) usando UV a 220 nm como un indicador de la elución del producto. Las fracciones se analizaron en una columna C-18 analítica de fase inversa de Waters XTerra (4,6 mm de diámetro interno x 50 mm, partícula de 5 μ, poro de 120 Å) y las fracciones que contenían el producto con una pureza >95% se reunieron y se liofilizaron para proporcionar el péptido monómero de disulfuro cíclico (13) correspondiente. Típicamente, la purificación de 0,5 g de péptido monómero crudo (13) produjo 0,12 g (rendimiento del 24%) del producto deseado (pureza >95%).

EJEMPLO 4

20 Preparación y purificación del péptido dímero precursor (16) disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSVVGGVECFRYDPGGGK(-Adoa-Adoa-Glut-K)]-NH₂-NH₂; disulfuro cíclico (6-13) de Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys[disulfuro cíclico (2-12) de 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)]-NH₂-NH₂

25 Como se muestra en la Figura 3, el glutarato de disuccinimidilo (DSG, 0,28 g, 0,86 mmol) se disolvió en dimetilformamida anhidro agitada (2,0 mL) y diisopropiletamina (0,11 g, 0,85 mmol) se añadió en una porción. A continuación, el péptido monómero sólido (12) Ac-AGPTWC*EDDWYYC*WLFGTGGGK-[K(ivDde)]-NH₂ (0,50 g, 0,17 mmol) se añadió en porciones a la solución agitada de DSG durante un período de dos minutos. Después de agitar durante 30 min a temperatura ambiente, la solución se diluyó con acetato de etilo anhidro hasta ~50 ml, (esto sirvió para precipitar el mono-éster de NHS intermedio (14)). Toda la mezcla se centrifugó y el material sobrenadante se decantó dejando el mono-éster de NHS intermedio (14) como un sólido incoloro. El producto sólido se resuspendió con acetato de etilo; la solución que contenía el mono-éster de NHS sólido suspendido (14) se centrifugó para separar el producto sólido y el material sobrenadante se decantó de nuevo. Este proceso de lavado se repitió dos veces para eliminar completamente el exceso de DSG.

35 El mono-éster de NHS sólido (14) se disolvió en dimetilformamida anhidro agitada (2,0 mL) y se añadió diisopropiletamina (0,11 g, 0,85 mmol). A continuación, el péptido monómero sólido (13), Ac-VC*WEDSWGGEVC*FRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH₂, (0,50 g, 0,19 mmol, 1,12 eq.) se añadió en porciones a la solución agitada durante un período de tres minutos y la mezcla resultante se agitó durante 18 h. La reacción se vigiló mediante espectrometría de masas; después de confirmar el consumo completo del mono-éster de NHS monoamida de ácido glutámico de péptido monómero (14), se añadió hidrazina pura (0,1 mL) para eliminar el grupo protector ivDde del dímero portador de ivDde (15) y la mezcla se agitó durante 20 min a temperatura ambiente.

40 A continuación, la solución se acidificó mediante la adición gota a gota de TFA y la mezcla se diluyó hasta 100 mL con 10% de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA). La solución se filtró para eliminar las partículas y la mitad de la solución clara se cargó en una columna preparativa C18 de fase inversa Waters, XTerra® Prep MS C18, 10 μ, 50 x 250 mm, caudal de 100 mL/min) equilibrada previamente con 10% de CH₃CN en agua (0,1% de TFA). Durante la aplicación de la solución de la muestra a la columna, se detuvo el flujo del eluyente de equilibrado procedente del sistema de HPLC preparativa. Después de aplicar la solución de la muestra se aplicó a la columna, el flujo del eluyente de equilibrado procedente del sistema de HPLC en gradiente fue reiniciado y la columna se eluyó con 10% de CH₃CN-agua (0,1% de TFA) con el fin de eliminar el DMF de la columna. Después de completar la elución del tapón de DMF, la composición del eluyente se incrementó a 20% de CH₃CN durante un minuto y la elución continuó con una tasa de gradiente lineal de 0,6%/min de CH₃CN (0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA). Se recogieron fracciones (15 mL) usando UV (220 nm) como un indicador de la elución del producto. Las fracciones se analizaron en una columna C18 de fase inversa (Waters MS C18, 4,6 mm de diámetro interno x 50 mm, partícula de 5 μ, poro de 120 Å) y las fracciones que contenían el producto con una pureza >95%, se agruparon y se liofilizaron para proporcionar el péptido dímero precursor (16) como un sólido incoloro, esponjoso. El péptido dímero precursor crudo restante (16) se purificó de la misma manera. A partir de 0,5 g de cada uno de los péptidos monómeros (12) y (13), se obtuvieron 320 mg (rendimiento total del 33%) del dímero deseado (16) (> 95% de pureza).

EJEMPLO 5

Preparación de conjugado de fosfolípido y péptido dímero que se une a KDR (11) disulfuro cíclico (6-13) de acetil-L-alanil-glicil-L-prolil-L-treonil-L-triptofil-L-cistinil-L-glutamil-L-aspartil-L-aspartil-L-triptofil-L-tirosil-L-tirosil-L-cistinil-L-triptofil-L-leucil-L-fenilalanil-glicil-L-treonil-glicil-glicil-glicil-L-lisil[disulfuro cíclico (2-12) de acetil-L-valil-L-cistinil-L-

triptofil-L-glutamil-L-aspartil-L-seril-L-triptofil-glicil-glicil-L-glutamil-L-valil-L-cistinil-L-fenilalanil-L-arginil-L-tirosil-L-aspartil-L-prolil-glicil-glicil-glicil-L-lisil(distearilfosfoetanolaminocarbonoxi-PEG2000-amino-8-amino-3,6-dioxaetanoil-8-amino-3,6-dioxaetanoil-glutaril-L-lisil)amida]-amida; disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDP-GGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH₂]-NH₂; disulfuro cíclico (6-13) de Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys{disulfuro cíclico (2-12) de 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(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH₂]-NH₂.

El dímero que se une a KDR (11) se puede preparar por conjugación del péptido dímero precursor (16), disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(-Adoa-Adoa-Glut-K)]-NH₂-NH₂, con la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (18) como se muestra en la Figura 4.

El péptido dímero precursor sólido (16) (0,5 g, 0,092 mmol) se añadió en porciones a una solución de glutarato de disuccinimidilo (DSG, 0,15 g, 0,46 mmol) y diisopropiletamina (0,06 g, 0,47 mmol) en DMF anhidro (3,0 mL) con agitación durante un período de 3 min. A continuación, la solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de la reacción se diluyó hasta ~50 mL con acetato de etilo anhidro; lo que dio lugar a la precipitación del mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico dímero precursor (17), el mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico del péptido dímero precursor (16). La solución se centrifugó para sedimentar 6 (*m/z*, ion neg., 1887,3 (M-3H)/3, 1415,1 (M-4H)/4, 1131,9 (M-5H)/5) como un sólido incoloro. La capa de acetato de etilo sobrenadante que contenía un exceso de DSG se decantó desde el mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico dímero sólido compactado (17), que se volvió a suspender en acetato de etilo, se centrifugó y se lavó dos veces más para eliminar las trazas restantes de DSG. El derivado dímero de mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico intermedio sólido (17) así obtenido se disolvió en DMF/CH₂Cl₂ anhidro (8:2, v/v) (3,0 mL); se añadió diisopropiletamina (0,06 g, 0,47 mmol) y la solución se agitó.

Mientras tanto, la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (18) (0,235 g, 0,084 mmol, 0,9 eq.) se suspendió en diclorometano seco (2 mL) en un matraz por separado y se añadió TFA (2 gotas) para protonar el oxígeno fosfodiéster, facilitando la solubilización de la sal de amonio del fosfolípido (18) en diclorometano. La solución transparente se concentró para eliminar los elementos volátiles y se secó adicionalmente a vacío.

La sal de amonio de fosfolípido sólido (18) se disolvió en DMF (2 mL) y se transfirió a la solución agitada de derivado dímero de mono-éster de NHS monoamida de ácido glutárico (17) y la mezcla resultante se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se diluyó con una solución de 50% de CH₃OH, 25% de CH₃CN y 25% de agua (1:1) hasta ~100 mL y los materiales insolubles se filtraron. La mitad de la solución filtrada se cargó en una columna preparativa C4 de fase inversa (Kromasil[®] Prep C4, 10 μ, 300 Å, 50 x 250 mm) que se había equilibrado previamente con una mezcla 1:1 de CH₃OH y CH₃CN (1:1, 0,1% de TFA) y agua (0,1% de TFA) con un caudal de 100 mL/min. Durante la aplicación de la solución de la muestra a la columna, se detuvo el flujo del eluyente de equilibrado desde el sistema de HPLC preparativa. Después de cargar la solución de la muestra, el flujo del eluyente de equilibrado se reinició y la columna se lavó hasta que se eluyó el tapón de DMF.

La composición del eluyente se elevó después paulatinamente hasta 70% de CH₃OH-CH₃CN (1:1, 0,1% de TFA)-agua (0,1% de TFA) durante 1 min y se inició un gradiente lineal de 0,75%/min de CH₃OH-CH₃CN (1:1, 0,1% de TFA) en agua (0,1% de TFA). La elución continuó después de alcanzar el 100% de B con el fin de lograr la elución completa del producto desde la columna. Se recogieron fracciones (15 mL) usando UV (220 nm) como un indicador de la elución del producto y después de que el producto principal había eluido, continuó la recogida de fracciones durante varios minutos con el fin de asegurar la elución de cantidades traza de sal de amonio de fosfolípido (18) de partida. En las fracciones se comprobó la pureza en un sistema de HPLC analítica (columna: YMC C4, 5 μM, 300 Å, 4,6 x 250 mm) empleando UV a 220 nm y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD). El detector último se emplea para detectar DSPE-PEG2000-NH₂ que tiene un cromóforo débil a 220 nm. Las fracciones que contenían el producto con una pureza >98%, y carentes de la sal de amonio del fosfolípido DSPE-PEG2000-NH₂ (8) se combinaron y se concentraron para reducir el contenido en CH₃OH. La solución se diluyó después con 10% de CH₃CN en agua hasta que se formó un precipitado floculante apenas visible. La solución resultante se liofilizó para proporcionar el conjugado de péptido dímero y fosfolípido (11) como un sólido incoloro. La segunda porción de conjugado de péptido dímero y fosfolípido crudo (11) se purificó tal y como se ha descrito anteriormente. El rendimiento combinado del conjugado de péptido dímero diana y fosfolípido (11) fue de 0,39 g (rendimiento del 57%). Las muestras del conjugado de péptido dímero y fosfolípido (11) preparadas a partir de diferentes migraciones de purificación de muestras se agruparon, se disolvieron en una mezcla de terc-butanol-acetonitrilo-agua y se liofilizaron de nuevo para proporcionar el conjugado de péptido dímero y fosfolípido (11) como un sólido incoloro, esponjoso que se secó adicionalmente a vacío.

Los ejemplos 6-8 a continuación se refieren a la preparación del conjugado de péptido dímero-fosfolípido mostrado en la Figura 5, en donde el conjugado dímero contiene niveles muy bajos de TFA. Las Figuras 6-8 ilustran los métodos descritos en los Ejemplos a continuación.

EJEMPLO 6

Preparación de conjugado dímero que tiene un nivel bajo de TFA mediante el uso de una preparación de enlazador de glutarilo (23), (26) y sal de acetato del péptido dímero (27) mediante la conversión de las sales (22), (25) y péptido dímero 27 • nTFA a acetatos mediante una resina AG MP-50 de intercambio iónico

5 Para el compuesto (23) una resina de intercambio iónico AG MP-50 (1,5 meq./mL, lecho de resina) se suspendió en 20% de CH₃CN/H₂O. La suspensión se empaquetó en una columna de vidrio de 3 x 30 cm y el volumen final fue de 150 mL. La columna se conectó a una bomba y a un medidor de conductividad. Se lavó con 20% de CH₃CN/H₂O con un caudal de 17 mL/min hasta que la conductividad era inferior a 1 µs/cm. El compuesto (22) (210 mg) se disolvió en 20% de CH₃CN/H₂O (80 mL) y la solución resultante se cargó en la columna. La columna se lavó de nuevo con el mismo eluyente hasta que su conductividad era inferior a 1 µs/cm. Se aplicó un gradiente de NH₄OAc en 20% de CH₃CN/H₂O a 200 mM, 400 mM, 600 mM y 800 mM, 250 mL cada uno. El compuesto salió en NH₄OAc 600 mM. Las fracciones se analizaron mediante HPLC y las que contenían el compuesto se combinaron y se liofilizaron varias veces hasta que el peso del material era constante. Se obtuvieron 176 mg de material puro (23) como un sólido blanco esponjoso. El rendimiento fue de 83,8%.

15 Los parámetros adicionales y los resultados fueron los siguientes: HPLC: Tiempo de ret.: 5,6 min; Ensayo > 98% (% de área); Columna: Waters XTerra MS-C18, 4,6 x 50 mm, partícula de 5 µ, poro de 120 Å; Eluyente: A: H₂O (0,1% de TFA), B: CH₃CN (0,1% de TFA); Elución: Condiciones iniciales: 15% de B, gradiente lineal 15-50% de B durante 8 min; Caudal: 3 mL/min; Detección: UV a 220 nm; Espectro de masas: API-ES; Modo: Ion negativo; 1441,7 [M-2H]/2, 960,9 [M-3H]/3. Análisis EC (% de contraión peso/peso): TFA estimado en 0,3%; acetato 1,1%.

20 Para el compuesto (26), siguiendo el mismo procedimiento que para el compuesto (23), 300 mg de la sal de TFA del péptido (25) en 80 mL de agua, se cargaron a 17 mL/min hasta 150 mL en una columna AG MP-50, que se lavó con H₂O hasta tener una conductividad de 1 µs/cm. A continuación, la columna se lavó con H₂O otra vez después de la carga, y se aplicó el mismo gradiente en etapas de NH₄OAc acuoso en H₂O, tal como se empleó para el intercambio iónico del compuesto (23). La liofilización de las fracciones combinadas hasta tener un peso constante, proporcionó 200 mg del acetato (26) como un sólido blanco esponjoso. El rendimiento fue del 66,7%.

25 Los parámetros adicionales y los resultados fueron los siguientes: HPLC: Tiempo de ret.: 5,6 min; Ensayo 97,0% (% de área); Columna: Waters XTerra MS-C18, 4,6 x 50 mm, partícula de 5 µ, poro de 120 Å; Eluyente: A: H₂O (0,1% de TFA), B: CH₃CN (0,1% de TFA); Elución: Condiciones iniciales: 15% de B, gradiente lineal de 15-50% de B durante 8 min; Caudal: 3 mL/min; Detección: UV a 220 nm; **Espectro de masas**: API-ES; Modo: ion negativo; 1336,9 [M-2H]/2, 890,8 [M-3H]/3; **análisis EC** (% de contraión p/p): TFA estimado en 0,4%; acetato 4,2%; **análisis CI** (% de F): 0,26.

30 Para el acetato del péptido dímero (27), de forma similar al procedimiento para el compuesto (23), una columna AG MP-50 (100 mL de volumen en húmedo) se lavó con 30% de CH₃CN/H₂O hasta que la conductividad era inferior a 1 µs/cm. El compuesto (27) como la sal de TFA, (120 mg en 80 mL de 30% de CH₃CN/H₂O) se cargó en la columna y la columna se lavó con el mismo eluyente hasta que la conductividad era estable a 1 µs/cm. Se llevó a cabo un gradiente en etapas de 30% de NH₄OAc de CH₃CN/H₂O en 30% de CH₃CN/H₂O como para el compuesto (23) y el compuesto se eluyó a aproximadamente NH₄OAc 600 mM. Las fracciones reunidas se liofilizaron y luego se liofilizaron de nuevo varias veces hasta que el material mostraba un peso constante para proporcionar 104 mg del material puro (27) como un acetato. El rendimiento fue del 86,7%.

40 Los parámetros y resultados adicionales fueron los siguientes: HPLC: Tiempo de ret.: 5,2 min; Ensayo >99% (% de área); Columna: Waters XTerra MS-C18, 4,6 x 50 mm, partícula de 5 µ, poro de 120 Å; Eluyente: A: H₂O (0,1% de TFA), B: CH₃CN (0,1% de TFA); Elución: Condiciones iniciales: 20% de B, gradiente lineal de 20-60% de B durante 8 min; Caudal: 3 mL/min; Detección: UV a 220 nm; **Espectro de masas**: API-ES; Modo: ion negativo; 1816,3 [M-3H]/3, 1362,0 [M-4H]/4, 1089,2 [M-5H]/5; **análisis EC** (% de contraión p/p): TFA estimado en 0,2%; acetato 0,15%.

45 Preparación y purificación del acetato de péptido dímero (27) a partir del compuesto (23) y el compuesto (26)

A una solución de glutarato de disuccinimidilo (18 mg, 0,055 mmol) en DMF anhidro (0,1 mL) se añadió gota a gota una solución del compuesto (23) (61 mg, 0,021 mmol) en 0,2 mL de DMF anhidro (pH 8, neutralizado con DIEA). La solución transparente se agitó a TA durante 0,5 h. HPLC y MS mostraron la terminación de la reacción. Se eliminó el disolvente a vacío y se añadió EtOAc (8 mL) para precipitar el compuesto intermedio (24). La mezcla se centrifugó y se decantó para eliminar el exceso de glutarato. Este lavado con EtOAc se repitió 3 veces más y el producto sólido resultante se secó empleando una corriente de nitrógeno seco. A continuación, se disolvió en 0,3 mL de DMF anhidro. Se añadió el compuesto (26), (56 mg, 0,021 mmol) y el pH de la solución se ajustó a 8 mediante la adición de DIEA. La solución se agitó durante 16 h a temperatura ambiente después de lo cual el análisis con HPLC y MS indicó la finalización de la reacción. Se añadió una parte alícuota de 30 µL de NH₂NH₂ y la mezcla se agitó durante 5 min para escindir el grupo ivDde. La mezcla de la reacción se analizó por HPLC y MS, que indicaron la eliminación completa del grupo ivDde.

Antes de la purificación del acetato del péptido dímero (27), se tomó la precaución de lavar cuidadosamente todo el sistema de HPLC preparativa incluyendo la columna con los eluyentes exentos de TFA, CH₃CN/H₂O/NH₄OAc 10 mM. La mezcla de la reacción cruda se aplicó entonces a una columna preparativa C-18 de fase inversa (Atlantis C-18, partícula de 5 µm, poro de 100 Å, 30 x 150 mm, caudal de 30 mL/min), equilibrada previamente con 15% de B (A: NH₄OAc 10 mM en H₂O; B: NH₄OAc 10 mM en CH₃CN/H₂O, 9/1, v/v). La columna se lavó con el mismo eluyente hasta que se eluyó el tapón de DMF. La composición del eluyente se incrementó hasta 25% de B durante 2 min. y luego se elevó paulatinamente a 65% de B durante 40 min. Las fracciones se analizaron en una columna preparativa C-18 de fase inversa (Waters MS C-18, 4,6 x 50 mm, partícula de 5 µm, poro de 100 Å, caudal de 3 mL/min) y las fracciones que contenían el producto con >95% de pureza, se reunieron y se liofilizaron para proporcionar 25 mg del péptido dímero (27) como su sal acetato en forma de un sólido blanco esponjoso. El rendimiento fue del 21,8%.

Los parámetros adicionales y los resultados fueron los siguientes: **HPLC**: Tiempo de ret.: 5,2 min; Ensayo >99% (% de área); Columna: Waters XTerra MS-C18, 4,6 x 50 mm, partícula de 5 µm, poro de 120 Å; Eluyente: A: H₂O (0,1% de TFA), B: CH₃CN (0,1% de TFA); Elución: Condiciones iniciales: 20% de B, gradiente lineal de 20-60% de B durante 8 min; Caudal: 3 mL/min; Detección: UV a 220 nm; **Espectro de masas**: API-ES; Modo: ion negativo; [M-3H]⁺/3, 1362,0 [M-4H]⁺/4, 1089,2 [M-5H]⁺/5; **análisis EC** (% de contraión p/p): TFA estimado en menos del 0,2%; acetato 1,1%.

EJEMPLO 7 - Figura 7

Preparación de conjugados de péptidos dímeros-fosfolípidos que tienen niveles bajos de TFA a través de una resina de intercambio iónico

Preparación y purificación del conjugado de péptido y fosfolípido (21) como su sal acetato a partir de la sal acetato del péptido dímero (27)

A una solución de glutarato de disuccinimidilo-DSG (3,7 mg, 11,3 µmol) en DMF anhidro (0,1 mL) se añadió una solución de sal acetato del péptido dímero neutralizado (27) (15 mg, 2,75 µmol) en DMF anhidro (0,2 mL), gota a gota. La solución de la reacción se agitó a TA durante 0,5 h. El análisis por HPLC con una columna C-18 de Waters XTerra y MS mostró la finalización de la reacción. El disolvente se evaporó y se añadió EtOAc (8 mL) para precipitar el compuesto intermedio (28). El recipiente que contenía el producto intermedio precipitado (28) se centrifugó y la capa líquida se decantó. Este procedimiento se repitió 3 veces para eliminar el exceso de DSG. El producto sólido se secó con una corriente de nitrógeno seco y después se disolvió en 0,3 mL de DMF anhidro. La sal de amonio de DSPE-PEG2000-NH₂ (29) (6,5 mg, 2,33 µmol) se añadió en forma sólida y el pH de la mezcla se ajustó a (28). La mezcla de la reacción se agitó a TA durante 16 h. La mezcla se analizó mediante MS y HPLC con una columna 300 SB-C3 de Zorbax y esto indicaba que la reacción había finalizado.

Para minimizar la posible contaminación del producto con TFA, la mezcla de la reacción cruda se purificó mediante HPLC preparativa equipada empleando una nueva columna 300SB-C3 de Zorbax (21,2 x 150 mm, partícula de 5), que nunca se había expuesto a TFA. El sistema de HPLC se lavó previamente con CH₃CN/H₂O/NH₄OAc a fondo para eliminar las trazas de TFA. La mezcla de la reacción se cargó en la columna que se había equilibrado previamente con 20% de B (A: NH₄OAc 10 mM en H₂O; B: NH₄OAc 10 mM en CH₃CN/H₂O, 9/1 v/v) con un caudal de 30 mL/min. La columna se eluyó a 30 mL/min con el mismo eluyente hasta que se eluyó el tapón de DMF. A continuación, la composición del eluyente se incrementó a 40% de B durante 3 min y luego se elevó paulatinamente a 90% de B durante 50 min. Las fracciones recogidas se analizaron en una columna analítica C-3 de fase inversa (300SB-C3 de Zorbax, 3 x 150 mm, partícula de 3,5 µm, poro de 300 Å, caudal: 0,5 mL/min), en donde la detección se realizó utilizando UV a 220 nm y un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD). Las fracciones que contenían el producto puro se reunieron y se liofilizaron. Se obtuvo una porción de 6,5 mg de la sal de acetato del producto final (21). El rendimiento fue del 33,0%.

Los parámetros adicionales y los resultados fueron los siguientes: **HPLC**: Tiempo de ret.: 13,3 min; Ensayo >99% (% de área); Columna: 300SB-C3 de Zorbax, 3 x 150 mm, 3,5 µm, poro de 300 Å; Eluyente: A: H₂O (0,1% de TFA), B: CH₃CN/MeOH 1/1 (0,1% de TFA); Elución: Condiciones iniciales: 60% de B, gradiente lineal de 60-90% de B durante 3 min; Caudal: 0,5 mL/min; Detección: UV a 220 nm y ELSD; **análisis EC** (% de contraión p/p): % en peso de TFA: 0,3%; % en peso de acetato 0,4%.

EJEMPLO 8 - Figura 8

Preparación de conjugado dímero que tiene niveles bajos de TFA a través de una purificación secuencial usando cromatografía RP HPLC preparativa en C-3 de Zorbax y permeación en gel con G-25 de Sephadex

Los materiales utilizados y las condiciones para el sistema de HPLC analítica incluyen los siguientes: Columna: 300SB C-3 de Zorbax, 3 mm de diámetro interno x 150 mm; partícula de 3,5 µm; eluyente A: H₂O (calidad de HPLC con 0,1 % de TFA en volumen); Eluyente B: CH₃CN (0,1% de TFA en volumen). Elución: Condiciones iniciales: 50% de B, a continuación, un gradiente lineal de 50-90% de B durante 3 min, mantenido en 90% de B durante 11 min; caudal: 0,5 mL/min; Detección: UV a 220 nm. Tiempo de ret.: (Compuesto (21)): 6,77 min, Rt (liso): 4,06 min.

HPLC preparativa utilizando una columna preparativa C-3 de Zorbax para eliminar el compuesto liso de (21)

El compuesto crudo se cargó con una concentración de 30% de eluyente B. Los materiales utilizados y las condiciones incluyen: Condiciones: Columna: 300SB C-3 de Waters Zorbax; 21,2 mm de diámetro interno x 150 mm; partícula de 3,5 µm; Eluyentes: Eluyente A: H₂O (calidad HPLC con NH₄OAc 10 mM); Eluyente B: CH₃CN/H₂O, 9/1 (concentración final de NH₄OAc: 10 mM).

5

La composición del eluyente se cambió a continuación a 45% de B durante 2 min, a continuación, la columna se eluyó con un gradiente lineal de 45-100% de B durante 40 min; Caudal: 30 mL/min; Detección: UV a 220 nm.

El compuesto crudo (100 mg) se disolvió en 25 mL de una solución de 30% de B. El sistema de HPLC preparativa se equilibró en 30% de B. El compuesto se cargó en la columna C-3 de Zorbax. La composición de la fase móvil fue elevada paulatinamente a 45% de B durante 2 min. Un gradiente lineal de 45-100% de B durante 40 min se utilizó para la elución de (21). El producto se eluyó entre 26,5-33 min.

10

Las fracciones que contenían (21) se combinaron y se liofilizaron para proporcionar un sólido blanco esponjoso. Este se disolvió en agua-acetonitrilo, después se liofilizó de nuevo. Esto proporcionó 70 mg de producto carente del compuesto liso. La recuperación fue de aproximadamente el 70%. Después de completar la cromatografía, el sistema se lavó con 95% de B durante 15 min con un caudal de 30 mL/min. A continuación, la columna se lavó con CH₃CN/H₂O (50/50, sin TFA o tampón) durante 30 min con un caudal de 15 mL/min. La columna se almacenó a continuación a temperatura ambiente para un uso futuro. La HPLC analítica confirmó la ausencia del compuesto liso en el material aislado. Un análisis adicional confirmó que no se formaba ningún compuesto liso después de 5 días a temperatura ambiente. El material todavía contenía cantidades significativas (4,2% en peso) de TFA.

15

20 Eliminación de TFA de (21) mediante cromatografía de permeación en gel en Sephadex G-25

Una columna G-25 de Sephadex (100 g de resina, tamaño de perla 20-80 µm, volumen total del gel ~500 mL, altura de la columna: 27 cm) se equilibró con 4 L de bicarbonato de amonio 50 mM. A continuación, (21) (70 mg) se disolvió en 30 mL (volumen final) de bicarbonato de amonio 60 mM en acetonitrilo acuoso al 10%. La solución se filtró y después se cargó en la columna G-25 de Sephadex. La columna se eluyó con tampón de bicarbonato de amonio 50 mM recogiendo fracciones de 10 mL. Las fracciones recogidas se controlaron mediante HPLC analítica (detección UV a 220 nm). Los resultados se proporcionan en la Tabla 4 a continuación.

25

Tabla 4

Nº de Fracción	Volumen (mL)	Compuesto presente (mediante análisis de la fracción con HPLC)
1	10	No
3	10	No
6	10	No
9	10	No
12	10	No
15	10	No
18	10	No
19	10	No
20	10	Si
21	10	Si
24	10	Si
27	10	Si

ES 2 428 964 T3

Nº de Fracción	Volumen (mL)	Compuesto presente (mediante análisis de la fracción con HPLC)
28	10	Si
29	10	No

Las fracciones 20-28 se reunieron y se liofilizaron. El material liofilizado obtenido se disolvió de nuevo en un pequeño volumen de agua y la solución se congeló y se liofilizó para eliminar cantidades residuales de bicarbonato de amonio. El peso final del material deseado fue de 58 mg. La recuperación fue del 83%.

- 5 Para determinar la eliminación eficaz de TFA, la muestra se sometió a análisis de EC para el TFA y los iones de acetato. El TFA está claramente presente en el material de partida (4,2%) de acuerdo con el ensayo anterior, mientras que apenas se detecta (0,2%) después del procedimiento de permeación en gel. No se detectó ningún ion de acetato.

- 10 Los datos analíticos para (21) se obtuvieron mediante cromatografía HPLC preparativa en serie con C-3 de Zorbax y cromatografía de permeación en gel con G-25 de Sephadex.

- 15 Los materiales utilizados y las condiciones para la recogida de datos analíticos incluyen: análisis con flúor (CI mediante QTI): 751 ppm (0,15% de TFA peso/peso); Espectro de masas: Método: MALDI-TOF; Modo: iones positivos; el peso molecular promedio detectado fue 8461, se observó la típica curva de distribución de masas de PEG2000. HPLC: Sistema A: Columna: 300SB C-3 de Zorbax; 3 mm de diámetro interno x 150 mm; partícula de 3,5 µm; Eluyente A: Agua (calidad de HPLC con 0,1% de TFA en volumen); Eluyente B: acetonitrilo (0,1% de TFA en volumen). Condiciones iniciales: 50% de B; Elución: gradiente lineal de 50-90% de B durante 3 min, mantenido con 90% de B durante 11 min; Caudal: 0,5 mL/min; Detección: UV a 220 nm. Tiempo de ret.: 6,77 min; % de Área: 99,6%. Sistema B: Columna: 300SB C-3 de Zorbax; 3 mm de diámetro interno x 150 mm; partícula de 3,5 µm; Eluyente A: Agua (calidad de HPLC con 0,1% de TFA en volumen); Eluyente B: acetonitrilo (0,1% de TFA en volumen). Condiciones iniciales: 50% de B; Elución: gradiente lineal de 50-90% de B durante 3 min y después se elevó paulatinamente a 100% de B durante 12 min. Caudal: 0,5 mL/min; Detección: LSD; Tiempo de ret.: 13,98 min. % de Área: 99,3%.

- 20 La Tabla 5 más abajo proporciona definiciones de las abreviaturas utilizadas y de las fuentes de los materiales contemplados en los Ejemplos 9-12.

Tabla 5

DSPA.Na	(Genzyme) IUPAC: Sal sódica de ácido 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatídico
DPPG.Na	(Genzyme) IUPAC: Sal sódica de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol
DPPE	(Genzyme) IUPAC: 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPC	Diestearoil-glicero-fosfatidilcolina (Genzyme) IUPAC: 1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPG.Na	(Genzyme) IUPAC: Sal sódica de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol
DSPE-PEG1000	Diestearoil-glicero-fosfoetanolamina-N-metoxi(polietilenglicol)1000 (Avanti Polar)
DSPE-PEG2000	Diestearoil-glicero-fosfoetanolamina-N-metoxi(polietilenglicol)2000 (Avanti Polar)
Estearato*	Estearato Sódico (Fluka)
PEG4000	(polietilenglicol) PM 4000 (Fluka)
Manitol	(Fluka)
*la forma de ácido, es decir, ácido esteárico, también se puede utilizar en cualquiera de las preparaciones de microburbujas de esta memoria.	

EJEMPLO 9Preparación de microburbujas dirigidas con envuelta de DSPC/DPPGEjemplo 9A

5 Se solubilizaron 383 mg de una mezcla de DSPC/DPPG/ y conjugado de péptido dímero y fosfolípido (11) mostrado en la Figura 5 (relación molar 49,75/49,75/0,5, correspondiente a 187,1, 176,4 y 19,8 mg de los tres componentes, respectivamente) y PEG-4000 (22,6 g) en 120 g de alcohol t-butílico a 60°C, en un baño de agua. La solución se llenó en viales con 0,8 mL de solución de cada uno. Las muestras se congelaron a -45°C y se liofilizaron. El aire en el espacio superior fue sustituido por una mezcla de C₄F₁₀/Nitrógeno (50/50) y los viales se taparon y se prensaron. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con 5 mL de H₂O por vial.

10 Ejemplo 9B

El Ejemplo 9A se repitió usando una mezcla de DSPC/DPPG/conjugado de péptido monómero y fosfolípido (31) mostrado en la Figura 10 (relación molar de 49,5/49,5/1, correspondiente a 182,8, 172,3 y 28,2 mg de los tres componentes, respectivamente)

EJEMPLO 1015 Preparación de microburbujas dirigidas con envuelta de DPPE/DPPGEjemplo 10A

Una suspensión acuosa de DSPE-PEG1000 (0,43 mg - 0,24 µmol) y el conjugado de péptido monómero y fosfolípido (31) mostrado en la Figura 10 (3,0 mg - 0,5 µmol) se preparó en 500 µl de agua destilada a 60°C para obtener una suspensión micelar.

20 Por otra parte, DPPE (15,8 mg - 22,8 µmol) y DPPG (4,2 mg - 5,7 µmol) se dispersaron en una solución de manitol al 10% en agua destilada (20 mL) a 70°C durante 20 minutos. La dispersión se enfrió a continuación, hasta temperatura ambiente. Perfluoroheptano (1,6 mL) se emulsionó en la fase acuosa usando un homogeneizador de alta velocidad (Polytron PT3000, diámetro de la sonda de 3 cm) durante 1 minuto a 10500 rpm para obtener una emulsión.

25 La suspensión micelar se añadió a la emulsión y la mezcla resultante se calentó a 60°C durante 1 hora con agitación. Después de enfriar a temperatura ambiente (1 hora), la emulsión obtenida se dividió en fracciones de 4 mL en matraces de fondo redondo de 50 mL. La emulsión se congeló a -45°C durante 5 minutos y se liofilizó a 0,2 mbar durante 24 horas (liofilizador 1-8K de Christ Beta).

30 Antes de volver a dispersar, el material liofilizado se expuso a una atmósfera que contenía C₄F₁₀/nitrógeno (50/50 en volumen). Después, el producto liofilizado se dispersó en un volumen de agua dos veces el volumen inicial, con agitación manual suave.

Ejemplo 10B

Una suspensión acuosa de DSPE-PEG1000 (0,5 mg - 0,27 µmol) y el conjugado de péptido dímero y fosfolípido (11) mostrado en la Figura 5 (5,3 mg - 0,63 µmol) se preparó en 500 µl de agua destilada a 60°C para obtener una suspensión micelar.

35 Por otra parte, DPPE (15,8 mg - 22,8 µmol) y DPPG (4,2 mg - 5,7 µmol) se dispersaron en una solución de PEG4000 al 10% en agua destilada (20 mL) a 70°C durante 20 minutos. La dispersión se enfrió a continuación hasta temperatura ambiente. El perfluoroheptano (1,6 mL) se emulsionó en la fase acuosa usando un homogeneizador de alta velocidad (PT3000 de Polytron, diámetro de la sonda de 3 cm) durante 1 minuto a 10000 rpm para obtener una emulsión.

40 La suspensión micelar se añadió a la emulsión y la mezcla resultante se calentó a 80°C durante 1 hora con agitación. Después de enfriar a temperatura ambiente (1 hora), la emulsión obtenida se lavó una vez por centrifugación (200 g/10 min - centrífuga 3K10 de Sigma) para eliminar el exceso de fosfolípido. El material precipitado separado (que contenía microgotitas emulsionadas de disolvente) se recuperó y se volvió a suspender con el volumen inicial de una solución acuosa al 10% de PEG4000.

45 La emulsión obtenida se dividió en muestras en viales DIN8R (1 mL/vial). A continuación, los viales se enfriaron a -50°C (liofilizador 2-12DS de Christ Epsilon) y se liofilizaron a -25°C y 0,2 mbar durante 12 horas con una etapa de secado final a 30°C y 0,1 mbar durante 7 horas.

50 Los viales fueron expuestos a una atmósfera que contenía C₄F₁₀/nitrógeno (35/65 en volumen) y se sellaron. El producto liofilizado se volvió a dispersar en un volumen de agua dos veces el volumen inicial mediante agitación manual suave.

EJEMPLO 11**Preparación de microburbujas dirigidas con envuelta de DSPC/DSPA****Ejemplo 11A**

5 Una suspensión acuosa de DSPE-PEG1000 (2,5 mg - 1,4 μmol) y conjugado de péptido (11) mostrado en la Figura 5 (7,0 mg - 0,84 μmol) se preparó en 1 mL de agua destilada a 60°C para obtener una suspensión micelar.

Por otra parte, DSPC (16,3 mg - 20,6 μmol) y DSPA (3,7 mg - 5,15 μmol) se disolvieron en ciclooctano (1,6 mL) a 80°C. Esta fase orgánica se añadió a una solución al 10% de PEG4000 en agua (20 mL) usando un homogeneizador de alta velocidad (T3000 de Polytron, diámetro de la sonda de 3 cm) durante 1 minuto a 8000 rpm, para obtener una emulsión.

10 La suspensión micelar se mezcló con la emulsión y la mezcla resultante se calentó a 80°C durante 1 hora con agitación. Después de enfriar a temperatura ambiente (1 hora), la emulsión obtenida se lavó una vez por centrifugación (1500 g/10 min - centrífuga 3K10 de Sigma) para eliminar el exceso de fosfolípido. El material sobrenadante separado (que contenía microgotitas emulsionadas de disolvente) se recuperó y se volvió a suspender en dos veces el volumen inicial de una solución acuosa de PEG4000 al 10%.

15 La suspensión obtenida se dividió en muestras en viales DIN8R (1 mL/vial). A continuación, los viales se enfriaron a -50°C (liofilizador 2-12DS de Christ Epsilon) y se liofilizaron a -25°C y 0,2 mbar durante 12 horas, con una etapa de secado final a 30°C y 0,1 mbar durante 7 horas.

Los viales fueron expuestos a una atmósfera que contenía C_4F_{10} /nitrógeno (35/65 en volumen) y se sellaron.

20 Después, el producto liofilizado se dispersó en un volumen de agua dos veces el volumen inicial, con agitación manual suave.

Ejemplo 11B

El Ejemplo 11A se repitió, pero usando 0,7 mg de DSPE-PEG2000 (0,26 μmol) y 1,6 mg de conjugado de péptido monómero-fosfolípido (1) mostrado en la Figura 2 (0,26 μmol) para preparar la suspensión micelar.

Ejemplo 11C

25 DSPC (16,3 mg - 20,6 μmol), DSPA (3,7 mg - 5,15 μmol) y conjugado de péptido monómero y fosfolípido (1) mostrado en la Figura 1 (1,6 mg - 0,26 μmol) se disolvieron en ciclooctano (1,6 mL) a 80°C. Esta fase orgánica se emulsionó en una fase acuosa de PEG4000 al 10% (20 mL) usando un homogeneizador de alta velocidad (Polytron PT3000, diámetro de la sonda de 3 cm) durante 1 minuto a 8000 rpm para obtener una emulsión.

30 La emulsión resultante se calentó a 80°C durante 1 hora con agitación. Después de enfriar a temperatura ambiente (1 hora), la emulsión obtenida se diluyó con 20 mL de una solución acuosa al 10% de PEG4000.

35 La emulsión se dividió en muestras en viales DIN8R (1 mL/vial). A continuación, los viales se enfriaron a -50°C (liofilizador 2-12DS de Christ Epsilon) y se liofilizaron a -25°C y 0,2 mbar durante 12 horas con una etapa de secado final a 30°C y 0,1 mbar durante 7 horas. Los viales fueron expuestos a una atmósfera que contenía C_4F_{10} /nitrógeno (35/65 en volumen) y se sellaron. El producto liofilizado se volvió a dispersar en un volumen de agua dos veces el volumen inicial con agitación manual suave.

EJEMPLO 12**Preparación de microburbujas dirigidas con envuelta de DSPC/Estearato****Ejemplo 12A**

40 Una suspensión acuosa de DSPE-PEG2000 (2,5 mg - 0,9 μmol) y el conjugado de fosfolípido dímero (11) mostrado en la Figura 5 (2,5 mg - 0,3 μmol) se preparó en 660 μl de agua destilada a 60°C para obtener la suspensión micelar.

Por otra parte, DSPC (18,2 mg - 23,1 μmol) y estearato de (1,8 mg - 5,8 μmol) se disolvieron en ciclooctano (1,6 mL) a 80°C. Esta fase orgánica se añadió a una solución de PEG4000 al 10% en agua (20 mL) usando un homogeneizador de alta velocidad (Polytron T3000, diámetro de la sonda 3 cm) durante 1 minuto a 9000 rpm, para obtener una emulsión.

45 La solución micelar se mezcló con la emulsión y la mezcla resultante se calentó a 80°C durante 1 hora con agitación. Después de enfriar a temperatura ambiente (1 hora), la emulsión obtenida se lavó una vez por centrifugación (1500 g/10 min - centrífuga 3K10 de Sigma) para eliminar el exceso de fosfolípidos. Se recuperó el material sobrenadante separado (que contenía microgotitas emulsionadas de disolvente) y se suspendió de nuevo con dos veces el volu-

men inicial de una solución acuosa al 10% de PEG4000.

La suspensión obtenida se dividió en muestras en viales D1N8R (1 mL/vial). A continuación, los viales se enfriaron a -50°C (liofilizador 2-12DS de Christ Epsilon) y se liofilizaron a -25°C y 0,2 mbar durante 12 horas, con una etapa de secado final a 30°C y 0,1 mbar durante 7 horas.

- 5 Los viales fueron expuestos a una atmósfera que contenía C₄F₁₀/nitrógeno (35/65 en volumen) y se sellaron.

El producto liofilizado se dispersó en un volumen de agua dos veces el volumen inicial mediante agitación manual suave.

Ejemplo 12B

- 10 El Ejemplo 12A se repitió reemplazando el conjugado de péptido dímero y fosfolípido (11) mostrado en la Figura 5, por la misma cantidad molar relativa de conjugado de péptido monómero y fosfolípido (1) que se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 12C

- 15 El Ejemplo 11C se repitió con DSPC (18,2 mg - 23,1 µmol), estearato de sodio (1,8 mg - 5,8 µmol) y el conjugado de péptido dímero y fosfolípido (11) que se muestra en la Figura 5 (2,2 mg - 0,26 µmol). La velocidad de agitación para emulsionar se fijó en 9000 rpm. Después de enfriar a temperatura ambiente (1 hora), la emulsión obtenida se lavó una vez mediante centrifugación (1500 g/10 min - centrífuga 3K10 de Sigma) para eliminar el exceso de fosfolípido. Se recuperó el material sobrenadante separado (que contenía microgotitas emulsionadas de disolvente) y se volvió a suspender en dos veces el volumen inicial de una solución acuosa de PEG 4000 al 10%.

EJEMPLO 13

- 20 Ensayo de unión estática sobre células transfectadas con KDR

Producción y purificación del plásmido

KDR de longitud completa se clonó en el vector pcDNA6 y el plásmido se amplificó en DH5α de *E. coli* competente. La amplificación y la purificación del plásmido se llevó a cabo utilizando JM 109 de *E. coli* y un kit de Qiagen.

Transfección de células 293H en cubreobjetos de Thermanox®

- 25 Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos circulares de Thermanox® recubiertos con poli-D-lisina en placas de 24 pocillos. La transfección se realizó tal como se recomienda en el protocolo de lipofectamina 2000 (Invitrogen, nº de cat. 11668-019) utilizando 1 µg de ADN (pc-DNA6-fKDR)/por cubreobjetos (1,3 cm²) en 0,1 mL. La transfección se realizó en medio exento de suero, la mezcla de los reactivos de la transfección se retiró de las células después de 2 horas y se reemplazó con medio que contenía suero regular. Algunos de los cubreobjetos recubiertos con células fueron transfectados de manera simulada (sin ADN). Al día siguiente, la expresión del receptor KDR fue evaluada por inmunocitoquímica y se realizó el ensayo de unión.
- 30

Ensayo de la unión con burbujas

- 35 Las células transfectadas se incubaron con microburbujas dirigidas a KDR resuspendidas en 50% de plasma humano en PBS. Para la incubación con las células transfectadas, se llenó una pequeña tapa de plástico con una suspensión que contenía 1,3 x 10⁸ burbujas y la tapa se cubrió con un cubreobjetos invertido de Thermanox®, con el fin de poner en contacto las células transfectadas con las microburbujas dirigidas. Después de 30 min de incubación a TA, el cubreobjetos se levantó con unas pinzas, se lavó tres veces en PBS y se examinó con un microscopio para determinar la unión de las microburbujas dirigidas.

Determinación del % de superficie cubierta por microburbujas

- 40 Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital DC300F (Leica) y el porcentaje de superficie cubierta por microburbujas unidas en el área de la imagen se determinó usando el programa informático QWin versión 3.1 (Leica Microsystems AG, Basilea, Suiza). Se tomaron fotos de cada cubreobjetos Thermanox®. Para cada preparación de los Ejemplos 9 y 10, el ensayo de la unión se repitió un mínimo de dos veces, obteniendo de este modo un valor promedio de la superficie cubierta.

- 45 En las Tablas 6 y 7 siguientes, se registra la actividad de la unión de las microburbujas preparadas de acuerdo con los Ejemplos 9 y 10 anteriores.

Tal y como se indica en las Tablas, el mismo péptido puede mostrar diferentes actividades de unión cuando se incluye (como un lipopéptido) en diferentes formulaciones de fosfolípidos que forman la envuelta estabilizante de la microburbuja. Las microburbujas que contenían lipopéptidos unidos a KDR de la invención, se unen específicamente

a células que expresan KDR, mientras que no se unen apreciablemente a células transfectadas de forma simulada.

EJEMPLO 14

Prueba de unión dinámica sobre proteína quimérica rh VEGF-R2/Fc

Preparación de cubreobjetos recubiertos con Fc-VEGF-R2

- 5 Cubreobjetos de vidrio (40 mm de diámetro, Bioptechs Inc., Butler, PA EE.UU.) se recubrieron con proteína quimérica recombinante VEGF-R2/Fc humana (R&D Systems) de acuerdo con la siguiente metodología.

10 Se delimitó una superficie de dimensiones 14 x 25 mm en el portaobjetos de vidrio utilizando un marcador especial (Dako Pen) y se depositaron 400 µl de solución de Fc-VEGF-R2 a 4 µg/ml en PBS sobre esta superficie. Después de incubar durante una noche a 4°C, la solución se aspiró, se sustituyó por 0,5 mL de una solución de BSA al 1% p/v en PBS-0,05% de Tween 80, pH 7,4 y se incubó durante 3 horas a TA. A continuación, el cubreobjetos se lavó tres veces con 5 mL de PBS-0,05% de Tween 80.

Ensayo de la unión

15 Los estudios de la unión de burbujas dirigidas se realizaron utilizando una cámara de flujo con placa paralela (FCS2, Bioptech Inc., Butler, PA, EE.UU.) con una junta de cámara de 0,25 mm de espesor, con un adaptador personalizado para la inversión de la cámara hacia abajo. El cubreobjetos recubierto se insertó como una placa de la cámara de flujo. Las microburbujas (5×10^6 burbujas/mL en 50% de plasma humano en PBS) fueron retiradas a través de la cámara de flujo usando una bomba de infusión ajustable (bomba de infusión AS50 Auto Syringe®, Baxter, Deerfield, LL, EE.UU.) con una jeringa de 60 mL (Terumo). El caudal de la bomba se ajustó a 1 mL/min para obtener la tasa de cizallamiento deseada de aproximadamente 114 s^{-1} . Después de 10 minutos, el flujo se detuvo y se tomaron fotografías al azar en diferentes posiciones sobre el cubreobjetos (en áreas de aproximadamente $0,025 \text{ mm}^2$) utilizando un objetivo de 40x y una cámara monocromática CCD (F-View II, Soft Imaging Systems, Alemania) conectada a un microscopio invertido IX 50 de Olympus.

25 Se determinó el número de microburbujas en cada imagen, un promedio en relación con el número total de imágenes y el valor obtenido se dividió entonces entre diez (para obtener la "pendiente", es decir, la cantidad promedio de microburbujas unidas por minuto).

Para cada preparación de los Ejemplos 11 y 12, el ensayo de la unión se repitió cuatro veces, obteniendo de este modo un valor promedio de la pendiente.

30 La pendiente representa la tasa de unión de las burbujas sobre el sustrato diana. Por ejemplo, un valor de pendiente 8 indica que un promedio de ochenta (80) microburbujas se había unido al cubreobjetos recubierto en diez minutos. Una pendiente mayor indica que las burbujas tienen una capacidad mayor para unirse a la diana en condiciones de flujo.

En las tablas 8 y 9 siguientes, se ilustra la actividad de la unión de las microburbujas preparadas de acuerdo con los Ejemplos 11 y 12 anteriores.

35 Tal y como se desprende de las tablas, el mismo péptido puede mostrar diferentes actividades de unión cuando se incluye (como un conjugado de péptido-fosfolípido o lipopéptido) en diferentes formulaciones de fosfolípidos que forman la envuelta estabilizadora de la microburbuja.

Tabla 6

Ejemplo	KDR	Simulado	KDR-Simulado
9A	28,6%	0,4%	28,3%
9B	28,0%	0,3%	27,7%

Tabla 7

Ejemplo	KDR	Simulado	KDR-Simulado
10A	23,6%	0,2%	23,5%
10B	28,0%	0,0%	28,0%

Tabla 8

5

Ejemplo	Pendiente
11A	8,2
11B	8,1
11C	5,8

Tabla 9

Ejemplo	Pendiente
12A	9,0
12B	8,0
12C	7,8

10 **EJEMPLO 15**Evaluación *in vivo* de agentes de contraste para ultrasonidos dirigidos a KDR

La capacidad de los agentes de contraste para ultrasonidos que contienen lipopéptidos de la invención que se unen a KDR para unirse a tejido que expresa KDR *in vivo*, se evaluó utilizando un modelo conocido de angiogénesis: el modelo de tumor VX2 de conejo.

- 15 Se utilizó un modelo conocido de tejido angiogénico para examinar con ultrasonidos la capacidad de las microburbujas dirigidas a KDR para localizar y proporcionar una imagen del tejido angiogénico.

El carcinoma VX2 de conejo se implantó en serie en el músculo dorsal de conejos de Nueva Zelanda (Charles River Laboratories, Francia) que pesaban 2,5/3 kg.

Preparación de homogeneizado tumoral

- 20 El tumor se extirpó quirúrgicamente, se colocó en medio de cultivo de McCoy que contenía 10% de suero de ternera fetal, antibióticos, Glutamax 1 1,5 mM y se cortó en pequeños trozos que se lavaron para eliminar la sangre y los residuos. A continuación, los trozos de tumor (3 a 5 cm³) se colocaron en un tubo Falcon de 50 mL que contenía 5 mL de medio completo. El tejido tumoral se molió (Polytron) hasta que no había ningún trozo sólido visible. El fluido turbio se centrifugó durante 5 minutos a 300 g y se desechó el material sobrenadante. Se añadieron 7 mL de medio de nuevo aporte por 5 mL de sedimento.
- 25

Implantación del tumor

Los conejos recibieron primero 0,3 mL de Vetranquil (acepromazina, Sanofi, inyectada por vía intramuscular) y fueron anestesiados después con una inyección intramuscular de una mezcla de Ketaminol[®]5/Xilazina (Veterinaria AG/Sigma) (50/10 mg/mL, 0,7 mL/kg).

- 5 Cien microlitros de material homogeneizado de tumor VX2 se inyectó por vía intramuscular. Quince días después de la implantación de los tumores VX2, los animales fueron anestesiados de nuevo con la misma mezcla, además de una inyección subcutánea de 50% de uretano (2 mL/kg s.c.) (Sigma) para experimentos de formación de imagen.

Formación de imágenes con ultrasonidos *in vivo*

- 10 La formación de imágenes de tumores VX2 se realizó utilizando un aparato ATL HDI 5000 de sistema de formación de imágenes para ultrasonidos equipado con una sonda lineal L7-4. La inversión del impulso en modo B a una potencia acústica alta (MI = 0,9) se utilizó para evaluar la acumulación de microburbujas dirigidas sobre el receptor KDR expresado en el endotelio de neovasos. La sonda lineal se fijó sobre la piel, directamente sobre los tumores implantados.

- 15 Después de la inyección de burbujas (0,1 µL/kg de gas) con las preparaciones de los Ejemplos 16 o 17, se detuvo la insonación permitiendo que las burbujas se acumularan durante 25 minutos. A continuación, se reactivó la insonación con una potencia acústica elevada (0,9 MI) destruyendo todas las burbujas presentes en el tumor. La cantidad de burbujas que circulaban libremente se determinó después mediante el registro de la señal obtenida después de 20 segundos de acumulación sin insonación.

- 20 Fotogramas de vídeo procedentes de experimentos de formación de imágenes de tumores VX2 fueron capturados con captura de vídeo y analizados con el programa informático 2.0 Image-Pro Plus. La imagen que representaba burbujas circulantes libres se sustrajo de la imagen obtenida a los 25 min, para proporcionar una imagen que representaba las burbujas unidas.

- 25 Haciendo referencia a la Figura 11 (que muestra los resultados con la preparación del Ejemplo 16) y la Figura 12 (que muestra los resultados con la preparación del Ejemplo 17), las Figuras 11A y 12A muestran una imagen antes de la inyección de burbujas (valor de referencia); las Figuras 11B y 12B muestran la retención de contraste de burbujas en el tumor 25 minutos después de la inyección; y las Figuras 11C y 12C muestran el resultado obtenido después de la sustracción del valor de referencia y las burbujas circulantes libres y representan las microburbujas unidas que contienen lipopéptidos de KDR de acuerdo con la presente invención. Los Ejemplos 15-17 y las Figuras 11 y 12 confirman que los agentes de contraste para ultrasonidos que son portadores de tales restos que se unen a KDR, localizan el tejido que expresa KDR (y, por lo tanto, angiogénico) en modelos animales.
- 30

EJEMPLO 16

El Ejemplo 12A se repitió reemplazando DSPE-PEG2000 por DSPE-PEG1000 (2,7 mg, 1,54 µmol) y usando 2,5 mg (0,31 µmol) de conjugado de péptido dímero y fosfolípido (11) mostrado en la Figura 5.

EJEMPLO 17

- 35 El Ejemplo 16 se repitió reemplazando el conjugado de péptido dímero y fosfolípido por la misma cantidad molar de conjugado de fosfolípido monómero (1) mostrado en la Figura 2.

LISTADO DE SECUENCIAS

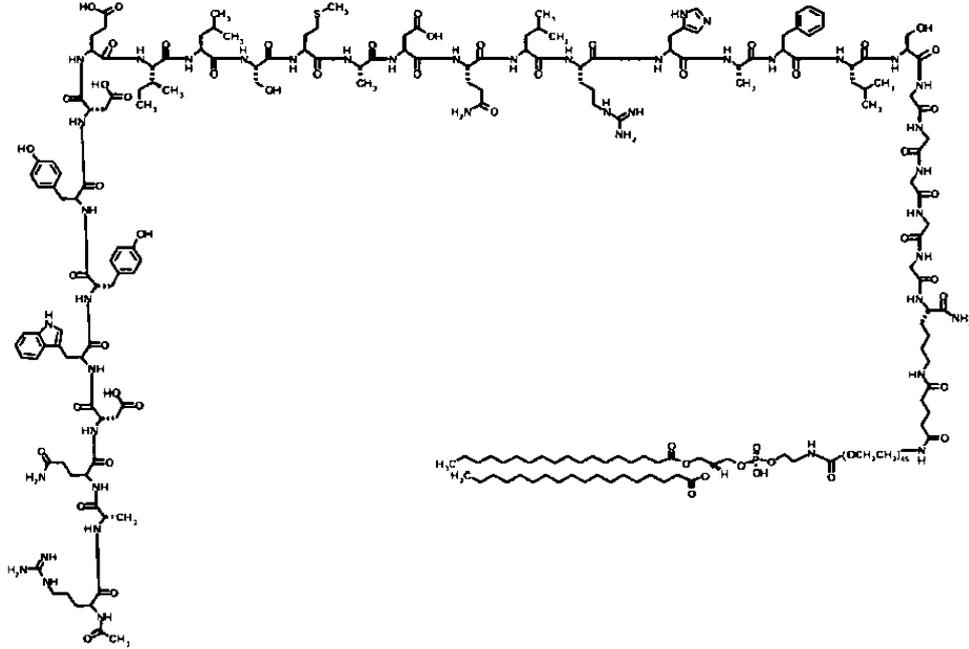
- <110> Nanjappan, et al.
- <120> Conjugados de vector específico de una diana-fosfolípido
- 40 <130> 57637-1542
- <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 29
- 45 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Descripción de una secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> AC
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> (DSPE-PEG2000-NH-Glut)-NH2
 <400> 1
 Arg Ala Gln Asp Trp Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Ser Met Ala Asp Gln
 1 5 10 15
 Leu Arg His Ala Phe Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Lys
 20 25
 <210> 2
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de una secuencia artificial: péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> AC
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> NH2
 25
 <400> 2
 Arg Ala Gln Asp Trp Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Ser Met Ala Asp Gln
 1 5 10 15
 Leu Arg His Ala Phe Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Lys
 20 25
 <210> 3
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de una secuencia artificial: péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> AC
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> (NHS-Glut)-NH2
 40
 <400> 3
 Arg Ala Gln Asp Trp Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Ser Met Ala Asp Gln
 1 5 10 15
 Leu Arg His Ala Phe Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Lys
 20 25

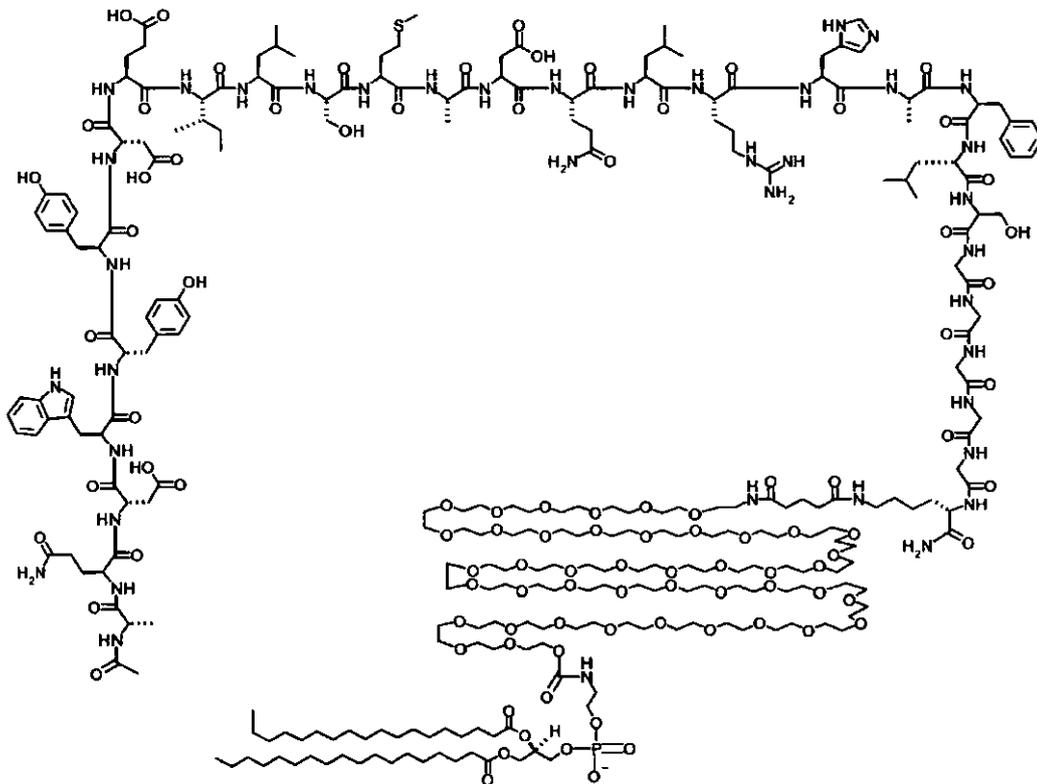
<210> 4
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de una secuencia artificial: péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 10 <223> AC
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> (DSPE-PEG2000-NH-Glut)-NH2
 15 <400> 4
 Ala Gln Asp Trp Tyr Tyr Asp Glu Ile Leu Ser Met Ala Asp Gln Leu
 1 5 10 15
 Arg His Ala Phe Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Lys
 20 25
 <210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de una secuencia artificial: péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 25 <223> AC
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 30 <223> NH2
 <400> 5
 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

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de péptido-fosfolípido seleccionado a partir del grupo consistente

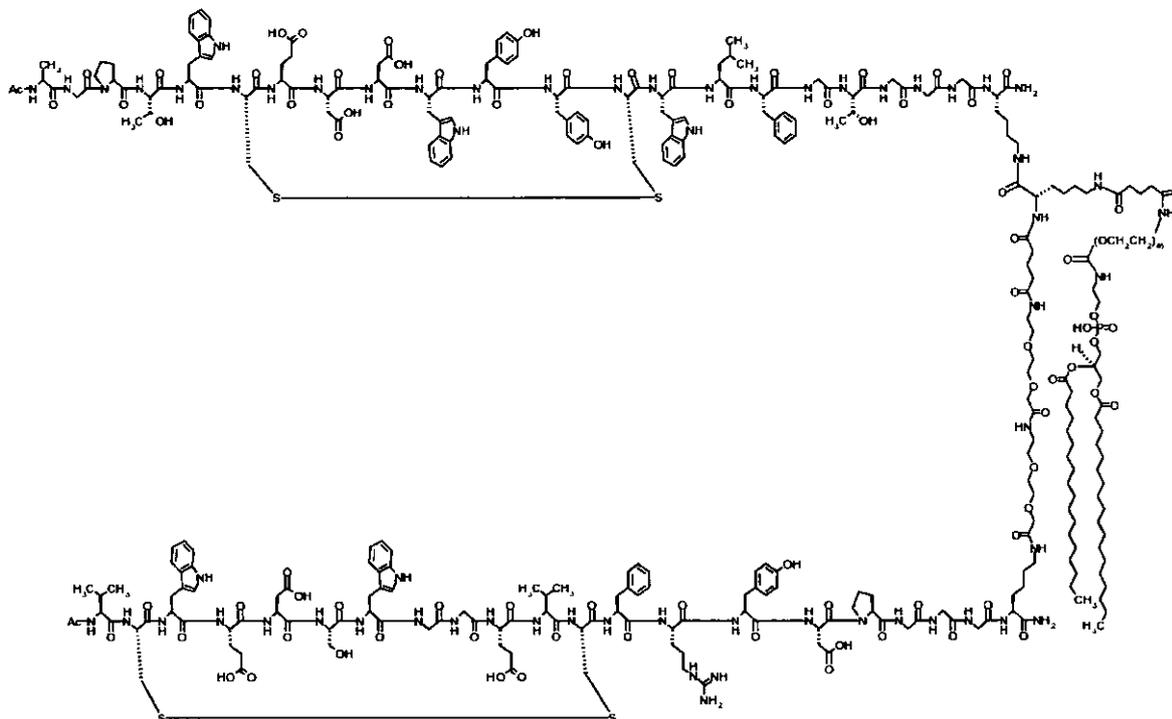


en:



5

; y



2. Una composición de agente de contraste para ultrasonidos que comprende un conjugado según la reivindicación 1.
3. La composición según la reivindicación 2, en donde el agente de contraste comprende una microvesícula llena de gas.
- 5 4. La composición según la reivindicación 3, en donde la microvesícula llena de gas comprende un fosfolípido.
5. La composición según la reivindicación 3, en donde la microvesícula llena de gas comprende adicionalmente dos o más componentes seleccionados entre el grupo consistente en: DSPC, DPPG, DPPA, DSPA, DPPE, DSPE-PEG1000, DSPE-PEG2000, ácido palmítico y ácido esteárico.
- 10 6. La composición según la reivindicación 5, en donde el conjugado comprende
 - (i) disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDP-GGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH₂}-NH₂ y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPC y DPPG;
 - (ii) SEQ ID NO. 4 y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPC y DPPG;
 - 15 (iii) SEQ ID NO. 4 y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPE-PEG1000, DPPE y DPPG;
 - (iv) disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDP-GGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH₂}-NH₂ y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPE-PEG1000, DPPE y DPPG;
 - 20 (v) disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDP-GGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH₂}-NH₂ y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPE-PEG1000, DSPC y DSPA;
 - (vi) SEQ ID NO. 1 y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPE-PEG2000, DSPC y DSPA;
 - (vii) SEQ ID NO. 1 y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPC y DSPA;
 - 25 (viii) disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDP-GGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH₂}-NH₂ y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPE-PEG2000, DSPC y estearato;
 - (ix) SEQ ID NO. 1 y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPE-PEG2000, DSPC y estearato;

- (x) disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDP-GGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH₂}-NH₂ y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPC y estearato;
- 5 (xi) disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK{disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDP-GGGK[-Adoa-Adoa-Glut-K(DSPE-PEG2000-NH-Glut)]-NH₂}-NH₂ y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPE-PEG1000, DSPC y estearato;
- (xii) SEQ ID NO. 1 y el agente de contraste comprende adicionalmente DSPE-PEG1000, DSPC y estearato.
7. La composición según la reivindicación 5, que comprende adicionalmente un componente seleccionado entre el grupo consistente en: azúcares, polisacáridos y polioles.
- 10 8. La composición según la reivindicación 7, en donde dicho componente se selecciona a partir de manitol, dextrano y polietilenglicol.
9. La composición según la reivindicación 3, en donde dicho gas comprende un gas fluorado.
10. La composición según la reivindicación 9, en donde el gas comprende C₂F₈, C₄F₁₀ o SF₆, opcionalmente en mezcla por adición de aire, nitrógeno, oxígeno o dióxido de carbono.
- 15 11. Una composición de agente de contraste para ultrasonidos que comprende un conjugado de péptido-fosfolípido que comprende uno o varios péptidos monómeros seleccionados entre el grupo consistente en Ac-Arg-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-Lys-NH₂; 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-Lys-NH₂; disulfuro cíclico (6-13) de Ac-Ala-Gly-Pro-Thr-Trp-Cys-Glu-Asp-Asp-Trp-Tyr-Tyr-Cys-Trp-Leu-Phe-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys(ivDde)-NH₂ y disulfuro cíclico (2-12) de Ac-Val-Cys-Trp-Glu-Asp-Ser-Trp-Gly-Gly-Glu-Val-Cys-Phe-Arg-Tyr-Asp-Pro-Gly-Gly-Gly-Lys(Adoa-Adoa)-NH₂.
- 20 12. La composición según la reivindicación 11, en donde el agente de contraste comprende una microvesícula llena de gas.
13. La composición según la reivindicación 12, en donde dicho gas comprende un gas fluorado.
- 25 14. La composición según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente dos o varios componentes seleccionados entre el grupo consistente en: DSPC, DPPG, DPPA, DSPA, DPPE, DSPE-PEG1000, DSPE-PEG2000, ácido palmítico y ácido esteárico.
15. La composición según la reivindicación 14, en donde el gas comprende C₃F₈, C₄F₁₀ o SF₆, opcionalmente en mezcla por adición de aire, nitrógeno, oxígeno o dióxido de carbono.
- 30 16. El conjugado de péptido-fosfolípido según la reivindicación 12, en donde el fosfolípido se selecciona entre el grupo que consiste en: fosfatidiletanolaminas, fosfatidiletanolaminas modificadas y DSPE-PEG2000.
17. Un método para preparar una microvesícula llena de gas que comprende un fosfolípido que comprende las etapas de:
- 35 a. preparar una emulsión acuosa-orgánica que comprende i) un medio acuoso que incluye agua, ii) un disolvente orgánico sustancialmente inmiscible en agua, iii) un fosfolípido, iv) un conjugado de péptido-fosfolípido según la reivindicación 1 y v) un agente lioprotector;
- b. liofilizar dicha emulsión para obtener una matriz liofilizada que comprende dicho fosfolípido;
- c. poner en contacto dicha matriz liofilizada con un gas biocompatible;
- 40 d. reconstituir dicha matriz liofilizada disolviéndola en un líquido portador acuoso fisiológicamente aceptable, para obtener una suspensión de dichas microvesículas llenas de gas.
18. El método según la reivindicación 17, en donde la etapa a comprende las etapas de:
- a1. preparar una suspensión acuosa que comprende un fosfolípido pegilado y el conjugado según la reivindicación 1;
- 45 a2. preparar una emulsión acuosa-orgánica que comprende el medio acuoso, el disolvente orgánico, el fosfolípido y el agente lioprotector; y
- a3. mezclar por adición dicha suspensión acuosa de la etapa a1 con la emulsión de la etapa a2.
19. Un método para preparar un conjugado de péptido y fosfolípido que comprende conjugar un péptido selec-

- 5 cionado entre el grupo consistente en SEQ ID NO. 2, disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH₂, disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH₂, SEQ ID NO. 5 y disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(-Adoa-Adoa-Glut-K)-NH₂]-NH₂ con un fosfolípido.
20. El método según la reivindicación 19, en donde el fosfolípido es DSPE-PEG2000-NH₂.
21. El método según la reivindicación 20, en donde la conjugación comprende hacer reaccionar un mono-éster de NHS del péptido con un grupo amino libre de la sal del fosfolípido.
- 10 22. Un método para preparar un conjugado de péptido y fosfolípido que tiene niveles bajos de TFA que comprende las etapas de:
- convertir las sales de TFA del péptido dímero en una sal acetato a través de intercambio aniónico; y
- conjuguar el péptido dímero con un fosfolípido,
- en donde el péptido comprende disulfuro cíclico (6-13) de Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(-Adoa-Adoa-Glut-K)-NH₂]-NH₂.
- 15 23. Un método para preparar un conjugado de péptido-fosfolípido que tiene niveles bajos de TFA que comprende eluir un conjugado de péptido-fosfolípido y iones de TFA en una columna de exclusión por tamaño, en donde el conjugado de péptido-fosfolípido comprende un péptido dímero o monómero seleccionado entre el grupo consistente en disulfuro cíclico (6-13) Ac-AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(-Adoa-Adoa-Glut-K)-NH₂]-NH₂; SEQ ID NO.2, disulfuro cíclico (6-13) de Ac-
- 20 AGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGK[K(ivDde)]-NH₂, disulfuro cíclico (2-12) de Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK(Adoa-Adoa)-NH₂ y SEQ ID NO. 5.

Síntesis de conjugado de péptido monómero y fosfolípido

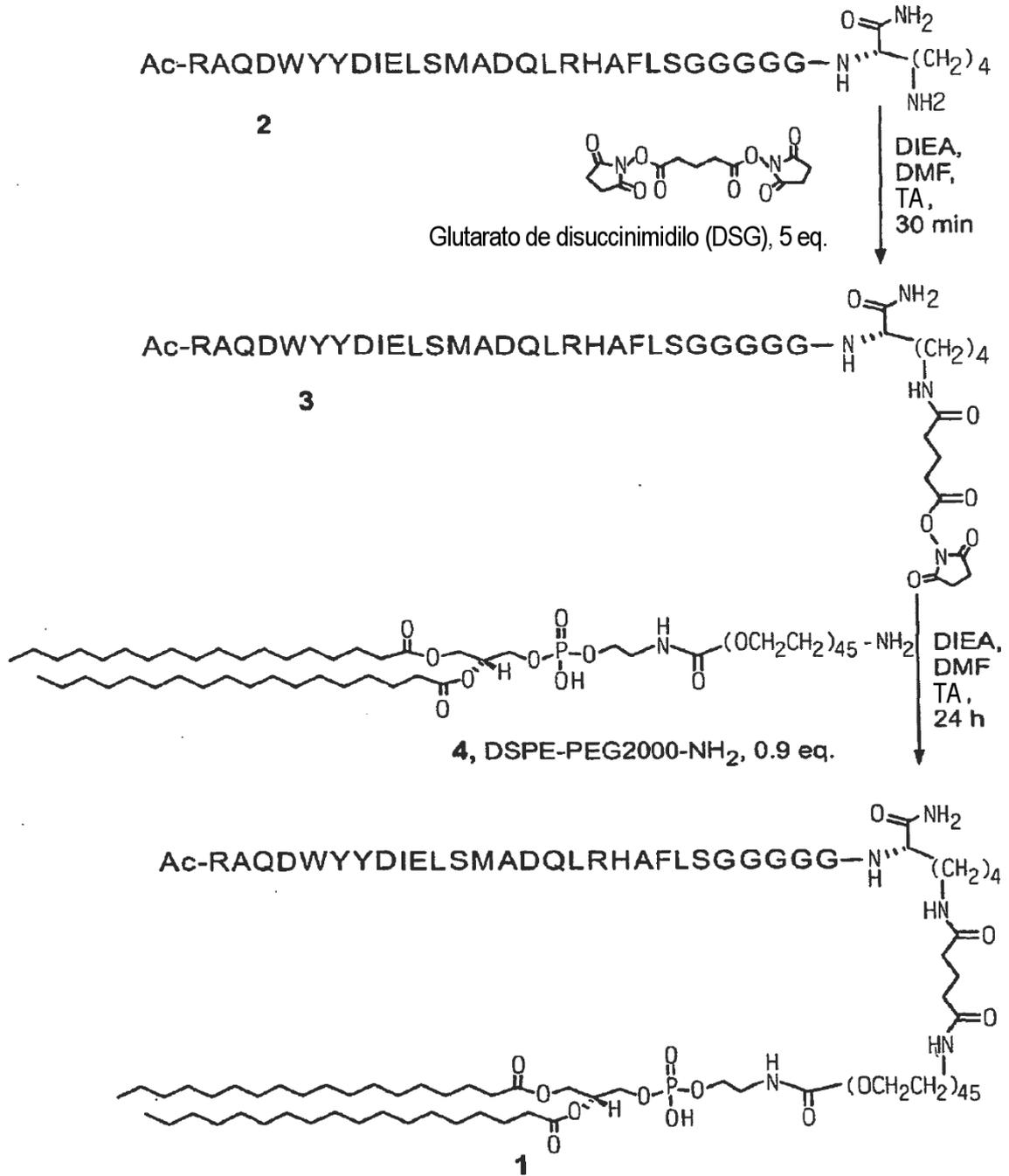
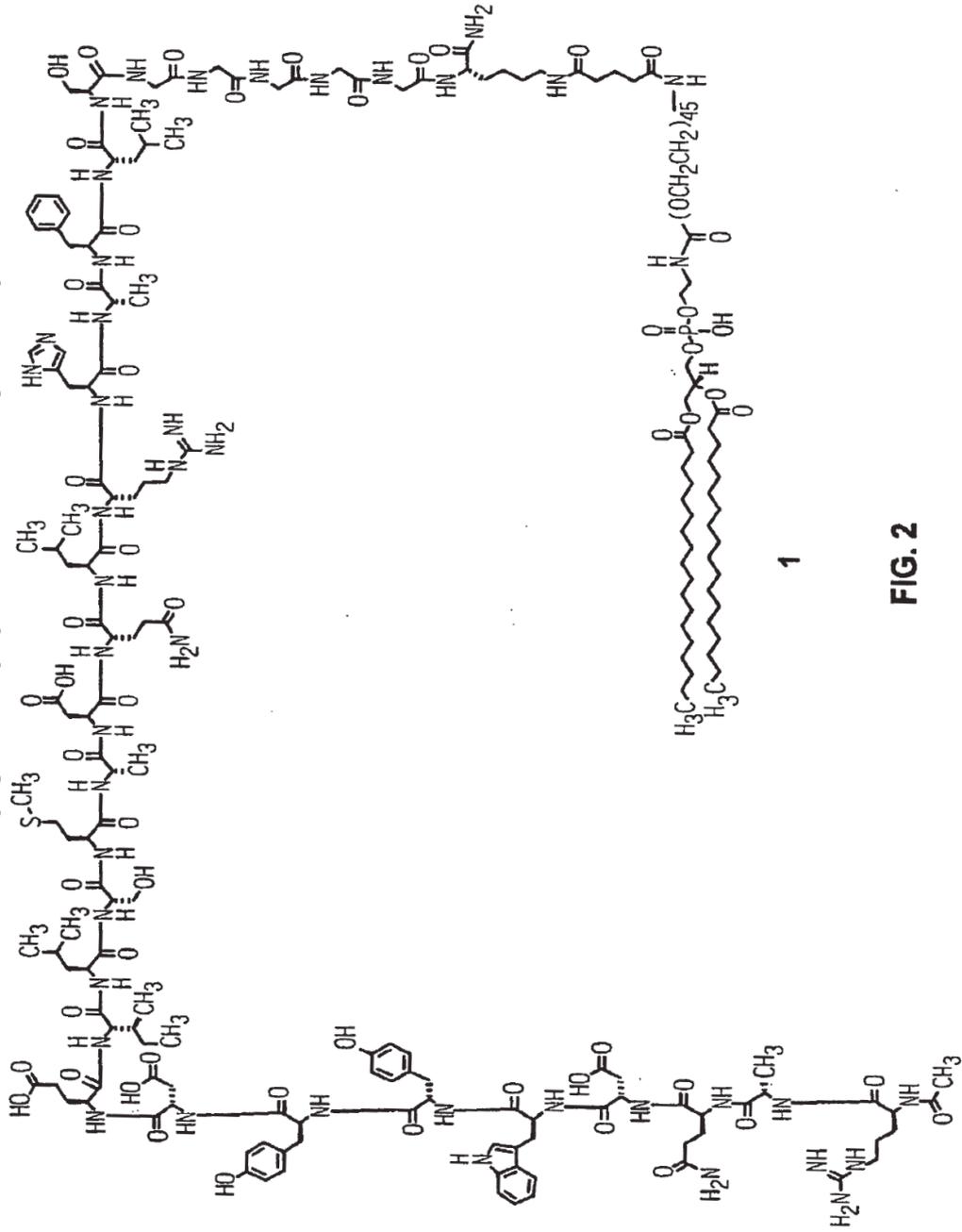


FIG. 1

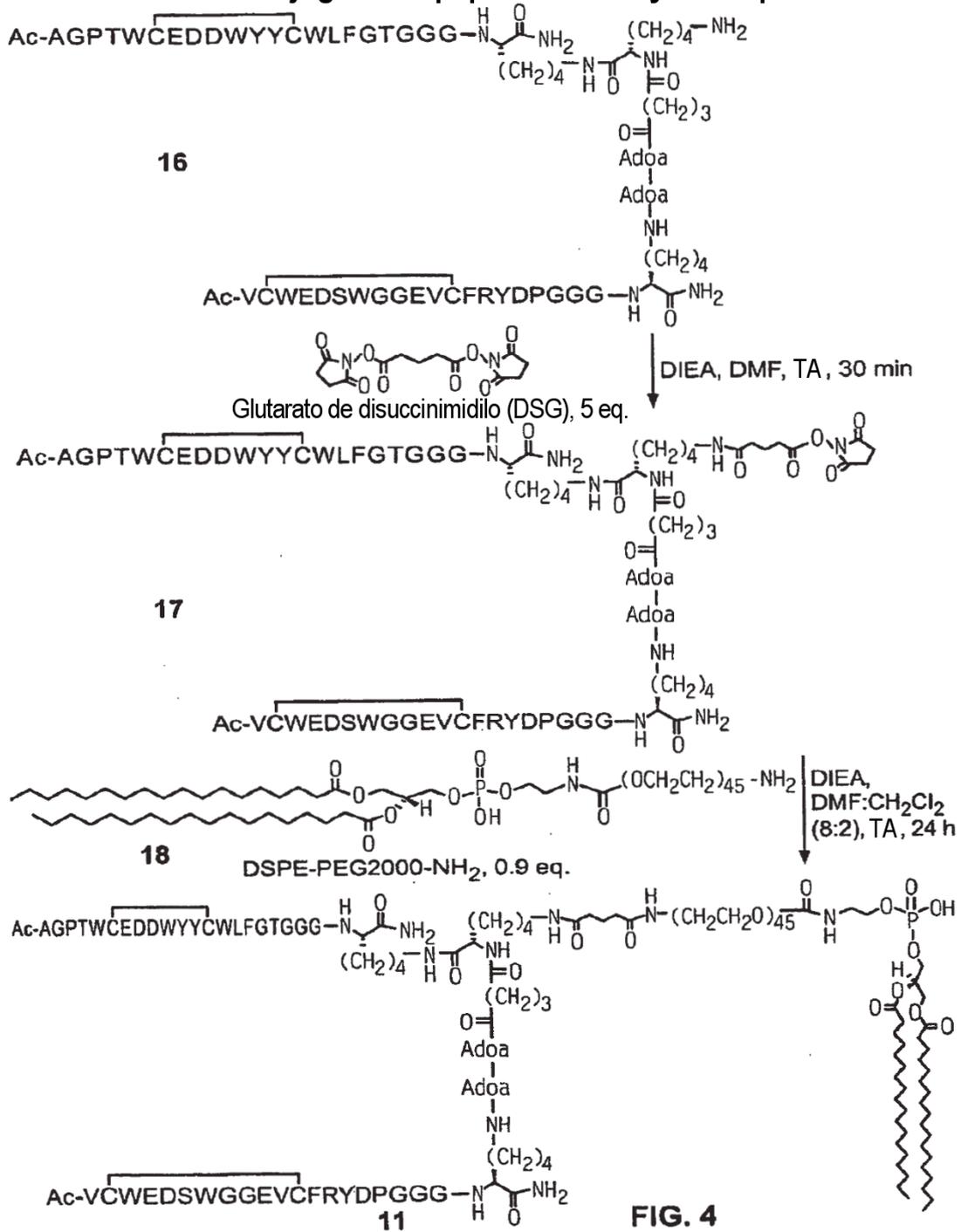
Conjugado de péptido monómero y fosfolípido



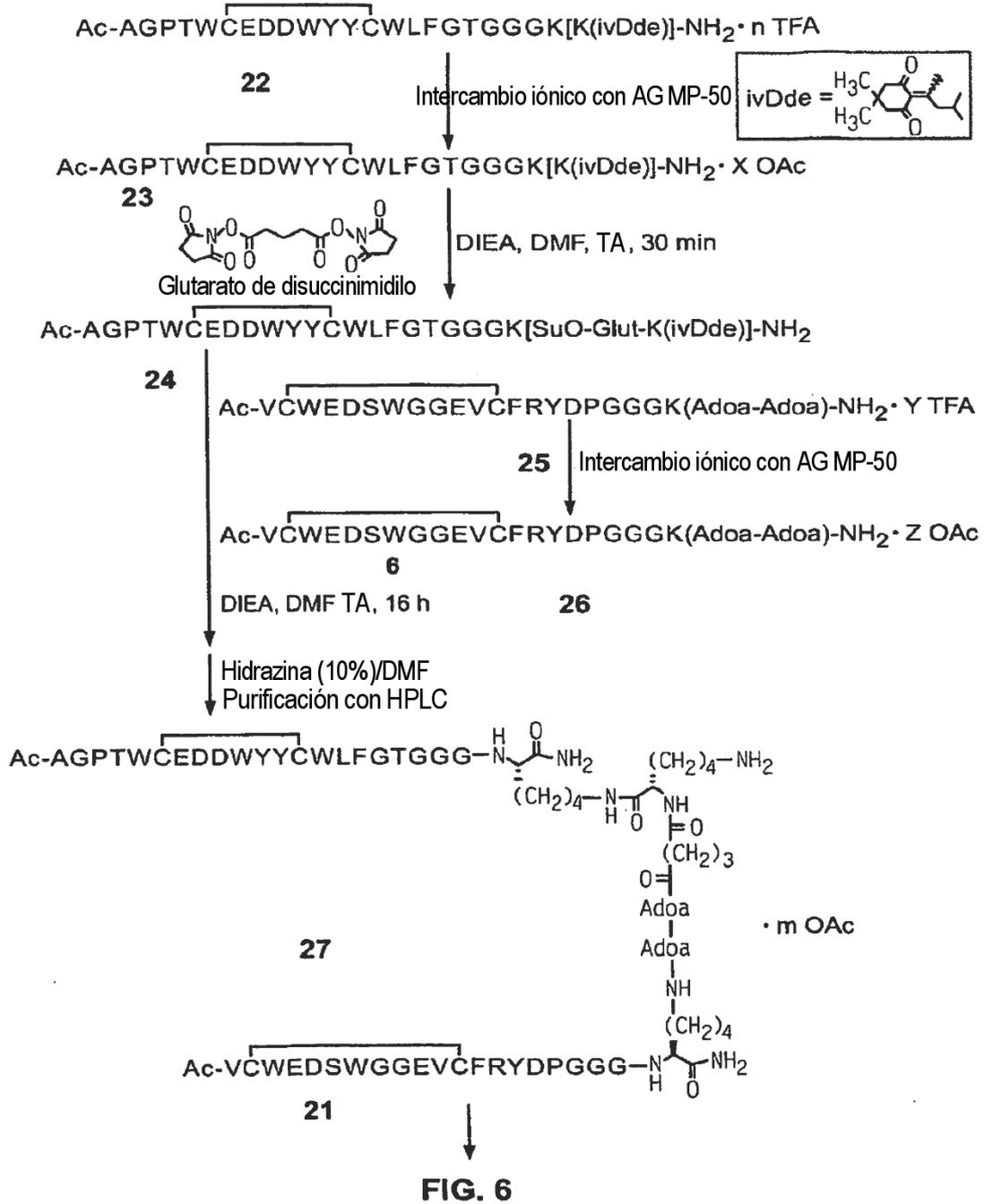
1

FIG. 2

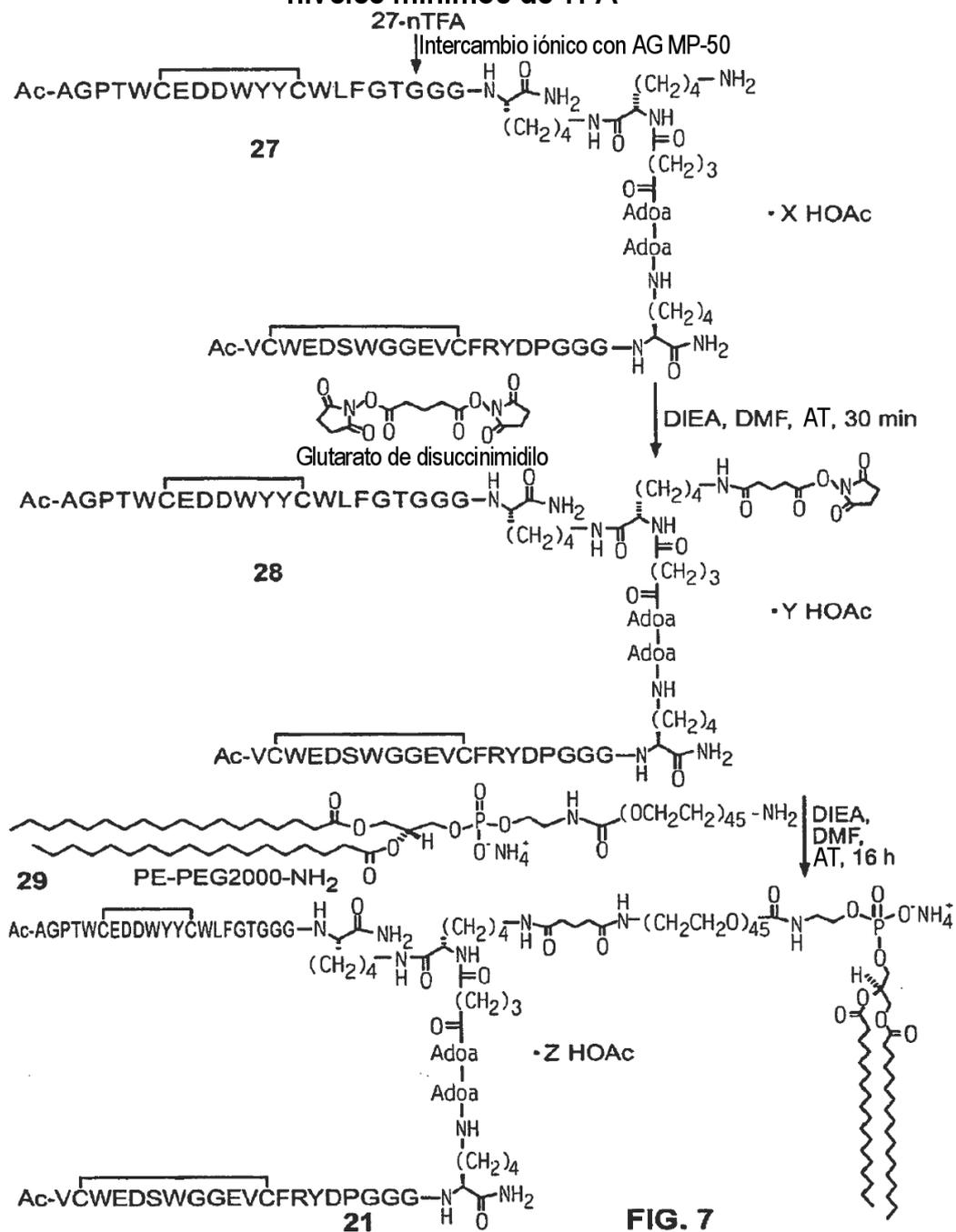
Síntesis de conjugado de péptido dímero y fosfolípido



Síntesis de conjugado de péptido dímérico y fosfolípido que tiene niveles mínimos de TFA



Síntesis de conjugado de péptido dímero y fosfolípido que tiene niveles mínimos de TFA



Síntesis de conjugado de péptido dímérico y fosfolípido que tiene niveles mínimos de TFA

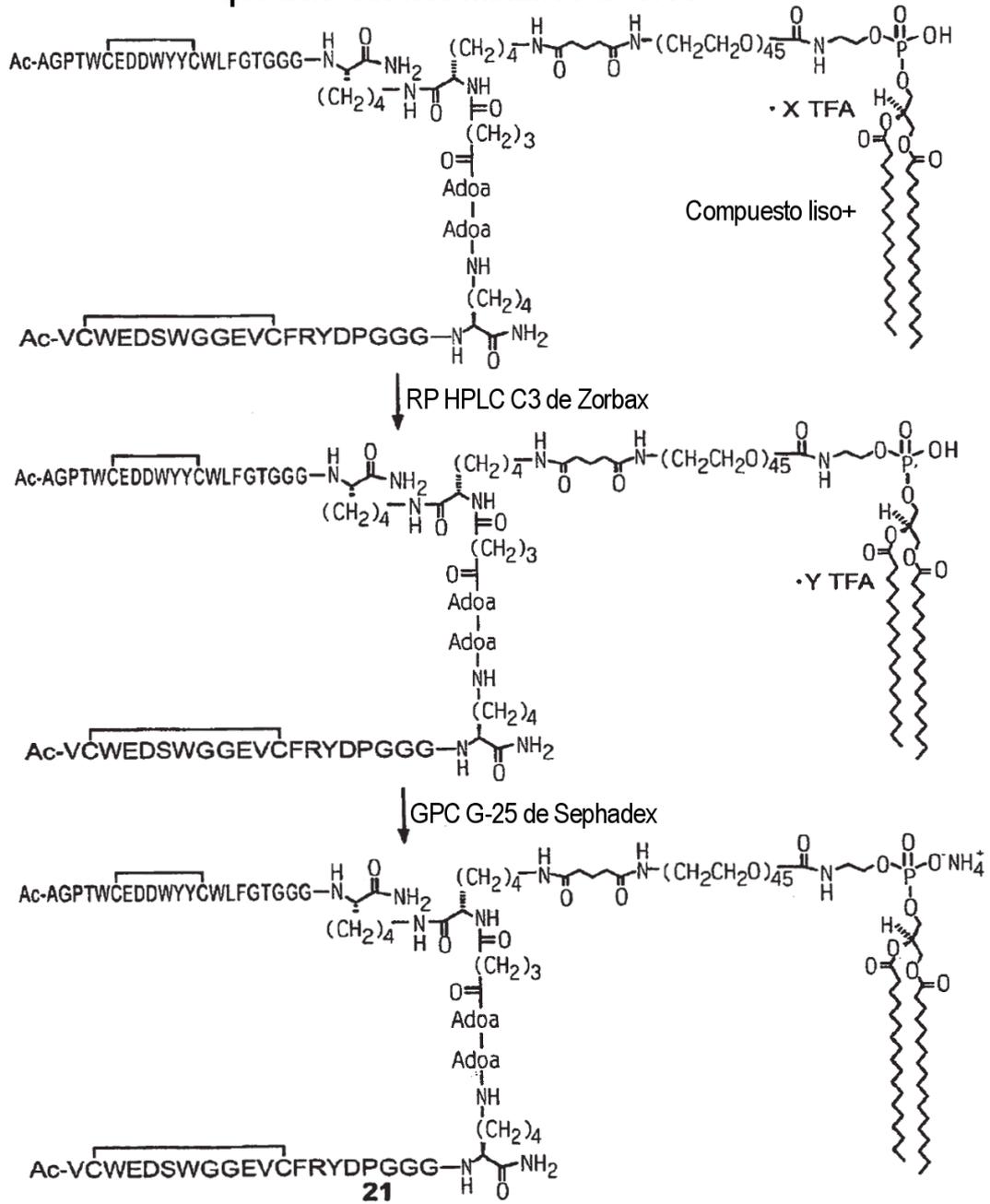
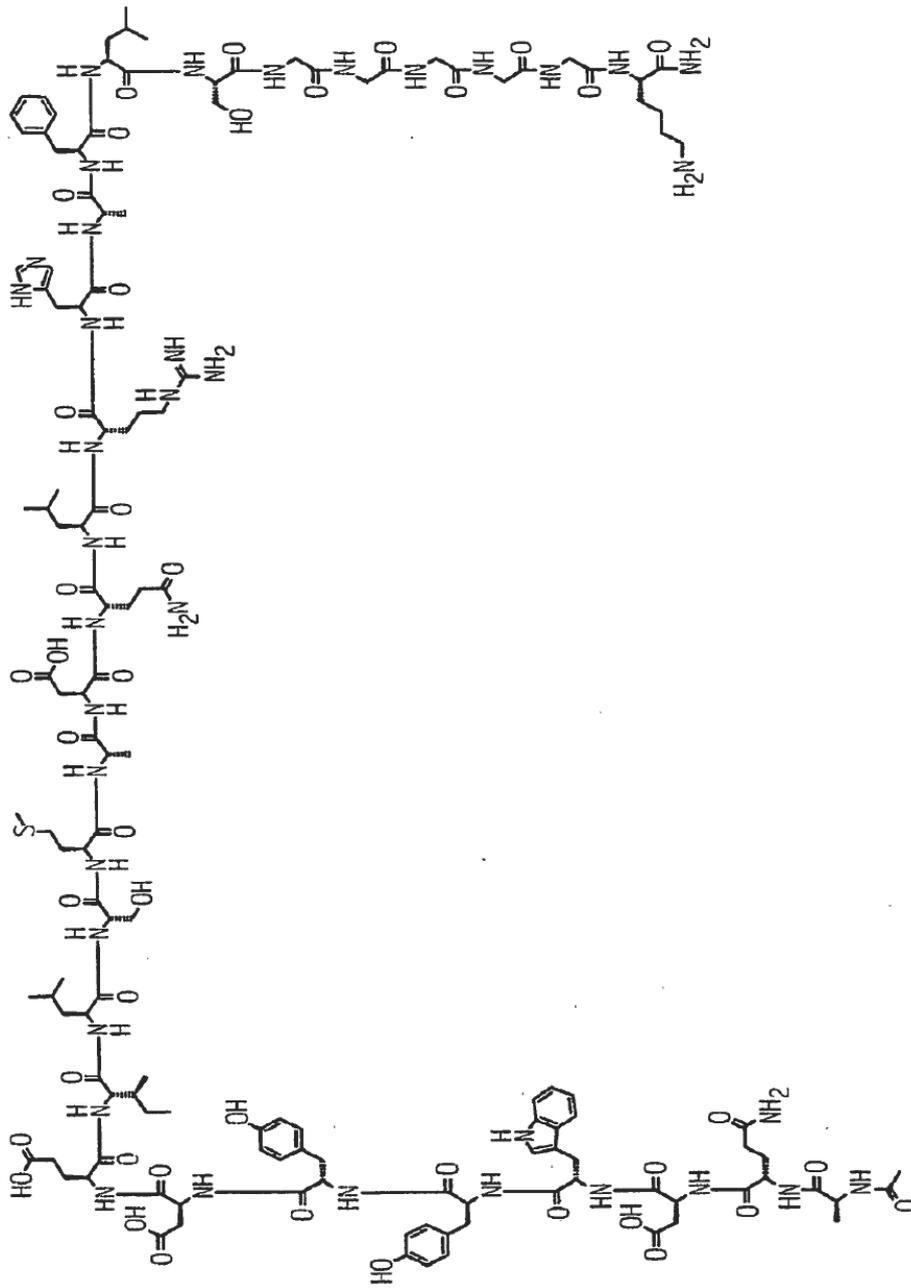


FIG. 8



32

FIG. 9

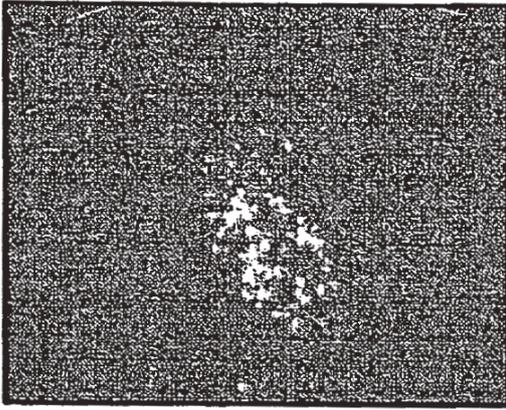


FIG. 11C

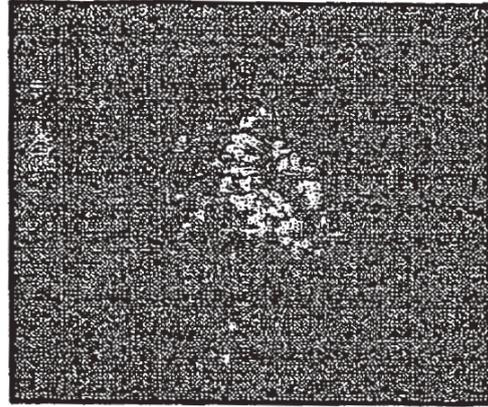


FIG. 12C

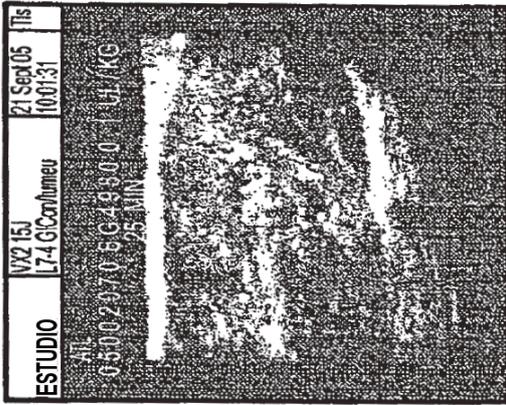


FIG. 11B

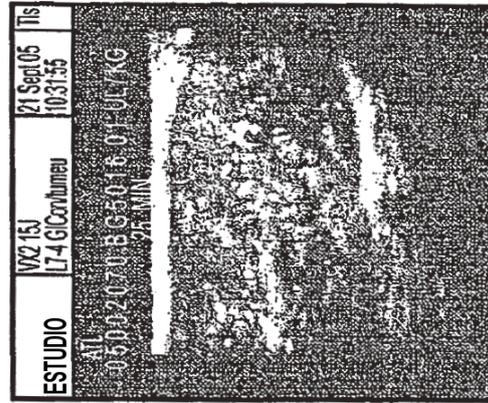


FIG. 12B

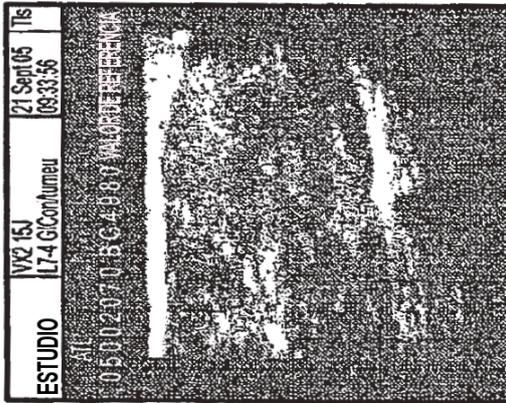


FIG. 11A

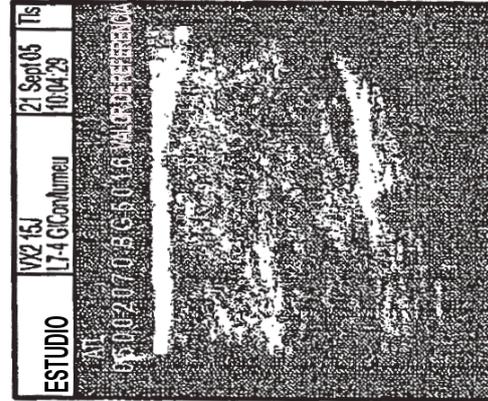


FIG. 12A